

**Erstellung von Expressionsprofilen  
kolorektaler Tumoren und Metastasen zur Ermittlung  
progressions- und metastasierungsrelevanter Gene**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
- Biologie und Vorklinische Medizin -  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Astrid Köhler**  
aus Regensburg  
2002

Promotionsgesuch eingereicht am: 17. Juli 2002

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. S. Schneuwly

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. A. Kurtz (Vorsitzender)

Prof. Dr. S. Schneuwly (1. Prüfer; Erstgutachter)

Prof. Dr. F. Hofstädter (2. Prüfer; Zweitgutachter)

Prof. Dr. G Löffler (3. Prüfer)

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 KOLOREKTALE KARZINOME</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 ANALYSE DER GENEXPRESSION MALIGNER TUMOREN</b> .....	<b>4</b>
<i>1.2.1 Array-Technologie zur Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene</i> .....	<i>5</i>
<i>1.2.2. Molekulare Klassifizierung von Tumoren auf Transkriptionsebene (Clusteranalyse)</i> .....	<i>7</i>
<b>1.3 METASTASIERUNG</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 BEDEUTUNG ISOLIERTER DISSEMINIERTER TUMORZELLEN</b> .....	<b>11</b>
<b>1.5 ZIELSETZUNG</b> .....	<b>15</b>
<b>2 MATERIAL</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 PATIENTENMATERIAL</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2 ZELLINIEN</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3 VERBRAUCHSMATERIAL</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4 VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5 PUFFER UND LÖSUNGEN</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6 NÄHRMEDIEN</b> .....	<b>24</b>
<i>2.6.1 Nährmedien für humane Zelllinien</i> .....	<i>24</i>
<i>2.6.2 Nährmedien für E.coli</i> .....	<i>24</i>
<b>3 METHODEN</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 KULTUREN</b> .....	<b>25</b>
<i>3.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien</i> .....	<i>25</i>
<i>3.1.2 Anzucht und Lagerung von E.coli</i> .....	<i>25</i>
<b>3.2 FLUORESCENZ-AKTIVIERTE ZELLSORTIERUNG</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3 ISOLIERUNG EPITHELIALER ZELLEN AUS KNOCHENMARK UND BLUT</b> .....	<b>26</b>
<i>3.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Knochenmark und Blut</i> .....	<i>26</i>
<i>3.3.2 Immunomagnetische Markierung und Anreicherung epithelialer Zellen</i> .....	<i>26</i>
<i>3.3.3 Separation bead-markierter Zellen mittels Mikromanipulation</i> .....	<i>27</i>
<b>3.4 ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN</b> .....	<b>27</b>
<i>3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gefriermaterial</i> .....	<i>27</i>
<i>3.4.2 Isolierung von mRNA aus wenigen / einzelnen Zellen</i> .....	<i>28</i>
<i>3.4.3 Simultane Isolierung von DNA und RNA aus wenigen / einzelnen Zellen</i> .....	<i>28</i>
<i>3.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli</i> .....	<i>28</i>
<i>3.4.5 Isolierung von DNA aus Paraffin-eingebettetem Patientengewebe mittels manueller Mikrodissektion</i> .....	<i>29</i>
<b>3.5 REVERSE TRANSKRIPTION</b> .....	<b>29</b>
<i>3.5.1 Reverse Transkription von Gesamt-RNA</i> .....	<i>29</i>
<i>3.5.2 Reverse Transkription von bead-gebundener mRNA</i> .....	<i>30</i>
<b>3.6 AMPLIFIZIERUNG VON DNA UND CDNA MIT DER POLYMERASE-KETTENREAKTION</b> <b>30</b>	
<b>3.6.1 PEP-PCR (DNA und cDNA)</b> .....	<b>31</b>
<b>3.6.2 SMART-PCR</b> .....	<b>31</b>
<b>3.6.3 Spezifische PCR</b> .....	<b>32</b>
<b>3.6.4 Enrichment-PCR</b> .....	<b>34</b>
<b>3.6.5 Quantitative PCR am LightCycler (Roche)</b> .....	<b>36</b>

<b>3.7 PRÄPARATION UND AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN .....</b>	<b>37</b>
3.7.1 <i>Fällung von Gesamt-RNA .....</i>	37
3.7.2 <i>Fällung von PCR-Produkten .....</i>	37
3.7.3 <i>Reinigung von PCR-Produkten .....</i>	38
3.7.4 <i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....</i>	38
<b>3.8 AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN .....</b>	<b>38</b>
3.8.1 <i>Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA in analytischen Agarose-Gelen .....</i>	38
3.8.2 <i>Elektrophoretische Auftrennung von RNA für Northern Blots .....</i>	39
3.8.3 <i>Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....</i>	39
<b>3.9 DNA-SEQUENZANALYSE .....</b>	<b>39</b>
<b>3.10 HYBRIDISIERUNG UND DETEKTION VON NUKLEINSÄUREN .....</b>	<b>40</b>
3.10.1 <i>Übertragung von DNA und RNA aus Agarose-Gelen auf Nylonmembranen (Southern Blot, Northern Blot) .....</i>	40
3.10.2 <i>Übertragung von PCR-Produkten auf Nylonmembranen (Dot Blot) .....</i>	40
3.10.3 <i>Markierung von DNA-Sonden .....</i>	41
3.10.4 <i>Prähybridisierung und Hybridisierung (Blots und RZPD-Arrays) .....</i>	41
<b>3.11 SPALTEN VON DNA DURCH RESTRIKTIONSENZYME .....</b>	<b>41</b>
<b>3.12 ERSTELLUNG UND ANALYSE VON RNA-EXPRESSIONSPROFILIEN MIT CDNA-ARRAYS .....</b>	<b>41</b>
3.12.1 <i>Hybridisierung (Atlas Human Cancer 1.2 Array) .....</i>	41
3.12.2 <i>Clusteranalyse .....</i>	43
3.12.3 <i>Normalisierung der Array-Expressionsdaten .....</i>	43
3.12.4 <i>Statistische Auswertung .....</i>	43
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 DIFFERENTIELLE GENEXPRESSION ZWISCHEN DER NORMALEN DARMSCHLEIMHAUT, KOLOREKTALEN KARZINOMEN UND LEBERMETASTASEN .....</b>	<b>44</b>
4.1.1 <i>Auswahl der Patientenproben für die Hybridisierungsexperimente .....</i>	44
4.1.2 <i>Erstellung von Genexpressionsprofilen mit der cDNA-Array-Technik .....</i>	45
4.1.3 <i>Differenziell exprimierte Gene zwischen Primärtumoren und normaler Darmschleimhaut .....</i>	46
4.1.4 <i>Korrelation zwischen der Zahl differenziell exprimierter Gene und dem Tumorstadium .....</i>	50
4.1.5 <i>Verifizierung differentieller Genexpression durch relative quantitative RT-PCR (LightCycler) .....</i>	51
4.1.5.1 <i>Primerauswahl für die Zielgene .....</i>	52
4.1.5.2 <i>Primerauswahl für die Referenzgene .....</i>	52
4.1.5.3 <i>Relative quantitative PCR am LightCycler .....</i>	56
4.1.6 <i>Differenziell exprimierte Gene zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Lebermetastasen .....</i>	60
4.1.7 <i>Hierarchische Clusteranalyse .....</i>	62
4.1.8 <i>Ermittlung von statistisch signifikant differenziell exprimierten Genen .....</i>	63
4.1.9 <i>Clusteranalyse mit selektierten Genen .....</i>	71
<b>4.2 UNTERSUCHUNG EPITHELIALER TUMORZELLEN AUS BLUT UND KNOCHENMARK .....</b>	<b>72</b>
4.2.1 <i>Isolierung epithelialer Tumorzellen aus Blut .....</i>	72
4.2.2 <i>Isolierung epithelialer Zellen aus Knochenmark .....</i>	74

<b>4.3 MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNG EINZELNER UND WENIGER TUMORZELLEN</b>	<b>77</b>
<b>4.3.1 Simultane Isolierung von DNA und RNA</b>	<b>77</b>
<b>4.3.2 Amplifizierungseffizienzen von simultan isolierter DNA und RNA</b>	<b>79</b>
<b>4.3.3 Sequenz-Analyse von Einzelzell-Transkripten nach cDNA-Präamplifikation</b>	<b>81</b>
<b>4.3.4 Array-Analysen weniger Zellen nach Präamplifikation der cDNA</b>	<b>81</b>
<b>4.3.5 Molekulare Charakterisierung von isolierten Patienten-Zellen und korrespondierendem solidem Tumorgewebe</b>	<b>83</b>
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>85</b>
<b>5.1 GENEXPRESSIONSANALYSEN MITTELS CDNA-ARRAYS</b>	<b>85</b>
<b>5.1.1 cDNA-Arrays</b>	<b>85</b>
<b>5.1.2 Patientenmaterial</b>	<b>86</b>
<b>5.1.3 Expressionsanalysen</b>	<b>89</b>
5.1.3.1 Paarweiser Vergleich von Tumor- und Normalgeweben	90
5.1.3.2 Clusteranalyse	90
5.1.3.3 Statistische Auswertung zur Ermittlung differentiell exprimierter Gene	94
5.1.3.4 Paarweiser Vergleich von Primärtumoren und korrespondierenden Lebermetastasen	103
<b>5.1.4 Bestätigung der differentiellen Genexpression mittels real-time PCR</b>	<b>107</b>
<b>5.1.5 Vergleich der eigenen Expressionsdaten mit Array-Analysen anderer Arbeitsgruppen</b>	<b>109</b>
<b>5.2 METHODE ZUR SIMULTANEN ISOLIERUNG VON RNA UND DNA AUS EINZELNEN / WENIGEN ZELLEN FÜR MULTIPLE MOLEKULARE ANALYSEN</b>	<b>110</b>
<b>5.3 ISOLIERUNG UND MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DISSEMINIERTER TUMORZELLEN AUS DEM KNOCHENMARK</b>	<b>111</b>
<b>5.4 AUSBLICK</b>	<b>114</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>116</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>119</b>

Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Chr.	Chromosom
d.h.	das heißt
(k) Da	(kilo-) Dalton
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
(c) DNA	( <i>complementary</i> ) Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
et al.	et alii
ETM	Eppendorf -Thermomixer
ETZ	Eppendorf-Tischzentrifuge
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
(n, µ, m) g	(nano-, micro-, milli-) Gramm
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
kHz	kilo-Hertz
(µ, m) l	(micro-, milli-) Liter
(n, µ, m) m	(nano-, micro-, milli-) Meter
M	Konzentrationsangabe: molar / in Text und Tabellen: Metastase
(µ, m) M	(micro-, milli-) molar
min	Minute
N	Normalgewebe
NaAc	Natriumacetat
nt	Nukleotid(e)
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
q	langer Arm eines Chromosoms
(m, r) RNA	( <i>messenger, ribosomale</i> ) Ribonukleinsäure
RT	Temperaturangabe: Raumtemperatur / molekulare Verfahren: reverse Transkription
S	Sedimentationskonstante in Svedberg
sec	Sekunde(n)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
T	Tumor
Tab.	Tabelle
TAE	Tris / Acetat / EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>units</i> (Einheit)
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
v.a	vor allem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

### Basen und Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
N	nicht weiter spezifiziertes Nukleotid
T	Thymin

### Histopathologische Typisierung der untersuchten Karzinome

Grading (Feststellung des Differenzierungsgrades) nach der WHO (World Health Organization)

- G1 hoher Differenzierungsgrad, hoch differenziert
- G2 mittlerer Differenzierungsgrad, mäßig differenziert
- G3 geringer Differenzierungsgrad, schlecht differenziert

Staging (Feststellung der Tumorausbreitung) nach der histopathologischen pTNM-Klassifikation (*Tumor, Node, Metastasis*) der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) und des AJCC (American Joint Committee on Cancer)

#### T Primärtumor

- T1: Tumor infiltrierte die Submucosa
- T2: Tumor infiltrierte die Muscularis propria
- T3: Tumor infiltrierte durch die Muscularis propria hindurch in die Subserosa, oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
- T4: Tumor infiltrierte direkt in andere Organe oder Strukturen und / oder perforierte das viszerale Peritoneum

#### N Regionäre Lymphknoten

- N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1: Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
- N2: Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
- N3: Metastasen in Lymphknoten entlang eines bekannten Gefäßstammes

#### M Fernmetastasen

# 1 Einleitung

## 1.1 Kolorektale Karzinome

Weltweit sind Karzinome des Kolons und des Rektums, häufig zusammengefaßt als kolorektale Karzinome, die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache (World Health Organization, 2000). Allein in Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen für Männer auf über 27.000, bei Frauen auf nahezu 30.000 geschätzt (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

Kolorektale Karzinome können sowohl sporadisch auftreten, als auch auf Grundlage familiärer Belastung entstehen oder genetisch bedingt sein.

Von einer genetischen Prädisposition sind ca. 5 % der Patienten betroffen. Sie entwickeln ein kolorektales Karzinom im Rahmen eines der hoch penetranten familiären Krebs syndrome FAP (*familial adenomatous polyposis*) oder HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*) (Fearon and Gruber, 2001). Die FAP ist eine autosomal vererbte Erkrankung, die mit einer Inzidenz von ca. 1 unter 8000 Personen auftritt und für 0,5 – 1 % der kolorektalen Karzinome verantwortlich ist. Die Patienten entwickeln im jungen Erwachsenenalter hunderte bis tausende Adenome im Darm und haben unbehandelt ein nahezu 100 %iges Risiko für ein Karzinom (Bisgaard et al., 1994). Mutationen im 1991 identifizierten Gen *APC* sind die genetische Grundlage der FAP (Grodin et al., 1991). HNPCC dagegen gehört zu den ersten beschriebenen familiären Krebs syndromen (Warthin, 1913) und ist schätzungsweise für 3 - 5 % der kolorektalen Karzinome verantwortlich (Boland et al., 1998). Bei dieser Veranlagung besteht ein ca. 80 %iges Risiko für ein kolorektales Karzinom, das ohne ausgeprägte Polyposis meist im mittleren Erwachsenenalter auftritt. Als genetische Grundlage gilt ein defektes DNA-Mismatch-Reparatursystem aufgrund der Inaktivierung eines der *mismatch repair* Gene, von denen bisher sechs verschiedene beim Menschen bekannt sind (Fishel et al., 2001). Der Reparaturdefekt führt zur Anhäufung einzelner Basenfehlpaarungen (*mismatches*) im Genom der betroffenen Zellen und ist in den HNPCC-Tumoren durch eine Instabilität repetitiver DNA-Sequenzen (Mikrosatelliteninstabilität) nachweisbar (Liu et al., 1996).

Sowohl bei FAP- als auch bei HNPCC-Patienten sind die beschriebenen Defekte jeweils als Keimbahnmutation in einem Allel enthalten (*first hit*). Der *two hit*-Hypothese nach Knudson folgend stellt erst die somatische Inaktivierung des verbleibenden Wildtyp-Allels (*second hit*) die Grundlage für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms dar (Knudson, 1971).



Die meisten kolorektalen Karzinome werden allerdings als „sporadisch“ bezeichnet, da bisher keine weiteren vererbten Komponenten identifiziert werden konnten (Fearon and Gruber, 2001). Aufgrund familiärer Häufung dieser Tumorerkrankung wird eine mögliche Prädisposition aber bei weiteren ca. 15 % der Patienten diskutiert (Boardman et al., 2001).

### **Molekulare Ursachen der Initiation und Progression kolorektaler Karzinome**

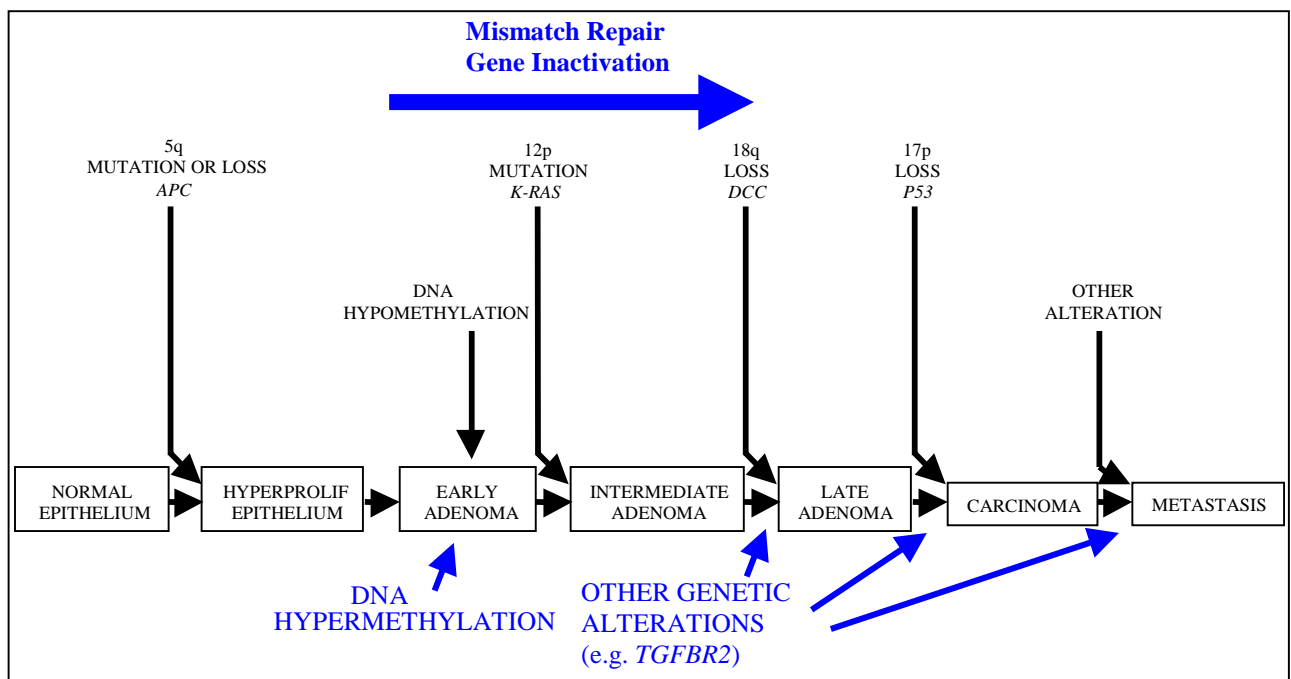
Die meisten kolorektalen Karzinome sind Adenokarzinome und entstehen aus dem einschichtigen Epithel, welches das Darmlumen auskleidet. Klinische und histopathologische Beobachtungen legen nahe, daß sich die Karzinome in der Regel auf dem Boden gutartiger Adenome entwickeln (Fearon and Gruber, 2001). Auch bei Patienten ohne familiäre Prädisposition lassen sich mit großer Häufigkeit schon in kleinsten Adenomen *APC*-Mutationen nachweisen (Powell 1992). Naheliegend ist daher, daß dieser genetische Defekt nicht nur Grundlage für die Entstehung der FAP-Tumoren ist, sondern auch das primäre Ereignis bei der Initiation spontaner kolorektaler Tumoren darstellt (Lamlum et al., 2000).

Durch genetische Studien konnten Mutationen und Deletionen in weiteren Genen identifiziert werden, die jeweils mit bestimmter Inzidenz an den verschiedenen Stadien der kolorektalen Tumorentwicklung auftreten. Basierend auf diesen Erkenntnissen formulierte die Gruppe um Bert Vogelstein das Konzept einer genetischen Multistep-Karzinogenese parallel zur makroskopischen und histopathologischen Adenom-Karzinom-Sequenz und machte das kolorektale Karzinom zum Modell der molekularen Krebsentstehung (Fearon and Vogelstein, 1990; Abb. 1).

Das „Vogelstein“-Modell ist in den letzten Jahren um eine Reihe weiterer genetischer (Instabilität) und epigenetischer Veränderungen (Methylierung) in den Tumoren erweitert worden.

Eine genetische Instabilität kann in den meisten kolorektalen Karzinomen nachgewiesen werden und tritt in zwei verschiedenen Formen auf, die als Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) und chromosomale Instabilität (CIN) bezeichnet werden. Der MSI-Phänotyp ist charakterisiert durch einen erhöhten Anstieg von Substitutionen, Deletionen und Insertionen einzelner Basen besonders in repetitiven DNA-Sequenzen, den sog. Mikrosatelliten, und wird bei den meisten kolorektalen Karzinomen von HNPCC-Patienten sowie in ca. 15 % der sporadischen Karzinome nachgewiesen (Aaltonen et al., 1994; Liu et al., 1996; Aaltonen et al., 1993). Eine Inaktivierung von *mismatch repair*-Proteinen ist die molekulare Ursache dafür, daß Basenfehlpaarungen während der DNA-Replikation nicht vollständig ausgebessert

werden können. Bedeutsam für die Tumorprogression ist, daß die Instabilität auch repetitive Sequenzen in tumorrelevanten Genen betrifft, die dadurch inaktiviert werden, z.B. *TGFBR2* (*transforming growth factor beta receptor II*), *IGF2R* (*insulin-like growth factor 2*) und *BAX* (*BCL2-associated X protein*) (Markowitz et al., 1995; Souza et al., 1996; Rampino et al., 1997). Aufgrund der Beobachtung, daß in MSI-Tumoren die Inaktivierung von *APC* hauptsächlich über MSI-typische Mutationen verläuft (Insertionen oder Deletionen einzelner Basen in repetitiven Sequenzen), wurde sogar eine kausale Ursache dieser Instabilität bei der Entstehung kolorektaler Mikrosatelliten-instabiler Tumoren postuliert (Huang et al., 1996).



**Abb. 1:** Genetisches Modell für die kolorektale Karzinogenese (modifiziert nach Fearon and Vogelstein, 1990). Eine Serie von Mutationen, die zur Aktivierung von Onkogenen (*K-RAS* auf Chr. 12p) bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen (*APC* auf Chr. 5q, *DCC* auf Chr. 18q und *P53* auf Chr. 17p), sowie ein verändertes Methylierungsmuster der DNA sind für die Progression kolorektaler Tumoren verantwortlich.

Im Gegensatz zu MSI zeigt der CIN-Phänotyp, der in den meisten kolorektalen Karzinomen (85%) nachgewiesen werden kann, grobe allelische Imbalancen durch den Verlust oder Gewinn definierter chromosomaler Regionen bzw. ganzer Chromosomen. Die molekularen Ursachen der chromosomalen Instabilität sind bisher nicht genau geklärt. Diskutiert werden defekte Zellzyklus-Kontrollpunkte (*spindel checkpoint* und *DNA-damage checkpoint*) und Fehler in der Chromosomensegregation während der Mitose, z.B. aufgrund einer abnormalen Zahl an Centrosomen (Lengauer, 1998). Gene, die bei kolorektalen Karzinomen in diesen

Prozessen involviert scheinen, sind z.B. *BUB1* und *BUB1B* (*budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog / beta*) bzw. *STK15* (serine/threonine kinase 15; aurora2) (Cahill et al., 1998; Shichiri et al., 2002; Bischoff et al., 1998; Zhou et al., 1998). Auch mutierte *APC*-Gene wurden kürzlich im Zusammenhang mit der Entwicklung einer chromosomalen Instabilität beschrieben (Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001).

Ein weiterer Mechanismus für die Inaktivierung von Genen ist eine lokale Hypermethylierung von 5´CpG-Inseln innerhalb von Promotoren krebsrelevanter Gene, die zu deren transkriptionaler Repression führt (Baylin et al., 1998). Unter der Vielzahl hypermethylierter Gene in kolorektalen Karzinomen befinden sich bekannte Tumorsuppressorgene wie *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; p16) und das *mismatch repair*-Gen *MLH1* (Jubb et al., 2001; Ahuja et al., 1997; Cunningham et al., 2001).

Eine parallel auftretende starke globale Hypomethylierung im Genom von Krebszellen wird als Mechanismus bei der Entstehung der chromosomalen Instabilität, der Reaktivierung intragenomischer Transposons und einer Aktivierung von Genen, die als *imprinted genes* normalerweise transkriptionell nicht aktiv sind, diskutiert (Esteller et al., 2002).

## 1.2 Analyse der Genexpression maligner Tumoren

Eine direkte Folge genetischer und epigenetischer Alterationen in Tumoren ist die Veränderung der Genexpression im Vergleich zum normalen Ursprungsgewebe. Obwohl die Transkription von Genen oft nicht direkt mit der tatsächlichen Proteinmenge und Proteinaktivität assoziiert ist, sind Expressionsprofile auf RNA-Ebene charakteristisch für einen definierten molekularen Phänotyp von Zellen oder Geweben. Genexpressionsanalysen haben sich daher als wichtige Methode in verschiedensten Bereichen der Krebsforschung etabliert. Ein allgemeiner Trend geht dabei von klassischen Analysen, wie z.B. Northern Blots, bei denen jeweils die Expression eines definierten Gens überprüft wird, hin zu Untersuchungen komplexer Expressionsmuster einer Vielzahl von Genen parallel.

Unter den Techniken, die in den letzten Jahren entwickelt wurden, konnten z. B. die *subtractive hybridization* (Zimmermann, 1980), *representational difference analysis* (Hubank et al., 1994), *differential display* (Liang, 1992) mit zahlreichen Varianten inklusive der *RNA arbitrarily primed PCR* (Welsh et al., 1992) sowie *serial analysis of gene expression* (Velculescu, 1995) in einzelnen Studien erfolgreich für Expressionsanalysen bei kolorektalen Karzinomen eingesetzt werden (Schweinfest et al., 1990; Scherl-Mostageer et al., 2001;

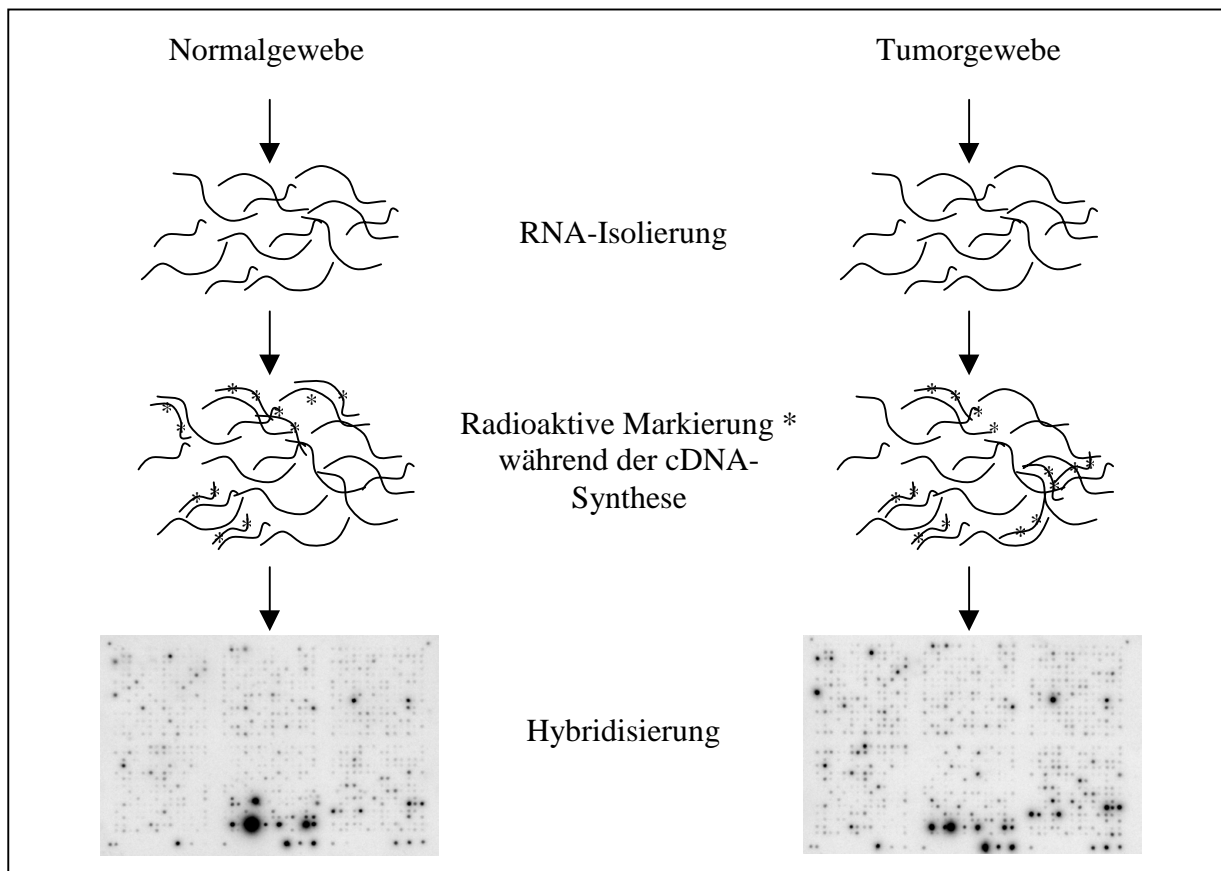
Tortola et al., 1999; Tortola et al., 1998; Zhang et al., 1997). Allerdings sind diese Methoden insgesamt technisch sehr komplex, zeitaufwendig und erfordern meist große Mengen an mRNA. Ein großer Fortschritt war daher die Entwicklung der Array-Technologie, die eine Expressions-Analyse tausender Gene gleichzeitig in einem einzigen Experiment erlaubt und ebenfalls schon an kolorektalen Tumoren durchgeführt wurde (z. B. Alon 1999; Notterman et al., 2001).

### 1.2.1 Array-Technologie zur Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene

Die Array-Technologie wird mittlerweile in den verschiedensten Bereichen der molekularen Forschung eingesetzt. Neben Genexpressionsanalysen auf RNA-Ebene können auch Proteine mittels Arrays quantifiziert werden (Protein-Arrays) bzw. Mutationen in der DNA nachgewiesen werden (DNA-Arrays). Während sich die Protein- und DNA-Arrays noch in einem Entwicklungsstadium befinden, wurden bereits zahlreiche Anwendungen der Array-Technologie für Genexpressionsanalysen auf RNA-Ebene beschrieben. Diese erstrecken sich von der Überprüfung molekularer Wirkungsmechanismen von Medikamenten und giftigen Substanzen in den Bereichen *Pharmacogenomics* (Hughes et al., 2000) und *Toxicogenomics* (Nuwaysir et al., 1999) über die Untersuchung kompletter Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae* (DeRisi et al., 1997) bis hin zu Analysen in der molekularen Pathologie.

Grundsätzlich unterscheidet man bei Arrays, die für Genexpressionsanalysen verwendet werden, zwischen cDNA- und Oligonukleotid-Arrays. Die Herstellung von cDNA-Arrays erfolgt durch die exakte Auftragung („spotten“) und anschließende Immobilisierung von PCR-amplifizierten cDNA-Fragmenten (Größe zwischen 500 und 5000 Basenpaaren) auf Glasobjektträger oder Nylonmembranen. Oligonukleotid-Arrays werden entweder nach ähnlichem Verfahren aus 20 – 80 bp langen, herkömmlich synthetisierten Gen-Fragmenten hergestellt oder bestehen aus direkt auf einer Glasoberfläche photolithographisch synthetisierten, ca. 20 bp langen Sequenzen (*GeneChips*, patentiert von der Firma Affymetrix Inc.; Lipshutz et al., 1999). Die Begriffe Makro-Array und Mikro-Array beziehen sich lediglich auf die Größe der Spots. Makro-Arrays enthalten Spots mit einem Durchmesser von mehr als 300 µm, während die Spots auf Mikro-Arrays kleiner als 200 µm sind und daher komplizierte bildverarbeitende Systeme zur Auswertung erfordern. Eine Hybridisierung der Proben (*probes*) auf den Arrays mit den Zielmolekülen (*targets*) im Untersuchungsmaterial erfolgt entweder nach radioaktiver oder Fluoreszenz-Markierung der zu quantifizierenden

Transkripte während der cDNA-Synthese (Abb. 2; Nomenklatur empfohlen von B. Phimister, 1999).



**Abb. 2:** Prinzip der Analyse differenzieller Genexpression von Normal- und Tumorgewebe mit radioaktiven *targets* auf cDNA-Makroarrays (Nylonmembranen). Jeder Spot repräsentiert ein Gen. Nach der radioaktiven Markierung der Transkripte aus Normal- und Tumorgewebe erfolgt eine separate Hybridisierung auf zwei identische Arrays. Die Identifizierung differenziell exprimierter Gene ist durch den Vergleich der Signalintensitäten an den einzelnen Spots möglich.

In der Krebsforschung wird die Array-Technologie für Genexpressionsanalysen zur Aufklärung molekularer Mechanismen bei der Initiation und Progression maligner Tumoren, der Identifizierung diagnostik- und therapierelevanter Moleküle sowie einer molekularen Charakterisierung und Klassifizierung verschiedener Tumortypen verwendet. Die Arrays dienen dabei zur Aufklärung biochemischer Signaltransduktionswege krebsrelevanter Moleküle wie z.B. *P53* und *MYC* (Zhao et al., 2000; Coller et al., 2000) und für die Erstellung von Expressionsprofilen an Patientenmaterial.

### 1.2.2. Molekulare Klassifizierung von Tumoren auf Transkriptionsebene (Clusteranalyse)

Die Klassifizierung von Tumoren basiert bisher primär auf ihrem morphologischen Erscheinungsbild und der makroskopischen sowie mikroskopischen Histologie. Allerdings können maligne Erkrankungen auch bei ähnlichem histopathologischen Erscheinungsbild unterschiedliche klinische Verläufe zeigen (Golub et al., 1999). Genaktivitäten, die das biologische Verhalten eines Tumors bestimmen, reflektieren seine Aggressivität möglicherweise genauer als Standard-Parameter wie z.B. die Tumorgroße und das Alter des Patienten (Van't Veer et al., 2002). Daher könnte die Identifizierung pathogenetisch unterschiedlicher Tumortypen vor allem im Hinblick auf eine individuelle Risikoabschätzung und die Entwicklung spezifischer therapeutischer Maßnahmen sehr hilfreich sein.

Todd Golub und Mitarbeiter waren 1999 die Ersten, die verschiedene Krebserkrankungen, die akute lymphatische Leukämie (ALL) und die akute myeloische Leukämie (AML) anhand ihrer Expressionsprofile voneinander unterscheiden konnten (Golub et al., 1999). Obwohl eine Differenzierung der beiden Leukämien durch eine histopathologische Beurteilung möglich ist, waren die Ergebnisse ein erster Hinweis auf das Potential der Array-Technik bei der Klassifizierung maligner Erkrankungen. Es folgte die Veröffentlichung einer Arbeitsgruppe um Patrik O. Brown und David Botstein, denen mit einem „Lymphochip“ die Subklassifizierung des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*) in zwei prognostisch verschiedene Gruppen gelang (Alizadeh et al., 2000). Mittlerweile konnte ein aktivierter NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg in der prognostisch ungünstigeren Subgruppe als möglicher Resistenzmechanismus gegenüber der herkömmlichen Chemotherapie identifiziert werden (Davis et al., 2001) und wird dementsprechend als Angriffspunkt zur Bekämpfung dieser Erkrankung diskutiert (Brooksbank et al., 2002).

Die große Herausforderung bei allen Array-Genexpressionsanalysen ist die systematische Analyse riesiger Datenmengen. Neben statistischen Auswertungen zur Identifizierung signifikant unterschiedlich exprimierter Gene zwischen primär definierten Gruppen kommen vor allem Clusteranalysen zur Organisation der Expressionsdaten zum Einsatz (Eisen et al., 1998). Clusteranalysen stellen eine Möglichkeit zur Auswertung von Arrays dar, mit der die Expressionsprofile vieler Gewebeproben parallel in einer einzigen Analyse verglichen werden können. Die verschiedenen Gewebeproben werden dabei unter definierten mathematischen Kriterien nach der Ähnlichkeit ihrer Expressionsprofile gruppiert und in einem stammbaumähnlichen Dendrogramm angeordnet, wobei der Grad der Übereinstimmung durch

die Astlänge des Dendrogrammes veranschaulicht wird. Die Clusteranalysen können über die Gruppierung der Gewebeproben daher zur Definition von Tumor-Subgruppen führen. Mit Hilfe dieser Methode gelang sowohl die Identifizierung der Subtypen bei der DLBCL als auch die Subklassifizierung von soliden Tumoren der Haut (Bittner et al., 2000), Lunge (Garber et al., 2001; Bhattacharjee et al., 2001) und Brust (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001). In einzelnen Studien wurde nach Überprüfung der individuellen klinischen Krankheitsverläufe dabei eine Korrelation zwischen bestimmten Tumor-Subgruppen und der Prognose von Patienten beobachtet (Garber et al., 2001; Bhattacharjee et al., 2001; Sorlie et al., 2001).

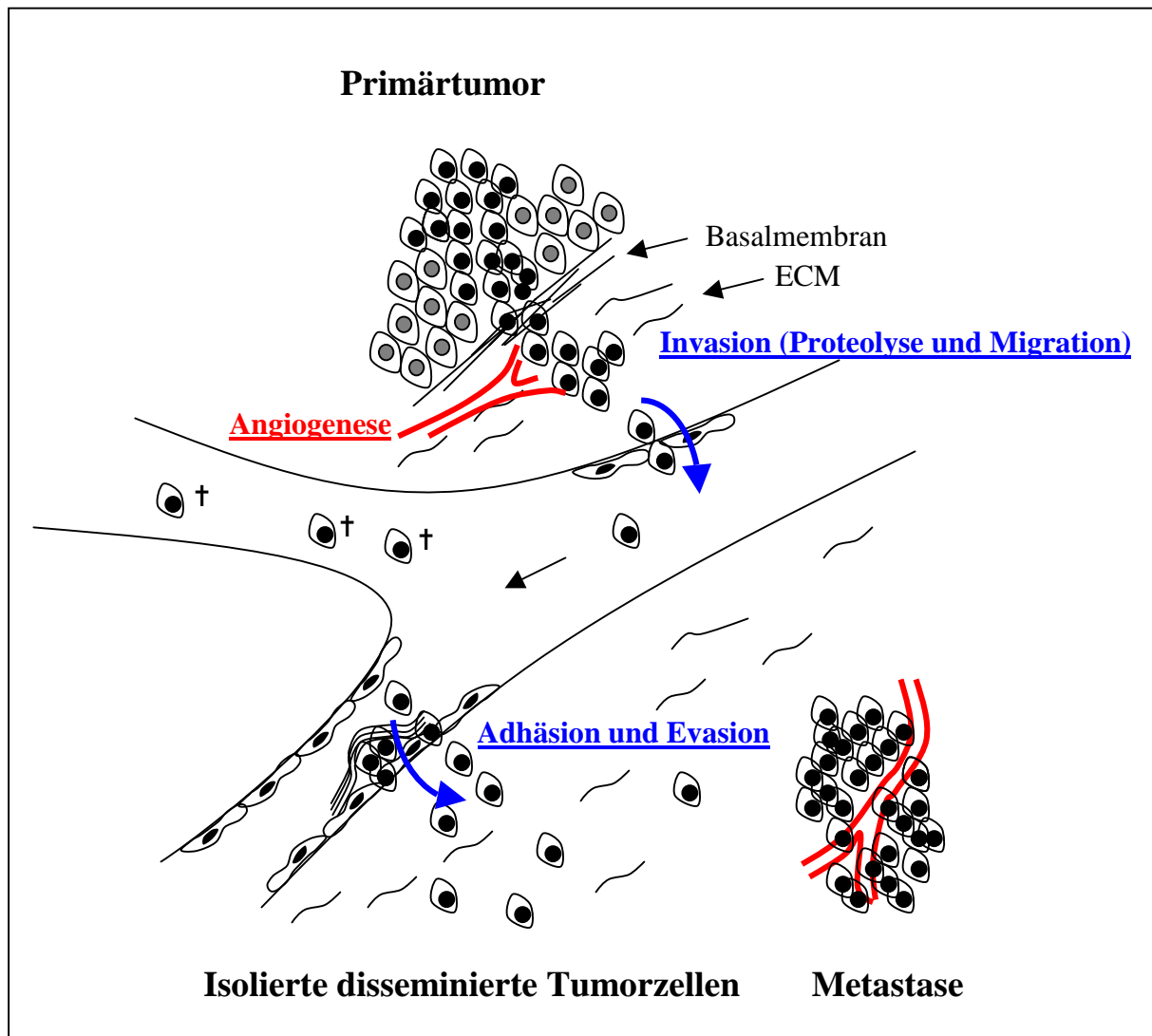
In ersten Arbeiten, in denen die Genexpression kolorektaler Tumoren mit der Array-Technik untersucht wurde, konnte mittels Clusteranalysen erfolgreich zwischen Adenomen, Karzinomen und normaler Darmschleimhaut unterschieden werden (Alon et al., 1999; Notterman et al., 2001). Dabei konnten auch Gene identifiziert werden, die zwischen den Geweben differentiell exprimiert waren. Die Genexpression von Metastasen kolorektaler Karzinome wurde bisher allerdings nicht systematisch in Clusteranalysen untersucht.

### **1.3 Metastasierung**

Der Begriff Metastasierung bezeichnet die Absiedelung von Tumorzellen aus dem Primärtumor, die zur Bildung einer soliden Tumormasse (Metastase) in Sekundärorganen führt. Der Transport der Tumorzellen erfolgt dabei in der Regel über Blut- und / oder Lymphgefäße. Tumorzellen, die einzeln im Körper detektiert werden, müssen nicht zwingend das Potential zur Bildung von Metastasen besitzen. Es wird daher empfohlen, bei diesen Zellen nicht von Mikrometastasen (Sloane et al., 1980), sondern von „isolierten disseminierten Tumorzellen“ zu sprechen (Muller et al., 2000).

#### **Progression und Metastasierung maligner Tumoren**

Die Progression maligner Tumoren kann als Multistep-Prozeß beschrieben werden, der auch zahlreiche Wechselwirkungen zwischen Tumor- und Fremdgewebe umfaßt (Mareel et al., 1996; Liotta et al., 1997; Fidler et al., 2000; Liotta et al., 2002). Dabei kommt es zunächst zu einer Invasion maligner Tumorzellen in Fremdgewebe, anschließend kann eine Metastasierung der Tumorzellen in weitere Organe erfolgen. Die Mechanismen, die bekanntermaßen für die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen verantwortlich sind, werden im folgenden Abschnitt gemeinsam vorgestellt.



**Abb. 3:** Übersicht über die Metastasierung von Tumorzellen aus Karzinomen (modifiziert nach Pantel et al., 1999). Erklärung im Text.

Bei der Transition eines epithelialen Tumors zum invasiven Karzinom lösen sich die Tumorzellen aus der geordneten Gewebestruktur, durchbrechen die Basalmembran und dringen in das interstitielle Stroma ein (Invasion). Eine erste Voraussetzung für diesen Prozeß ist eine Dysregulation von Signaltransduktionswegen, die über Zell-Kontakte gesteuert werden, da der Verlust der Adhäsion an die Basalmembran bei epithelialen Zellen normalerweise zur Apoptose führt („Anoikis“; Frisch et al., 1994). Die Invasion ist ein aktiver, dynamischer Prozeß und umfaßt eine lokale Proteolyse sowie die gerichtete Migration der Tumorzellen. Mehrere verschiedene Protease-Familien (Matrixmetalloproteinasen, Serinproteasen, Cysteinproteasen) sind bei der proteolytischen Degradation von Basalmembrankomponenten und der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt.



Die Richtung, in der sich die Tumorzellen bewegen, wird dabei durch eine Vielzahl chemischer Lockstoffe kontrolliert, die neben Komponenten und proteolytischen Fragmenten der ECM auch parakrin sezernierte Zytokine, Wachstumsfaktoren und autokrine Migrationssignale umfaßt. Die Induktion einer Neovaskularisation (Angiogenese) ist die Voraussetzung für ein weiteres Wachstum des Tumors im fremden Gewebe. Signale, die von den Tumorzellen abgegeben werden, stimulieren Stroma- und Endothelzellen zur Proliferation und Bildung von Gefäßen, die in das neoplastische Gewebe eindringen. Allerdings besitzen die tumorinduzierten Gefäße oft keine intakte Basalmembran und ermöglichen den Tumorzellen einen relativ einfachen Zugang zum Körperkreislauf des Patienten. Tatsächlich lösen sich pro Tag über Lymph- oder Blutgefäße viele Zellen vom Primärtumor ab, von denen allerdings nur wenige die Bildung von Metastasen induzieren können. Bei der hämatogenen Metastasierung müssen die Tumorzellen zunächst die mechanische Belastung im Blutkreislauf überstehen und dann entweder als Tumoremboli und / oder über spezifische Adhäsionsmechanismen Kontakt zum Kapillarendothel aufnehmen, um aus dem Blutkreislauf in ein fremdes Gewebe einwandern zu können (Evasion). Während der lymphogenen Metastasierung müssen die Tumorzellen Lymphknoten passieren, in denen abhängig von den immunogenen Eigenschaften des Tumors eine Immunabwehr stattfinden kann (Pardoll et al., 2001). Die Bildung einer soliden Metastase im Lymphknoten oder anderen Sekundärorganen erfolgt wiederum abhängig von autokrinen, parakrinen und endokrinen Signalen im Organmilieu und nach Induktion der Angiogenese.

Bei der hämatogenen Metastasierung werden je nach Tumor bestimmte Organe bevorzugt von Metastasen befallen. Patienten mit kolorektalen Karzinomen entwickeln häufig Metastasen in der Leber, wobei die Inzidenz bei Kolonkarzinomen 75,5 % und bei rektalen Karzinomen 61,9 % beträgt (Fenoglio-Preiser et al., 1999).

Da vor allem für Kolonkarzinome die Leber das erste Organ ist, dessen Kapillarbett die Tumorzellen bei der hämatogenen Verbreitung passieren müssen, werden zumindest teilweise mechanische Vorgänge bei der Lebermetastasierung dieser Tumoren vermutet. Allerdings kann generell der Organtropismus von Metastasen nicht allein durch anatomische Gegebenheiten erklärt werden. Diese Tatsache veranlaßte vor mehr als 100 Jahren Stephen Paget zur Formulierung einer Hypothese, die als *seed and soil*-Hypothese bekannt wurde: „*When a plant goes to seed, its seeds are carried in all directions, but they can only live and grow if they fall on congenial soil*“ (Paget, 1889).

Molekulare Mechanismen, die in diesem Zusammenhang diskutiert werden, umfassen vor allem drei verschiedene Theorien: 1.) Die Tumorzellen infiltrieren alle Organe im gleichen Ausmaß, können sich aber nur in der Anwesenheit bestimmter Wachstumsfaktoren vermehren. 2.) Endothelzellen in den Zielorganen exprimieren Adhäsionsmoleküle, an die zirkulierende Tumorzellen binden können. 3.) Chemische Lockstoffe (*chemoattractants*) stimulieren die Tumorzellen zum Austritt aus dem Blutstrom und zur Migration in Sekundärorgane (Liotta et al., 2001 [1]).

Da Metastasen heutzutage für die meisten Todesfälle von Tumorpatienten verantwortlich sind, besitzt die Aufklärung molekularer Grundlagen der Metastasierung eine besondere Bedeutung. Bei kolorektalen Karzinomen ist bisher allerdings nur wenig über spezifische, genetische Veränderungen in metastasierenden Tumorzellen bekannt. Durch Genexpressionsanalysen wurde erst kürzlich das erste Gen (*PRL-3*) gefunden, das beim Vergleich mit Primärtumoren offensichtlich eine konsistente Überexpression in Lebermetastasen aufweist (Saha et al., 2001).

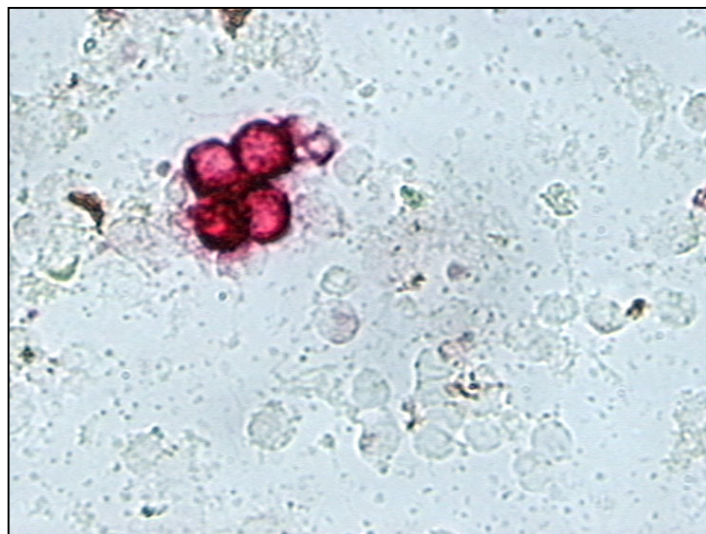
#### **1.4 Bedeutung isolierter disseminierter Tumorzellen**

Aufgrund der Fortschritte in den operativen Behandlungsstrategien ist die Letalität bei soliden Tumorerkrankungen vermutlich zunehmend auf eine frühe Disseminierung von Tumorzellen im Körper zurückzuführen. Bei Patienten mit frühen Tumorstadien ohne klinisch manifeste Metastasen wird eine generalisierte Tumorzellverbreitung zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors oft nicht erfaßt, da in der konventionellen Histopathologie einzelne disseminierte Tumorzellen kaum nachweisbar sind. Ob den Patienten eine Chemotherapie empfohlen wird, um nach der Operation im Körper verbliebene Tumorzellen zu eliminieren, beruht daher nicht auf einer individuellen Risikoabschätzung sondern auf statistischen Prognosen, abgeleitet aus traditionellen *staging* Parametern des Tumors wie Größe und Lymphknotenstatus (Schmoll et al., 1999). In den vergangenen Jahren wurde daher intensiv daran geforscht, mit immunzytochemischen und molekularbiologischen Verfahren disseminierte Tumorzellen in Blut, Knochenmark und Lymphknoten von Tumorpatienten nachzuweisen und deren prognostische Bedeutung zu erfassen. Besonders bei Patienten mit frühen Tumorstadien könnte die Identifizierung okkult Metastasierung einen substantiellen Einfluß auf die Prognose und die Therapie haben. In späteren Tumorstadien könnten im

Rahmen eines Therapie-Monitoring die zahlenmäßige Veränderung restlicher Krebszellen im Körper überwacht und Therapien entsprechend adaptiert werden (Pantel et al., 1999).

Besonders Blut und Knochenmark eignen sich zum Nachweis disseminierter Tumorzellen, da für die Gewinnung des Untersuchungsmaterials kein operativer Eingriff notwendig ist. Allerdings ist bekannt, daß die meisten Tumorzellen bei der Passage durch den Blutkreislauf wieder zugrunde gehen. Daher scheint der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark, einem Ort intensiven Austauschs zwischen Blut und dem mesenchymalen Interstitium, höhere Aussagekraft zu besitzen (Pantel et al., 1999). Die Entnahme von Knochenmarksaspirat aus den vorderen Beckenkämmen, kann vor allem im Rahmen der Operation eines Primärtumors ohne großen Aufwand durchgeführt werden.

Zum Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Mit der immunzytochemischen Detektion disseminierter epithelialer Tumorzellen im Knochenmark wurde Anfang der 80er Jahre am *Ludwig Institute for Cancer Research* und dem *Royal Marsden Hospital* (Sutton) begonnen (Sloane et al., 1980; Dearnaley et al., 1981). Die Methode beruht darauf, epitheliale Tumorzellen durch den Nachweis epithelialer Proteine von den normalen hämatopoetischen Knochenmarkszellen zu unterscheiden. Vor allem Zytokeratine, die in normalen und malignen Zellen einschichtiger Epithelien exprimiert werden (Moll et al., 1982), erwiesen sich in vielen Studien als spezifische Zielmoleküle zum Nachweis epithelialer Tumorzellen im Knochenmark (Schlimok et al., 1990; Pantel et al., 1993 [1]; Pantel et al., 1994; Pantel et al., 1996).



**Abb. 4:** Cluster aus vier potentiellen Tumorzellen: durch immunzytochemische Markierung mit dem Antikörper CK2 gegen das epitheliale Zytokeratin 18 (Schlimok et al., 1987) und nachfolgender standardisierter APAAP-Färbemethode lassen sich epitheliale Zellen (rot) in Knochenmarksaspiraten von normalen hämatopoetischen Zellen (ungefärbt) unterscheiden.

Die Detektion disseminierter epithelialer Tumorzellen kann auf molekularer Ebene durch den Nachweis von mRNA-Transkripten epithelialer bzw. tumorspezifischer Gene oder über tumorspezifische Mutationen in der DNA erfolgen. Die Identifizierung von Transkripten aus Tumorzellen in Blut und Knochenmark wurde zwar in vielen Studien beschrieben, bei genauerer Untersuchung erwies sich jedoch die Spezifität der meisten Marker als gering und stark abhängig von der technischen Durchführung (Pantel et al., 2000). Der Nachweis von Tumorzellen auf DNA-Ebene ist bei soliden Tumoren arbeitsaufwendig, weil zunächst die individuellen genomischen Veränderungen im Primärtumors bestimmt werden müssen.

Erstaunlich ist die Tatsache, daß disseminierte Tumorzellen im Knochenmark sowohl bei Karzinomen gefunden werden, die bevorzugt ins Skelett metastasieren (Mammakarzinom, Coleman et al., 1987), als auch bei Karzinomen, deren Inzidenz für klinisch manifeste Knochenmetastasen vergleichsweise gering ist, z.B. bei kolorektalen Karzinomen (Fenoglio-Preiser et al., 1999). Die Fähigkeit der Mammakarzinomzellen zur Proliferation basiert dabei vermutlich gemäß der *seed and soil*-Hypothese auf spezifischen Wachstums- und Überlebensvorteilen dieser Zellen im Organmilieu des Knochenmarks (Paget, 1889). Die Tatsache, daß in mehreren Studien allerdings auch bei kolorektalen Karzinomen eine Korrelation zwischen einem positiven Knochenmarksbefund und dem Krankheitsverlauf nachgewiesen werden konnte (Schlimok et al., 1990; Lindemann et al., 1992; Leinung et al., 2000), wurde durch verschiedene Hypothesen erklärt. Einerseits könnten disseminierte Zellen im Knochenmark einen Hinweis auf eine generalisierte Tumorzellverbreitung darstellen, andererseits ist das Knochenmark möglicherweise ein Reservoir für Tumorzellen, aus dem diese später wieder in den Organismus gelangen und die Bildung von Metastasen in anderen Organen initiieren können (Putz et al., 1999).

Um das Potential disseminierter Zellen aufzuklären, wurde in den letzten Jahren mit einer genaueren biologischen Charakterisierung dieser Zellen begonnen. Mittels immunzytochemischer Doppelfärbungen ergaben sich trotz einer gewissen Heterogenität der Zellen zahlreiche Hinweise auf Tumorzell-assoziierte Eigenschaften wie eine verminderte Expression von MHC Klasse I - Molekülen sowie die Überexpression von ERBB2 (*avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*) und dem Plasminogenaktivator uPA (Pantel et al., 1991; Pantel et al., 1993 [2]; Heiss et al., 1995). Darüberhinaus konnten auf DNA-Ebene Tumorzell-spezifische chromosomale Aberrationen und Mutationen festgestellt werden (Klein et al., 1999; Dietmaier et al., 1999). Interessant ist auch die Feststellung, daß

die Zellen nicht notwendigerweise Mutationen im *P53*-Gen besitzen müssen, um die Fähigkeit zur frühen hämatogenen Disseminierung im Körper zu erlangen, obwohl mutiertes *P53* generell als wichtiger Faktor für die Tumorprogression gilt (Offner et al., 1999). Weiterhin konnte immunzytochemisch nachgewiesen werden, daß viele disseminierte Zellen zum Zeitpunkt der Operation des Primärtumors keine Expression der Proliferationsmarker P120 und Ki-67 zeigen und sich daher offensichtlich in einem ruhenden Zustand (*dormant state*) befinden (Pantel et al., 1993 [1]; Pantel et al., 1993 [2]).

Für den Verlauf maligner Tumorerkrankungen ist die Disseminierung von Tumorzellen im Körper von zentraler Bedeutung, da dieser Prozeß die Grundlage einer systemischen Tumorerkrankung darstellt. Trotz der oben genannten Ansätze zur Charakterisierung disseminierter Zellen sind die biologischen Eigenschaften, die über das individuelle metastatische Potential einzelner Tumorzellen entscheiden, aufgrund methodischer Schwierigkeiten bei der Detektion und Isolierung einzelner Tumorzellen aus dem Organismus und der molekularen Analyse von Einzelzellen bisher kaum erforscht.

## 1.5 Zielsetzung

Das Verständnis der molekularen Vorgänge bei der Krebsentstehung und Metastasierung ist wesentlich für die Entwicklung neuer spezifischer Therapien. Ein Ziel der Krebsforschung ist daher, das Potential und die Eigenschaften maligner Tumoren individuell zu charakterisieren, um in Zukunft exakte prognostische Aussagen über den Krankheitsverlauf zu ermöglichen, bzw. gezielt Moleküle für einen therapeutischen Angriff zu definieren.

Ein Ansatz zur Untersuchung der komplexen zellulären Vorgänge während der Tumorprogression ist die Analyse der Genexpression, da abnormal exprimierte Gene potentiell tumorrelevant sind und daher Zielmoleküle für klinische Anwendungen darstellen können.

Ziele der Arbeit waren daher:

- (1) Der Vergleich von Genexpressionsprofilen kolorektaler Adenokarzinome und korrespondierender normaler Darmschleimhaut zur Identifizierung progressionsassoziiierter Veränderungen auf RNA-Ebene in den Tumoren.
- (2) Die vergleichende Analyse der Genexpression solider Metastasen kolorektaler Karzinome mit Primärtumoren zur Detektion potentiell metastasierungsrelevanter Gene.
- (3) Die Detektion und Isolierung vitaler Tumorzellen aus dem Knochenmark von Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen für eine folgende molekulare Charakterisierung der einzelnen Zellen insbesondere im Hinblick auf Ergebnisse aus den Array-Expressionsanalysen.
- (4) Die Etablierung methodischer Voraussetzungen für die Analyse von Einzelzellen auf DNA- und RNA-Ebene

## 2 Material

### 2.1 Patientenmaterial

Tab.1

Patienten	Geburts-Datum	Eingangs-Datum	Lokalisation	pT	N	G
Pat.03 T	09.06.37	02.03.00	Rektum	1	0 (0/14)	2
Pat.05 T	08.09.32	14.03.00	Rektum	1	1 (1/17)	2
Pat.29 T	01.09.25	09.02.01	Colon	2	0 (0/15)	2
Pat.26 T	17.03.26	18.01.01	Rektum	2	0 (0/21)	2
Pat.04 T	19.10.46	06.03.00	Rektum	2	0 (0/16)	2
Pat.24 T	02.12.42	19.12.00	Sigma	2	1 (2/18)	2
Pat.06 T	18.12.38	17.03.00	Rektum	3	0 (0/16)	2
Pat.06 M1	18.12.38	17.03.00				
Pat.06 M2	18.12.38	11.07.00				
Pat.30 T	22.04.45	12.02.01	Sigma	3	0 (0/15)	3
Pat.22 T	12.11.30	27.11.00	Coecum	3	0 (0/20)	2
Pat.25 T	16.10.28	15.01.01	Colon	3	0 (0/21)	3
Pat.27 T	13.06.23	22.01.01	Coecum	3	0 (0/25)	3
Pat.13 T	14.11.24	10.07.00	Colon ascendens	3	0 (0/35)	2
Pat.28 T	20.11.55	07.02.01	Rektum	3	1 (3/16)	3
Pat.28 M	20.11.55	26.03.01				
Pat.18 T	12.01.39	06.09.00	Rektum	3	2 (4/25)	2
Pat.16 T	23.04.41	08.08.00	Colon transversum	3	2 (5/31)	3
Pat.08 T	16.05.72	14.04.00	Rektum	3	2 (4/20)	2
Pat.08 M	16.05.72	10.05.00				
Pat.12 T	24.03.41	13.06.00	Rektum	3	2 (21/21)	2
Pat.09 T	25.12.57	10.05.00	Sigma	4	0 (0/16)	2
Pat.09 M	25.12.57	04.09.00				
Pat.15 T	16.02.41	18.07.00	Coecum	4	2 (7/19)	3
Pat.32 T	21.02.25	28.05.01	Rektum	4	2 (7/20)	3
Pat.11 T	12.02.51	25.05.00	Colon	4	2 (15/30)	3
Pat.11 M	12.02.51	25.05.00				
Pat.19 T	12.10.47	16.10.00	Colon descendens	4	2 (12/20)	3
Pat.19 M	12.10.47	16.10.00				
Pat.20 T	11.08.45	19.10.00	Sigma	4	2 (16/32)	2
Pat.31 T	13.11.41	25.05.01	Sigma	4	3 (29/39)	2
Pat.23 T	24.04.38	06.12.00			2 (10/23)	2
Pat.17 M	10.05.34	28.08.00	<i>Rektum</i>	3	1 (3/25)	<i>nb</i>
Pat.01 M	26.03.56	12.10.99	<i>Rektum</i>		2 (4/25)	<i>nb</i>
Pat.21 M	18.12.39	19.10.00	<i>nb</i>		1 (1/17)	<i>nb</i>
Pat.10 M	25.07.46	15.05.00	<i>nb</i>	3	2 (9/27)	<i>nb</i>
Pat.07 M	08.11.49	11.04.00	<i>Colon</i>		1 ( <i>nb</i> )	<i>nb</i>
Pat.14 M	22.11.39	17.07.00	<i>Sigma</i>		1 (2/17)	<i>nb</i>
Pat.02 M	02.05.56	16.12.99	<i>Rektum</i>		2 (5/14)	<i>nb</i>

**Tab. 1:** Patienten, deren Primärtumoren (T) und entsprechendes Normalgewebe bzw. Lebermetastasen (M) für die Erstellung von Expressionsprofilen mittels Array-Hybridisierungen ausgewählt wurden. Angegeben sind neben dem Geburtsdatum der Patienten das Eingangs-Datum des Operationspräparates in der Pathologie, die Lokalisation des Primärtumors laut histologischem Befund, die Tumorgröße (pT), der Lymphknotenstatus (N) einschließlich der Anzahl befallener / untersuchter Lymphknoten und der Differenzierungsgrad (G). Bei den Metastasen, die unabhängig von einem Primärtumor untersucht wurden, sind die Daten des Primärtumors, so weit bekannt, in kursiver Schrift angegeben (nb = nicht bekannt). Die Untersuchung des Gewebes erfolgte mit Zustimmung der Ethikkommission und nach Einwilligung der Patienten.

## 2.2 Zelllinien

Die Zelllinien HCT116 und SW480 wurden für *spiking*-Experimente (3.3) verwendet und dienten als Grundlage zur Etablierung von Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren aus geringen Zellzahlen (3.4.2). HCT116 stammt ursprünglich aus dem Kolonkarzinom eines männlichen Patienten (Brattain et al., 1981). SW480 wurde aus dem Kolonkarzinom eines 50-jährigen männlichen Patienten isoliert (Leibovitz et al., 1976).

## 2.3 Verbrauchsmaterial

Chemikalien	Herkunft
Acrylamid rotiphorese Gel 40	Roth (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Calbiochem (San Diego, USA)
DEPC	Sigma (Deisenhofen)
EDTA	Serva (Heidelberg)
EtOH	Roth (Karlsruhe)
Ficoll 400	Sigma (Deisenhofen)
PEG (Polyethylenglykol) 8000	Sigma (Deisenhofen)
Propidiumiodid	Sigma (Deisenhofen)
TSR (template suppressant reagent)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Xylene cyanole	Sigma (Deisenhofen)

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

Kits	Herkunft
Atlas Human Cancer 1.2 Array	Clontech (Palo Alto, USA)
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro kit	Dynal (Oslo, Norwegen)
Dynabeads® Epithelial Enrich (for molecular applications)	Dynal (Oslo, Norwegen)
GENECLEAN II Kit	Bio 101 (La Jolla, USA)
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche (Mannheim)
LightCycler–FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche (Mannheim)
Oligolabelling Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, USA)



Fortsetzung Kits	Herkunft
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
<hr/>	
Enzyme	
Advantage KlenTaq Polymerase Mix	Clontech (Palo Alto, USA)
Expand High Fidelity PCR System	Roche (Mannheim)
FastStart Taq DNA Polymerase	Roche (Mannheim)
Mva I	MBI Fermentas (St.Leon-Rot)
Superscript <sup>TM</sup> II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	Gibco Life Technologies (Gaithersburg, USA)
Taq DNA Polymerase	Roche (Mannheim)
<hr/>	
Material für die Zellkultur	
Ampicillin	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
DMEM	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
FKS	Gibco Life Technologies (Gaithersburg, USA)
Ham's F12	Biochrom (Berlin)
L-Glutamin	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
Natriumpyruvat	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
PBS	Gibco Life Technologies (Gaithersburg, USA)
RPMI	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
Trypsin	PAN Biotech GmbH (Aidenbach)
Zellkulturflaschen	Greiner (Frickenhausen)
<hr/>	
Sonstiges Verbrauchsmaterial	
Agar	Behrens & Co. (Hamburg)
Agarose	Sigma (Deisenhofen)
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP (3000 Ci / mmol; 10 $\mu\text{Ci}$ / $\mu\text{l}$ )	Amersham Pharmacia Biotech
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP (3000 Ci / mmol; 10 $\mu\text{Ci}$ / $\mu\text{l}$ )	(Piscataway, USA)
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Anti-RNase	Ambion (Austin, USA)
Array Library Human lung cDNA (Library No. 404)	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin, Heidelberg)
Bacto-Pepton aus Kasein	Sigma-Aldrich (Darmstadt)
COT-1 DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Roche (Mannheim)
Cryo-Spray	medite (Burgdorf)
DEPC-treated Water	Ambion (Austin, USA)
Desoxynukleosidtriphosphate	Roche (Mannheim)
Ficoll-Paque <sup>TM</sup> Plus	Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, USA)
Gel-Fix for PAG	Serva (Heidelberg)
Hanks' Salzlösung (HBSS) mit 0,35 g / l NaHCO <sub>3</sub>	Biochrom (Berlin)
KILIK (frozen section medium)	Fremdling (Furth)

Fortsetzung sonstiges Verbrauchsmaterial	Herkunft
Lambda DNA/HindIII Marker, 2	MBI Fermentas (St.Leon-Rot)
PAP PEN	Kisker (Steinfurt)
ΦX174 DNA/HinfI Marker, 10	MBI Fermentas (St.Leon-Rot)
MicroSpin S-200 HR Columns	Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, USA)
Silikonöl DC200	Fluka (Neu-Ulm)
Sonicated Salmon Sperm DNA (10 mg / ml)	Stratagene (La Jolla, USA)
TSR (template suppressor reagent)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Ultima Gold (für die Szintillationsmessung)	Perkin Elmer (Boston, USA)
ULTRAhyb	Ambion (Austin, USA)
Whatman-3MM-Filterpapier	Whatman International (Maidstone, UK)
Yeast-Extract	Sigma-Aldrich (Darmstadt)
Yeast tRNA (5 mg / ml)	Roche (Mannheim)
Nylonmembran	Micron Separations Inc. (Westboro, USA)

## 2.4 Verwendete Oligonukleotide

Alle PCR und Sequenzier-Primer wurden bei der Firma Genset (Paris) in gelöstem Zustand bezogen. Die Primer für die PEP-PCR wurden auf eine Konzentration von 280 µM verdünnt, die Primer für die SMART-PCR auf 10 µM. Bei allen anderen Primern wurde eine Konzentration von 25 µM für die PCR bzw. 2,3 µM für die Sequenzierung gewählt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

*Random* Hexamere für die Reverse Transkription wurden von der Firma Roche (Mannheim) bezogen, in DEPC-H<sub>2</sub>O (Ambion) zu einer Konzentration von 0,08 A<sub>units</sub> (3,2 µg / µl) aufgelöst und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Exon – Exon Übergänge in Primern für die Amplifikation von cDNA-Molekülen sind in Fettdruck angegeben.

Reverse Transkription	Sequenz
Primer <i>random</i>	5' NNNNNN 3'
PEP-PCR	
PEP-Primer	5' NNNNNNNNNNNNNNNN 3'
SMART-PCR	
SMART II A	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGC GGG 3'
CDS-Primer II A	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC T <sub>(30)</sub> (A / C / G)N 3'
PCR Primer II A	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'
Spezifische PCR-Primer	
in_ind_protein_for	5' TCGCCTACTCCGTGAAGTCT 3'
in_ind_protein_rev	5' TGACAGGATGAATCCAATGGT 3'
myc_A-for	5' ACCAGCAGCGACTCTGAGG 3'
myc_A-rev	5' CAGTGGGCTGTGAGGAGGTT 3'
CKS-2_2 for	5' CACTACGAGTACCGGCATGT 3'
CKS-2_2 rev	5' ATCATGTAATGAACCCAGCCT 3'

Fortsetzung spezifische PCR -Primer	Sequenz
MIC_1-for	5' GATACTCACGCCAGAAGTGC 3'
MIC_1-rev	5' GGAACAGAGCCCGGTGAAG 3'
NGAL-for	5' TTCCAGGACAACCAAGTTCC 3'
NGAL-rev	5' CCAGTAGTCACACTTCTTTTTTCCCTA 3'
BIGH3-for	5' ACTCATCCCAGACTCAGCCAA 3'
BIGH3-rev	5' CAATTGGAGGGGTTCCATCT 3'
UDP2B15 -for	5' CCAAACCCCTGCCTAAGGA 3'
UDP2B15 -rev	5' CCATCAAATCTCCATAGAACCCTT 3'
Tax-1-bp-for-4	5' GGGTTGGTATATTCAAGGTTGG 3'
Tax-1-bp-rev-4	5' CATTGGGAAGGTAATATCCTTGG 3'
PBGD-for-A	5' CCTGCAGTTTGAAATCATTGCT 3'
PBGD-rev-A	5' TGAACAACCAGGTCCACTTC 3'
HD1-for	5' ACCGAAAAATGGAAATCTATCG 3'
HD1-rev	5' AGTCCTCACCAACGTTGAATC 3'
D2S123s	5' AAACAGGATGCCTGCCTTTA 3'
D2S123a	5' GGACTTTCCACCTATGGGAC 3'
D8S1469s	5' GCTTTAGAAGGCGGAGGTAG 3'
D8S1469a	5' GAGGGGGTTAAAGGTGTCAT 3'
D8S1817s	5' GCACGTTCAATATGACTGTTGATTC 3'
D8S1817a	5' ACTGAGGGCCAAGTCCCTA 3'
B2M-U1	5' GGCATTCTGAAGCTGACAGC 3'
B2M-D1	5' CTCCATGATGCTGCTTACATGTC 3'
B2M-U2	5' CTCGCGCTACTCTCTTTTCTGG3'
B2M-D2	5' TCTCGATCCCCTTAACCTATCTTG3'
GAPDH_sense	5' CCAGCCGAGCCACATCGCTC 3'
GAPDH_antisense	5' ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT 3'
p53cDNAex5-F	5' ATGAGCGCTGCTCAGATAGC 3'
p53cDNAex10-R	5' CAAGGCCTCATTAGCTCTC 3'
p53 5so	5' CAGGAGGTGCTTACACATG 3'
p53 5ao	5' TGAGGAATCAGAGGCCTG 3'
p53 5s	5' TCACTTGTGCCCTGACTTTC 3'
p53 5a	5' GGAAACCAGCCCTGTTCGTC 3'
p53 5qs	5' CCTGACTTTCAACTCTG 3'
p53 5qa	5' AGCCCTGTCGTCTCTC 3'
p53 6so	5' AGACGACAGGGCTGGTTTC 3'
p53 6ao	5' CACATCTCATGGGGTTATAG 3'
p53 6s	5' TCCCAGGCCTCTGATTC 3'
p53 6a	5' TAGGGAGTTCAAATAAGCAG 3'
p53 6qs	5' CCTCTGATTCTCACTG 3'
p53 6qa	5' CACTGACAACCACCCTT 3'
p53 7so	5' AAAGGCCTCCCCTGCTTG 3'
p53 7ao	5' AGTATGGAAGAAATCGGTAAG 3'
p53 7s	5' GCCTCCCCTGCTTGCCAC 3'
p53 7a	5' GTCAGAGGCAAGCAGAGGC 3'
p53 7qs	5' TGCTTGCCACAGGTCT 3'
p53 7qa	5' CAGCAGGCCAGTGTGC 3'
p53 8so	5' AAATGGGACAGGTAGGACCTG 3'
p53 8ao	5' GAATCTGAGGCATAACTGC 3'
p53 8s	5' TAGGACCTGATTTCTTACTGC 3'
p53 8a	5' GCATAACTGCACCCTTGGTC 3'

Fortsetzung spezifische PCR-Primer	Sequenz
p53 8qs	5' TCCTTACTGCCTCTTGC 3'
p53 8qa	5' CCCTTGGTCTCCTCCA 3'
p53 9so	5' GAGGAGACCAAGGGTGC 3'
p53 9ao	5' TTGAGTGTTAGACTGGAAAC 3'
p53 9s	5' GGGTGCAGTTATGCCTCAG 3'
p53 9a	5' AGACTGGAAACTTTCCACTTG 3'
p53 9qs	5' TTATGCCTCAGATTCCT 3'
p53 9qa	5' CTTTCCACTTGATAAGAG 3'
p53A_cDNA_Ex4_for	5' GTCTGGGCTTCTTGCATTCT 3'
p53A_cDNA_Ex6_rev	5' CCAAATACTCCACACGCAAA 3'
ras-A_cDNA_for	5' GAGAGAGGCCTGCTGAAAAT 3'
ras-A_cDNA_rev	5' CATATTCGTCCACAAAATGATTC 3'
APC Reg 1s	5' CAGACTTATTGTGTAGAAGA 3'
APC Reg 1a	5' CTCCTGAAGAAAATTCAACA 3'
APC Reg 2s	5' AGGGTTCTAGTTTATCTTCA 3'
APC Reg 2a	5' TCTGCTTGGTGGCATGGTTT 3'
APC Reg 3s	5' GGCATTATAAGCCCCAGTGA 3'
APC Reg 3a	5' AAATGGCTCATCGAGGCTCA 3'
APC Reg 4s	5' ACTCCAGATGGATTTTCTTG 3'
APC Reg 4a	5' GGCTGGCTTTTTGCTTTAC 3'
5'BstN1	5' ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTG GACCT 3'
3'WT	5' TCAAAGAATGGTCCTGCACC 3'
3'BstN1	5' TCAAAGAATGGTCCTGGACC 3'
CK20-A _sense	5' GCGTTTATGGGGGTGCTGGAG 3'
CK20-A _antisense	5' AAGGCTCTGGGAGGTGCGTCTC 3'

## 2.5 Puffer und Lösungen

Lösungen für die Isolierung von epithelialen Zellen aus Blut und Knochenmark

PBS	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O ad 1 l
Ery-Lyse-Puffer	1,0 g KHCO <sub>3</sub> 8,3 g NH <sub>4</sub> Cl 0,0372 g EDTA H <sub>2</sub> O ad 1 l (Lagerung bei 4 °C)
Waschlösung	1 ml FKS 0,6 g NaCitrat PBS ad 100 ml (Lagerung bei 4 °C)

---

Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

---

DEPC-H <sub>2</sub> O	1 ml DEPC H <sub>2</sub> O ad 1 l - rühren ÜN - autoklavieren
50 x TAE	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 H <sub>2</sub> O ad 1l
DNA-Auftragspuffer	120 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 1,25 ml Xylencyanol (2 %) 1,5 g Ficoll (Typ 400) H <sub>2</sub> O ad 10 ml
Ethidiumbromidlösung (0,0005 %)	250 µl EtBr-Lösung (1 %) H <sub>2</sub> O ad 500 ml
RNA-Auftragspuffer	250 µl Glycerin 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 125 µl Bromphenolblau (1 %) 124 µl DEPC-H <sub>2</sub> O (Lagerung bei 4 °C)
10 x MOPS	200 ml 1 M MOPS pH 7,0 80 ml 1 M NaAc 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 DEPC-H <sub>2</sub> O ad 1 l (Lagerung im Dunkeln)

---

Lösung für die Fällung von PCR-Produkten

---

PEG-Mix	13,1 g PEG 8000 10 ml 3 M NaAc pH 5,2 330 µl 1 M MgCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O ad 50 ml
---------	---

---

 Lösungen für Southern Blot / Northern Blot / Dot Blot
 

---

20 x SSC	175,3 g NaCl 88,2 g NaCitrat H <sub>2</sub> O ad 800 ml - mit HCl pH 7,0 einstellen H <sub>2</sub> O ad 1 l
Vorbereitungslösung	0,25 M HCl
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl pH 7,5 1,5 M NaCl

---

 Lösungen für die Sondenherstellung (Clontech-Arrays)
 

---

10 x Denaturierungslösung	1 M NaOH 10 mM EDTA
2 x Neutralisierungslösung	27,6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O ad 190 ml - mit 10 N NaOH pH 7,0 einstellen H <sub>2</sub> O ad 200 ml

---

 Lösungen für die nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
 

---

10 x TBE	108 g Tris 55 g Borsäure 4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 H <sub>2</sub> O ad 1 l
Acrylamid-Gel	4,7 ml Acrylamidlösung (38 % Acrylamid, 2 % Bisacrylamid)
	3,7 ml 10 x TBE 28,7 ml H <sub>2</sub> O
Polymerisationsstart:	40 µl TEMED 1 ml APS (10 %)
DNA-Auftragspuffer	120 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 1,25 ml Bromphenolblau (2 %) 1,5 g Ficoll (Typ 400) H <sub>2</sub> O ad 10 ml

---

 Lösungen für die Plasmidpräparation aus *E.coli*


---

Lösung A	50 mM Glukose 25 mM Tris / HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 - steril filtrieren
Lösung B	10 µl 10 N NaOH 50 µl 10 % SDS 440 µl H <sub>2</sub> O (frisch herstellen)
Lösung C	28,5 ml H <sub>2</sub> O 11,5 ml Eisessig 60 ml 5 M KAc (Lagerung 4 °C)

Die in den enzymatischen Reaktionen verwendeten Puffer und Lösungen stammen aus den genannten Kits oder sind mit dem entsprechenden Hersteller gekennzeichnet. Die Zusammensetzung ist den dazugehörigen Datenblättern zu entnehmen.

## 2.6 Nährmedien

### 2.6.1 Nährmedien für humane Zelllinien

Als Nährmedium wurde für die Zelllinie HCT116 DMEM / Ham's F12 1:1 verwendet, SW480 Zellen wurden in RPMI kultiviert. Die Zusammensetzung der Medien ist den zugehörigen Datenblättern zu entnehmen. Sie wurden als Fertigpulver in H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> gelöst, DMEM wurde zusätzlich mit 3,7 g, RPMI mit 2,0 g NaHCO<sub>3</sub> pro Liter versetzt. Eine Einstellung des pH-Wertes auf 7,3 erfolgte mit HCl, anschließend wurde das Medium steril filtriert. Zusätze für beide Medien waren L-Glutamin (Endkonz. 2 mM), Natriumpyruvat (Endkonz. 1 mM), Streptomycin (Endkonz. 100 µg / ml) und Penicillin (Endkonz. 100 U / ml). Zu DMEM / Ham's wurde FKS in einer Endkonzentration von 10 % zugefügt, zu RPMI in einer Endkonzentration von 5 %. Die Medien wurden bei 4 °C aufbewahrt und vor der Verwendung auf 37 °C erwärmt.

### 2.6.2 Nährmedien für *E.coli*

LB <sub>0</sub>	10 g Bacto-Pepton aus Kasein 5 g Yeast-Extract 10 g NaCl - mit 5 N NaOH pH 7,0 einstellen - für LB <sub>0</sub> -Platten: + 15 g Agar H <sub>2</sub> O ad 1 l - autoklavieren
LB <sub>0</sub> / amp	LB <sub>0</sub> + 1 ml Ampicillin (50 mg / ml) (nach Autoklavieren zum handwarmen Medium zugeben)

## 3 Methoden

### 3.1 Kulturen

#### 3.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Zelllinien wurden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre) in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Ein Medienwechsel erfolgte regelmäßig dreimal pro Woche. Bei der Zellernte wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und durch Zugabe von 2,5 ml 0,1 % Trypsin / 0,04 % EDTA in PBS vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde anschließend durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (Heraeus Megafuge 1.0, 5 min, 1200 Upm, RT) wurden die Zellen in 5 – 10 ml PBS resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

#### 3.1.2 Anzucht und Lagerung von *E.coli*

*Escherichia coli* Bakterien wurden auf LB<sub>0</sub> / amp-Platten (2.6.2) ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung der Platten bis zum Abend erfolgte bei 4 °C, dann wurden 2 ml Flüssigmedium LB<sub>0</sub> / amp mit je einem Klon angeimpft und ÜN bei 37 °C geschüttelt.

### 3.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting, FACS*) erlaubt die Isolierung einzelner Zellen aus gemischten Zellpopulationen in Suspension aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Dazu werden die Zellen in einem Flüssigkeitssystem mittels hydrodynamischer Fokussierung einzeln durch den Fokusbereich der Lichtquelle (i.d.R. Laser) geführt und resultierendes Streu- bzw. Fluoreszenzlicht über Photodioden oder Photomultiplier (*photomultiplier tube, PMT*) detektiert. Schwingungen eines Piezokristalls (*droplet frequency*) zerlegen den Flüssigkeitsstrahl in eine definierte Anzahl kleiner Tropfen, von denen jeder nur eine Zelle enthält. Die Tropfen, die Zellen mit beliebig wählbaren Eigenschaften enthalten, werden nach einem kurzen Ladepuls im elektrischen Feld eines Kondensators abgelenkt und somit von den übrigen Zellen isoliert.

Die Sortierung definierter Zellzahlen wurde mit einem FACStar<sup>PLUS</sup>, Becton Dickinson, durchgeführt. Die Unterscheidung zwischen lebenden (Membran-intakten) und geschädigten / toten (Membran-durchlässigen) Zellen erfolgte dabei durch eine Färbung mit Propidiumiodid (PI). Dafür wurden 2 µl einer Stammlösung PI (1 mg / ml) zu einer Zell-Suspension von 1 Mio Zellen / ml gegeben (Endkonzentration 2 µg PI / µl). Die Detektion der PI-Fluoreszenz wurde auf dem FL3-Kanal (639 / 22) mit einer Verstärkerspannung von 300 V durchgeführt. Die Auswahl der gewünschten Zellpopulation erfolgte in einer zweidimensionalen Darstellung der Streulichtintensität in Durchstrahlrichtung (*forward scatter, FSC*) und der Intensität der Rotfluoreszenz. Die *droplet frequency* lag bei ca. 25 kHz. Die Durchlaufrate der Zellen betrug ca. 300 s<sup>-1</sup>. Die Sortierung erfolgte im *Count-Mode* mit einem Sortfenster von drei Tropfen.



### 3.3 Isolierung epithelialer Zellen aus Knochenmark und Blut

Für die Isolierung von epithelialen Tumorzellen aus dem Knochenmark wurden 3 – 8 ml Knochenmarksaspirat verwendet, das überwiegend von Patienten mit gastrointestinalen Tumoren aus dem linken und rechten Beckenkamm unmittelbar vor der Operation entnommen wurde. Alle Patienten hatten der Entnahme mit einer Einwilligungserklärung zugestimmt.

Die Isolierung epithelialer Tumorzellen aus Blut erfolgte im Rahmen von *spiking*-Experimenten zur Etablierung der unter 3.3.1 und 3.3.2 beschriebenen Methoden. 4 ml menschliches Blut wurde dafür entweder mit einer definierten Zahl von Zellen der Kolonkarzinomzelllinie SW480 oder HCT116 versetzt und entsprechend aufbereitet.

#### 3.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Knochenmark und Blut

Aus den Knochenmarksaspiraten oder dem Blut wurden zunächst die mononukleären Zellen von den übrigen Bestandteilen abgetrennt. Dazu wurden je 3 - 4 ml Knochenmark / Blut in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit steriler Hanks-Lösung auf 20 ml verdünnt und abzentrifugiert (Heraeus Varifuge 3.2 RS, 10 min, 1000 Upm, RT). Der Überstand einschließlich der Fettphase wurde bis auf 10 ml abpipettiert, das Sediment durch vorsichtiges Schütteln wieder resuspendiert und in einem neuen 50 ml Falcon-Röhrchen auf 20 ml Ficoll 400 geschichtet. Nach Zentrifugation (30 min, 2500 Upm, RT) wurden die obere und die mittlere Phase abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Es wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, erneut zentrifugiert (Varifuge 3.2 RS, 10 min, 1700 Upm, 4 °C) und die Zellen in 1 ml Waschlösung resuspendiert. Bei hoher Konzentration von Erythrozyten im Sediment wurde allerdings vor der Aufnahme in der Waschlösung eine Erythrozyten-Lyse auf folgende Weise vorgenommen: Zugabe von 5 ml Ery-Lyse-Puffer, 5 min Inkubation bei RT, Zugabe von PBS auf 50 ml, Zentrifugation (10 min, 1700 Upm, 4 °C). Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität wurde ein Aliquot der Zell-Suspension (evtl. verdünnt, je nach Zellzahl) 1:1 mit einer 0,2 %igen Trypanblau-Lösung (gelöst in 0,9 % NaCl) für 2 min inkubiert und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Lebende Zellen (ungefärbt) konnten dabei von geschädigten / toten (gefärbt wegen Verlust der Membranintegrität) unterschieden werden.

#### 3.3.2 Immunomagnetische Markierung und Anreicherung epithelialer Zellen

Zur Anreicherung epithelialer Tumorzellen gegenüber normalen Knochenmarks- / Blutzellen wurden BerEP4-Antikörper verwendet. Die Antikörper sind als hoch spezifisch für zwei 34 bzw. 39 kDa große, membranständige Glykoproteine beschrieben, welche von den meisten normalen und neoplastischen epithelialen Geweben exprimiert werden (Latzka et al., 1990). Durch Kopplung der Antikörper an magnetische *beads* (Dynabeads Epithelial Enrich, Dynal) war eine immunomagnetische Separation von *bead*-markierten epithelialen Tumorzellen möglich:

25 µl *beads* wurden zunächst zweimal mit je 1 ml Waschlösung gewaschen und zu 1 ml Zell-Suspension aus  $10 - 20 \times 10^6$  mononukleären Zellen gegeben. Die Anlagerung der *beads* erfolgte während einer 30-minütigen Inkubation auf einem Roller bei einer Temperatur von 4 °C. Die *bead*-Suspension wurde anschließend für 3 min bei 4 °C in einen Magneten gestellt und der Überstand (unmarkierte Zellen) abgetrennt. Die *beads* und *bead*-markierten Zellen wurden durch vorsichtiges Pipettieren in 800 µl kalter Waschlösung resuspendiert, noch viermal gewaschen und in 400 µl Waschlösung aufgenommen. Die Lagerung der Suspension bis zur weiteren Untersuchung erfolgte auf Eis.

### 3.3.3 Separation *bead*-markierter Zellen mittels Mikromanipulation

*Bead*-markierte Zellen wurden unter mikroskopischer Kontrolle durch Mikromanipulation aus einer Suspension (3.3.2) von ungebundenen *beads* und nicht-markierten Zellen abgetrennt. Mit Hilfe eines PAP PEN (Kisker) wurde ein ca. 1 cm<sup>2</sup> großer Bereich durch eine H<sub>2</sub>O-abweisende Barriere auf dem Objektträger abgegrenzt, in den jeweils 200 µl Suspension pipettiert wurde, die bei 100-facher Vergrößerung nach markierten Zellen abgesucht wurde. Die Apparatur zur Isolierung der Zellen bestand aus einer Ölpumpe (*CellTram Oil*, Eppendorf) und einer Glaskapillare mit einem Durchmesser von 50 µm (BioMedical Instruments). Die Glaskapillare war am Mikromanipulator (*PALM Robot-Manipulator*) des Laser-Mikrodissektionsgerätes *PALM Robot-MicroBeam System* (P.A.L.M.) befestigt, was eine µm-genaue Ausrichtung der Kapillare und des Objektträgers (mittels *PALM Robot-Stage*) mit den Zellen erlaubte. Die Zellen wurden unter mikroskopischer Kontrolle bei 400-facher Vergrößerung in die Kapillare gesaugt, in einen Lyse-Puffer (Dynabeads mRNA DIREKT™ Micro Kit) überführt und bei -80 °C gelagert.

## 3.4 Isolierung von Nukleinsäuren

### 3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gefriermaterial

Aus Operationspräparaten kolorektaler Tumoren und Lebermetastasen wurden nach der Schnellschnitt-Diagnostik von einem Pathologen Proben des Tumors und des Normalgewebes entnommen (innerhalb 10 – 30 min nach der Resektion). Diese wurden in KILIK (*frozen section medium*) mittels Kryospray schockgefroren, maximal 2 h bei -20 °C aufbewahrt und dann bei -80 °C gelagert. Um den Anteil an Tumorzellen im Gewebe zu überprüfen, wurden vor der RNA-Isolierung 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, mit HE gefärbt und von einem Pathologen begutachtet. Eine Weiterverarbeitung erfolgte nur, wenn der Tumorzellanteil bei mehr als 70 % im Gewebe lag. Von diesen Bereichen wurden 15 – 30 mg mit einem Skalpell in dünnen Scheiben vom gefrorenen Material abgeschabt und direkt in den Lyse-Puffer (600 µl, RNeasy Mini Kit, Qiagen; plus 6 µl β-Mercaptoethanol) für die RNA-Isolierung gegeben. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Gewebes mit einem Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik) ca. 30 sec lang zu einem möglichst homogenen Lysat. Dieses wurde anschließend noch zehnmal mittels einer 5 ml Spritze durch eine 0,7 x 30 mm Kanüle (BD Microlance, Becton Dickinson) gezogen, durch Zentrifugation (ETZ, 3 min, 13.000 Upm, RT) von ungelösten Zellfragmenten getrennt und dann maximal 20 min bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 600 µl 70 % EtOH wurde das Lysat auf jeweils zwei Säulchen aufgeteilt, danach erfolgte die RNA-Isolierung nach Protokoll des Herstellers inklusive DNA-Verdau (RNase-Free DNase Set, Qiagen) auf den Säulchen. Die RNA wurde in 50 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O eluiert und die zwei RNA-Eluat der gleichen Probe gemischt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte an einer 1 %igen RNA-Verdünnung mit dem Gene Quant II Photometer (Pharmacia). Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert oder direkt in eine Fällungsreaktion eingesetzt.

### 3.4.2 Isolierung von mRNA aus wenigen / einzelnen Zellen

Die Isolierung von mRNA aus geringen Zellzahlen (1 – 100 in 100 µl *Lysis Binding Buffer*) erfolgte durch Bindung der PolyA-Enden der mRNA an *bead*-gebundene Oligo-(dT)<sub>25</sub> und anschließende magnetische Separation (Dynabeads mRNA DIRECT™ Micro kit; Magnet MPC-P-12, Dynal).

Die benötigten *beads* mußten zunächst im Ursprungsvolumen *Lysis Binding Buffer* gewaschen und wieder aufgenommen werden, bevor jeweils 10 µl zu 100 µl Zell-Lysat zugefügt wurden (bei diesem und den folgenden Waschschritten wurde die Suspension mit den *beads* für jeweils 1 min in einen Magneten gestellt, bevor der Überstand abgezogen wurde). Eine Inkubation unter leichtem Schütteln (ETM, 5 min, 400 Upm, 25 °C) ermöglichte die Bindung der mRNA an die *beads*. Nach Abtrennung der *beads* für 2 min im Magneten folgten zwei Waschschriffe mit je 100 µl *Washing buffer A*, zwei Waschschriffe mit je 100 µl *Washing buffer B* und ein Waschschriff mit 100 µl 1 x RT-Puffer (Superscript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase, Gibco). Anschließend wurden die *beads* in 10,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O (Ambion) resuspendiert und sofort in die reverse Transkription eingesetzt.

Für die SMART-PCR mußte die mRNA von den *beads* eluiert werden. Dafür wurden die *beads* 2 min bei 65 °C mit 10 µl *Elution solution* (mRNA DIRECT kit, Dynal) inkubiert und der Überstand nach magnetischer Abtrennung der *beads* entnommen.

### 3.4.3 Simultane Isolierung von DNA und RNA aus wenigen / einzelnen Zellen

Die Isolierung von mRNA erfolgte bei dieser Methode wie unter 3.4.2 beschrieben. Die DNA wurde durch eine Fällungsreaktion aus dem Zell-Lysat (Überstand, abgezogen nach der Bindung der mRNA an die *beads*) erhalten. Das Lysat wurde dafür mit 1 µl Yeast tRNA, 4,3 µl 8 M LiCl, 4,6 µl 5 M NaCl und 240 µl eiskaltem EtOH (100 %, -20 °C) versetzt, gemischt (Vortex) und 1 h auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (Heraeus Biofuge 22R, 2 h, 17.000 g, 4 °C) wurde der Überstand abgezogen und das Pellet mit 400 µl eiskaltem EtOH (70 %, -20°C) gewaschen. Es folgten zwei weitere Zentrifugationen (15 min, 17.000 g, 4 °C), nach denen der EtOH bestmöglich abgezogen wurde. Das Pellet trocknete bei RT (15 min) und wurde dann in 10 µl Millipore-H<sub>2</sub>O aufgenommen (zehnfaches Überspülen der ERG-Wand, anschließend Inkubation im ETM, 10 min, 400 Upm, 37 °C). Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4 °C.

### 3.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die angewandte Methode zur schnellen Gewinnung kleiner Mengen an Plasmid-DNA (Li and Schweizer, 1993) beruht auf einem modifizierten Verfahren der alkalischen Lyse (Ish-Horowicz and Burke, 1981). Die Ausbeute und der Reinheitsgrad der DNA erlauben, ausgehend von wenigen Millilitern Bakterienkultur, sowohl Restriktions- als auch Sequenzanalysen.

Nach einem leicht abgeänderten Protokoll wurden 2 ml einer *E. coli* ÜK abzentrifugiert (ETZ, 1 min, 13.000 Upm, RT), die Zellen in 50 µl Lösung A aufgenommen, mit einer Pipette gut gemischt und auf Eis gestellt. Es folgte die Zugabe von 100 µl frisch hergestellter Lösung B. Dann wurde durch vorsichtiges Schwenken gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 75 µl kalter Lösung C (4 °C) wurde wieder vorsichtig gemischt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (ETZ, 5 min, 13.000 Upm, RT) wurden die Bakterienreste pelletiert und der Überstand in ein ERG mit vorgelegten 330 µl 6 M GITC und 450 µl Isopropanol gegeben. Nach kurzem Mischen (Vortex) folgte eine weitere

Zentrifugation (ETZ, 10 min, 13.000 Upm, RT), dann wurde der Überstand verworfen und die präzipitierte Plasmid-DNA mit 1 ml EtOH (70 %) gewaschen. Die DNA wurde in der SpeedVac (Savant Instruments Inc., Farmingdale, USA) für 2 min getrocknet und dann in 50 µl Millipore-H<sub>2</sub>O mit 1 µl RNase A (10 mg / ml) gelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4 °C.

### 3.4.5 Isolierung von DNA aus Paraffin-eingebettetem Patientengewebe mittels manueller Mikrodissektion

Die Isolierung von DNA erfolgte mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) aus Patientengewebe, das routinemäßig in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden war. Dazu wurden zunächst 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, auf Objektträger gezogen und folgendermaßen entparaffiniert: 30 min bei 70 °C im Brutschrank, 2 x 5 min Xylol, jeweils 2 x 1 min in 96 %, 80 % und 70 % EtOH. Die Lagerung der Schnitte erfolgte in 70 % EtOH. Vor der DNA-Isolierung wurden die Objektträger in Millipore-H<sub>2</sub>O geschwenkt, kurz in Methylenblau (1 %) gefärbt und wieder im Wasser abgespült. Bei 40-facher Vergrößerung wurden dann unter dem Mikroskop definierte Tumor- oder Normalgewebearale mit einer Kanüle aus 1 - 3 Schnitten abgekratzt und in 200 µl Lysepuffer gegeben. Nach Zugabe von 40 µl Proteinase K folgte der proteolytische Aufschluß des Gewebes (ETM, 14 – 16 h, 600 Upm, 55 °C). Nicht gelöste Bestandteile wurden am nächsten Tag abzentrifugiert (ETZ, 3 min, 13.000 Upm, RT), das Zell-Lysat mit 200 µl Bindepuffer versetzt, gemischt (Vortex) und bei 72 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 100 µl Isopropanol zur Lösung, die nach erneutem Mischen dann auf ein Säulchen gegeben wurde. Die DNA band während der anschließenden Zentrifugation (ETZ, 1 min, 8.000 Upm, RT) an die Filteroberfläche im Säulchen und wurde dann in einem neuen Auffanggefäß zweimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen, wobei der Durchlauf jeweils nach der Zentrifugation (ETZ, 1 min, 8.000 Upm, RT) verworfen wurde. Um den restlichen Waschpuffer zu entfernen, folgte ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt (ETZ, 1 min, 13.000 Upm, RT), bevor der Filter zur Elution der DNA in einem sterilen 1,5 ml ERG mit 200 µl 70 °C warmem Elutionspuffer 5 min bei 70 °C inkubiert wurde. Die DNA wurde durch eine abschließende Zentrifugation (ETZ, 1 min, 8.000 Upm, RT) gewonnen. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4 °C.

## 3.5 Reverse Transkription

### 3.5.1 Reverse Transkription von Gesamt-RNA

Die reverse Transkription von RNA aus Patientenmaterial erfolgte zur Herstellung von cDNA für die nachfolgende quantitative PCR am LightCycler und wurde mit der Superscript<sup>TM</sup> II RNase H<sup>-</sup> Reversen Transcriptase (Gibco) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Es wurde folgender Standardansatz verwendet:

1-9 µl Gesamt-RNA	(4µg)
1 µl Primer <i>random</i>	(3,2 µg / µl)
1 µl dNTP	(je 10 mM)
ad 11 µl DEPC-treated Water (Ambion)	

Der Ansatz wurde 5 min bei 65 °C inkubiert (Denaturierung von Sekundärstrukturen) und dann mindestens 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde ein *Master-Mix* aus folgenden Komponenten zugefügt:

4 µl 5 x RT-Puffer  
2 µl DTT (0,1 M)  
1 µl Anti-RNase (Ambion)

Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 25 °C (Bindung der Primer an die RNA), dann wurde der Ansatz 2 min auf 42 °C vorgewärmt.

1 µl Superscript II (200 U / µl)

wurde zugegeben, dann folgte eine Inkubation für 50 min bei 42 °C, bevor die Superscript durch Erhitzen (15 min bei 72°C) inaktiviert wurde.

Die Lagerung der cDNA erfolgte bei 4 °C.

Ein Ansatz ohne die Reverse Transkriptase Superscript II wurde durchgeführt, um die RNA-Präparation auf Kontaminationen mit DNA zu überprüfen (RT<sup>minus</sup>-Kontrolle).

### 3.5.2 Reverse Transkription von *bead*-gebundener mRNA

Die cDNA-Synthese von *bead*-gebundener mRNA wurde mit der Superscript<sup>TM</sup> II RNase H<sup>-</sup> Reversen Transcriptase nach folgendem Protokoll durchgeführt:

10,5 µl *bead*-gebundene mRNA  
1 µl Primer *random* (3,2 µg / µl)

wurden 2 min bei 70 °C inkubiert und dann für mindestens 2 min auf Eis abgekühlt. Es folgte die Zugabe vom *Master-Mix* aus:

4 µl 5 x RT-Puffer  
2 µl DTT (0,1 M)  
1 µl dNTP's (je 10 mM)  
0,5 µl Anti-RNase (Ambion)  
1 µl Superscript II (200 U / µl)

Der Ansatz wurde 60 min bei 42 °C inkubiert und dann 10 min auf 70 °C erhitzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei 4 °C.

## 3.6 Amplifizierung von DNA und cDNA mit der Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (*polymerase chain reaction*, Saiki et al., 1985) war die Grundlage für die spezifische Amplifikation von Sequenzen bzw. der unspezifischen Vermehrung von DNA oder cDNA-Molekülen.

Die PCR-Reaktionen unter 3.6.1 bis 3.6.4 wurden in einem Thermocycler PTC-200 (Biozym, mit Heizdeckel) durchgeführt. Zur Etablierung der Reaktionstemperatur für die Primer-Hybridisierung bei der spezifischen PCR (3.6.2) diente ein Thermocycler *Mastercycler gradient* (Eppendorf, mit Heizdeckel), in dem zehn verschiedene Ansätze zwischen 50,7 und 69,9 °C während der Primer-Hybridisierung inkubiert wurden. Die Temperaturwechsel im

PTC-200 und im *Mastercycler gradient* erfolgten, wenn nicht anders angegeben, mit jeweils 1 °C / sec.

Für die quantitative PCR (3.6.5) wurde der LightCycler (Roche) verwendet.

### 3.6.1 PEP-PCR (DNA und cDNA)

In der PEP-PCR (*primer extension preamplification* PCR, Zhang et al., 1992) findet mittels 15 Nukleotid langen, degenerierten Primern eine unspezifische Vermehrung der eingesetzten DNA-Moleküle statt. Die Durchführung basierte auf einem verbesserten PEP-Protokoll (I-PEP, Dietmaier et al., 1999) und wurde zusätzlich modifiziert.

Für die PEP-PCR wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche) verwendet. Insgesamt waren folgende Komponenten im *Master-Mix* enthalten:

30 µl Millipore-H <sub>2</sub> O	
3 µl Gelatine	(1 mg / ml)
6 µl MgCl	(25 µM)
6 µl 10 x Puffer 3	
0,6 µl dNTP's	(je 10 mM)
3,4 µl PEP-Primer	(280 µM)
0,17 µl Polymerase	(3,5 U / µl)

Für die Amplifizierung von DNA wurden 50 µl vom *Master-Mix* mit 10 µl DNA gemischt. Für die Vermehrung von cDNA wurden 45 µl vom *Master-Mix* zu 20 µl *bead*-gebundener cDNA gegeben und die *beads* durch sorgfältiges Auf- und Abpipettieren wieder resuspendiert. Die PCR-Reaktion wurde mit dem folgenden Programm durchgeführt:

	4 min	94 °C (Denaturierung)
50 Zyklen:	1 min	28 °C (Primer-Hybridisierung)
		Temperaturwechsel 0,1 °C / sec auf 55 °C
	45 sec	55 °C (Primer-Hybridisierung / Elongation)
	30 sec	68 °C (Elongation)
	8 min	72 °C (Vervollständigung der Elongation)

Die PEP-Produkte wurden bis zum Einsatz in eine spezifische PCR bei 4 °C gelagert.

### 3.6.2 SMART-PCR

In der SMART (*Switching Mechanism At 5' end of the RNA Transcript*)-PCR findet eine gleichmäßige Amplifikation der gesamten cDNA statt, wobei das Produkt annähernd äquivalent der relativen Ausgangsmenge der einzelnen mRNA-Moleküle ist (Angabe der Firma Clontech). Die Technologie dieser PCR beruht auf der terminalen Transferase-Aktivität der Reversen Transkriptase, die an das Ende eines neu synthetisierten cDNA-Stranges automatisch eine Cytosin-Sequenz anhängt. Spezielle SMART-Primer binden an diese Cytosin-Reste, worauf die cDNA-Synthese bis an das 5'-Ende des Primers fortgesetzt wird. Die SMART-Primer, wie auch die CDS-Primer (über eine oligo(dT)-Sequenz bei der Initiation der reversen Transkription beteiligt), enthalten jeweils eine definierte Sequenz, über die eine nachfolgende PCR-Amplifikation möglich ist.

Da für das ursprüngliche SMART-Protokoll (Clontech) eine Mindestmenge von 25 ng Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial erforderlich sind, mußte das Protokoll modifiziert werden, um RNA aus geringen Zellzahlen einsetzen zu können. Es wurde folgender Ansatz verwendet:

10 µl RNA in Elutionspuffer (siehe 3.4.2)  
 1 µl CDS-Primer II A (10 µM)  
 1 µl SMART II A (10 µM)

wurden gemeinsam für 2 min bei 70 °C inkubiert und anschließend mindestens 2 min auf Eis abgekühlt. Für die anschließende Reverse Transkription mit der Superscript<sup>TM</sup> II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Gibco) wurde ein *Master-Mix* hergestellt, der aus folgenden Komponenten bestand:

4 µl 5 x RT-Puffer  
 2 µl DTT (20 mM)  
 1 µl dNTP's (je 10 mM)  
 1 µl Superscript II (200 U/µl)

Der Ansatz wurde 60 min bei 42 °C und anschließend 10 min bei 70 °C inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei 4 °C.

Die PCR wurde unter Verwendung des Advantage KlenTaq Polymerase Mix (Clontech) durchgeführt. Folgender *Master-Mix* wurde nach der Reversen Transkription zum Reaktionsansatz zugefügt:

64 µl Millipore-H<sub>2</sub>O  
 10 µl 10 x KlenTaq-Puffer  
 2 µl dNTP's (10 mM)  
 2 µl PCR Primer II A (10 µM)  
 2 µl 50 x KlenTaq

Die PCR-Reaktion wurde mit dem folgendem Programm durchgeführt:

	1 min	95 °C (Denaturierung)
30 Zyklen:	15 sec	95 °C (Denaturierung)
	30 sec	65 °C (Primer-Hybridisierung)
	6 min	68 °C (Elongation)

Nach jeweils 15, 18, 21, 24 und 27 Zyklen wurden 15 µl aus dem PCR-Ansatz entnommen. Davon wurde je 1 µl in nachfolgende spezifische PCR-Reaktionen eingesetzt.

### 3.6.3 Spezifische PCR

Mit Hilfe der spezifischen PCR erfolgte die Amplifikation definierter DNA-Fragmente. Es wurden verschiedene Reaktionsansätze für den Einsatz voramplifizierter bzw. nicht-amplifizierter DNA / cDNA in die spezifische PCR verwendet.

1.) Amplifikation voramplifizierter DNA / cDNA (PEP-Produkt) mit dem Expand High Fidelity PCR System (Roche)

Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

5 µl PEP-Produkt  
 3 µl 10 x Puffer 2  
 0,6 µl dNTP's (10 mM)  
 0,6 µl Primer (25 µM)  
 0,17 µl Polymerase (3,5 U / µl)  
 20,6 µl Millipore-H<sub>2</sub>O

Die PCR-Reaktion wurde mit dem folgendem Programm durchgeführt:

	2 min	94 °C (Denaturierung)
35 Zyklen:	1 min	94 °C (Denaturierung)
	1 min	50 – 65 °C (Primer-Hybridisierung)
	1 min	72 °C (Elongation)
	10 min	72 °C (Vervollständigung der Elongation)

2.) Amplifikation von nicht-voramplifizierter DNA / cDNA bzw. SMART-Produkten mit der Taq DNA Polymerase (Roche)

Der Reaktionsansatz für nicht-voramplifiziertes Ausgangsmaterial bestand aus folgenden Komponenten:

1 µl DNA / cDNA  
 3 µl 10 x Puffer mit 25 mM MgCl  
 0,6 µl dNTP's (10 mM)  
 0,4 µl Primer (25 µM)  
 1,5 µl DMSO  
 0,1 µl Polymerase (5U / µl)  
 23,4 µl Millipore-H<sub>2</sub>O

Die Amplifizierung von 1 µl SMART-Produkt erfolgte in einem 20 µl-Ansatz unter Verwendung der gleichen Reaktionskomponenten.

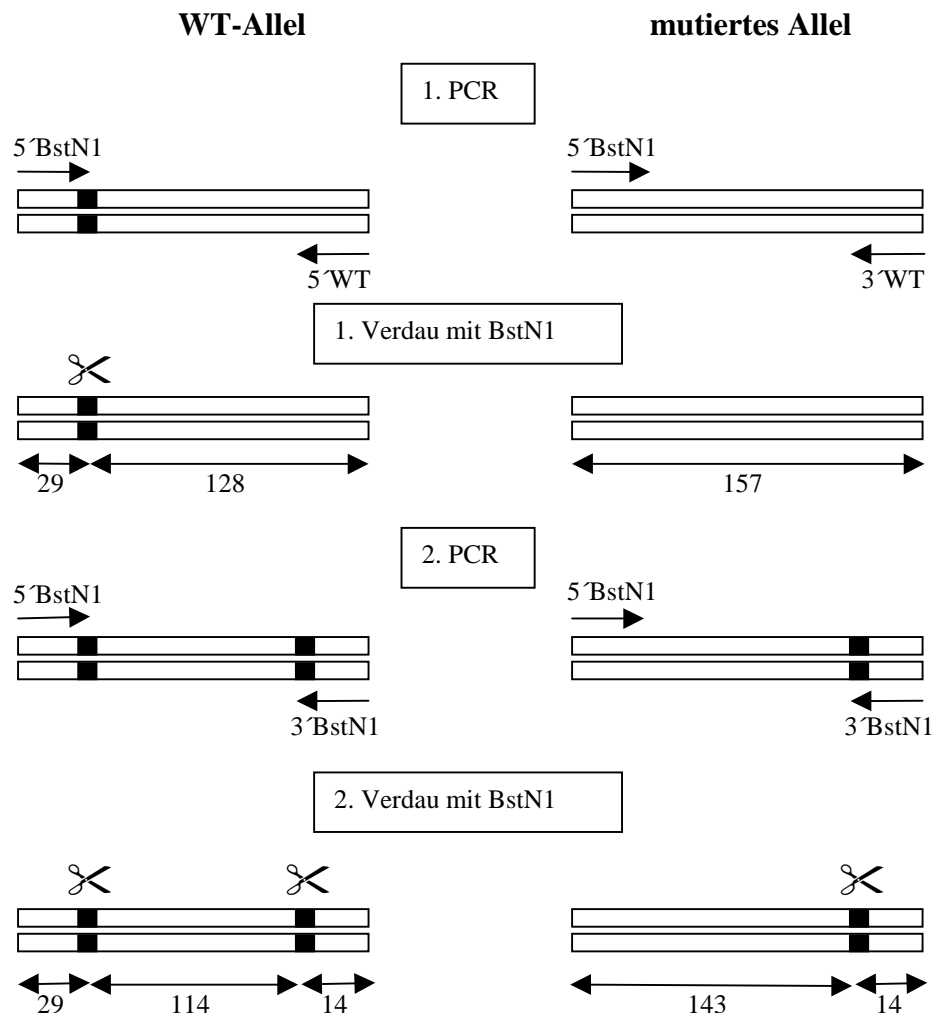
Die PCR-Reaktion wurde mit dem folgendem Programm durchgeführt:

	2 min	94 °C (Denaturierung)
35 Zyklen:	1 min	94 °C (Denaturierung)
	1 min	50 – 65 °C (Primer-Hybridisierung)
	1 min	72 °C (Elongation)
	10 min	72 °C (Vervollständigung der Elongation)



### 3.6.4 Enrichment-PCR

Die *Enrichment*-PCR wurde leicht modifiziert nach dem Protokoll von Trümper durchgeführt, um Mutationen im Codon 12 des *K-RAS* Gens nachzuweisen (Trümper et al., 1994). Das Prinzip dieser PCR beruht darauf, mutierte Allele der Tumorzellen aus einer Mehrzahl von Wildtyp-Sequenzen (WT) der normalen Zellen anzureichern (Abb. 5). Zunächst wird in einer ersten PCR ein 157 bp langes Fragment des *K-RAS* Gens mit den Primern 5' BstN1 und 3' WT amplifiziert. Der Primer 5' BstN1 enthält dabei einen *mismatch*, über den im Wildtyp-Allel eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BstN1 eingeführt wird, im mutierten Allel ergibt sich die Schnittstellensequenz aufgrund der Mutation jedoch nicht. Beim folgenden Restriktions-Verdau werden daher nur PCR-Produkte der normalen Allele geschnitten, die mutierten Allele bleiben als Ausgangsmaterial für die zweite PCR erhalten. Da bei dieser PCR im 3'-Bereich des Fragments eine weitere BstN1-Schnittstelle eingeführt wird, kann durch den Verdau des zweiten PCR-Produktes die Aktivität des Restriktionsenzym überprüft werden. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung stellt sich ein WT-Allel als 114 bp großes Fragment dar, während ein mutiertes Allel 143 bp aufweist.



**Abb. 5:** Prinzip der *Enrichment*-PCR zur Anreicherung mutierter Allele des *K-RAS* Gens, die anhand der Fragmentgröße nach dem Restriktionsenzym-Verdau identifiziert werden können.

Für die erste PCR-Reaktion wurde unter Verwendung der FastStart Taq DNA Polymerase (Roche) ein Ansatz aus folgenden Komponenten hergestellt:

1 – 5 µl DNA (ca. 100 ng)  
5 µl 10 x Puffer  
1 µl dNTP's (10 mM)  
1 µl Primer 5' BstN1 (25 µM)  
1 µl Primer 3' WT (25 µM)  
1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
0,28 µl Polymerase (5 U / µl)  
35,2 – 39,2 µl Millipore-H<sub>2</sub>O

Die PCR-Reaktion wurde mit dem folgendem Programm durchgeführt:

	5 min	95 °C (Denaturierung)
30 Zyklen:	1 min	94 °C (Denaturierung)
	1 min	60 °C (Primer-Hybridisierung)
	1 min	72 °C (Elongation)
	10 min	72 °C (Vervollständigung der Elongation)

Anschließend wurde ein Ansatz aus 2,5 µl PCR-Produkt, 2 µl Mva I (10 U / µl; schneidet wie BstN1), 2 µl Puffer R<sup>+</sup> und 13,5 µl Millipore-H<sub>2</sub>O hergestellt und 4 - 12 h bei 37 °C inkubiert (erster Verdau).

Für die zweite PCR-Reaktion wurde ein Ansatz aus folgenden Komponenten hergestellt:

10 µl Produkt aus dem ersten Verdau  
5 µl 10 x Puffer  
1 µl dNTP's (10 mM)  
1 µl Primer 5' BstN1 (25 µM)  
1 µl Primer 3' BstN1 (25 µM)  
1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
0,24 µl Polymerase (5 U / µl)  
30,2 µl Millipore-H<sub>2</sub>O

Die Inkubation während der zweiten PCR entsprach der Inkubation während der ersten PCR.

Im zweiten Verdau wurden 10 µl des zweiten PCR-Produktes 4 - 12 h bei 37 °C mit 2 µl Mva I, 2 µl Puffer R<sup>+</sup> und 6 µl Millipore-H<sub>2</sub>O inkubiert.

Die Auftrennung der Produkte (5 µl) aus dem zweiten Verdau erfolgte in einem 5 %igem Polyacrylamid-Gel.

### 3.6.5 Quantitative PCR am LightCycler (Roche)

Die quantitative PCR am LightCycler diente zur Verifizierung von Genexpressionsunterschieden, die auf den Arrays zwischen Tumor- und Normalgewebe identifiziert worden waren.

Die Software Primer3 (Steve Rozen and Helen J. Skaletsky; öffentlich zugänglich unter [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) wurde zur Auswahl von Primern mit ähnlichen Hybridisierungstemperaturen verwendet, um einheitliche PCR-Bedingungen zu ermöglichen. Durch Datenbankrecherchen (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) konnte bestätigt werden, daß keine Homologien zu anderen menschlichen Genen vorhanden waren. Es wurden ausschließlich Gene untersucht, bei denen keine Pseudogene gefunden wurden und durch Positionieren von mindestens einem Primer über einem Exon-Exon-Übergang in der cDNA die Amplifikation von DNA ausgeschlossen werden konnten. Die quantitative PCR im LightCycler wurde mit dem Kit FastStart DNA Master SYBR Green durchgeführt:

Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

2 µl cDNA (1:20 verdünnt)	
2,4 µl MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)
0,4 µl Primer	(25 µM)
2 µl LC MasterSYBR Green	
13,2 µl Millipore-H <sub>2</sub> O	

Die PCR-Reaktion wurde mit dem folgendem Programm durchgeführt:

10 min	94 °C	(Denaturierung der cDNA und Aktivierung der FastStart Polymerase)
40 - 50 Zyklen:	15 sec	95 °C (Denaturierung)
	10 sec	58 °C (Primer-Hybridisierung)
	10 sec	72 °C (Elongation)

Die Temperaturwechsel erfolgten jeweils mit 20 °C / sec.

Die Spezifität des amplifizierten PCR-Produktes wurde durch eine nachfolgende Schmelzpunkt-Analyse überprüft, die nach folgendem Programm durchgeführt wurde: 0 sec 95 °C, mit 20 °C / sec auf 40 °C, 15 sec 40 °C, mit 0,1 °C / sec auf 95 °C.

Die Expression der interessanten Gene (Zielgene) wurde jeweils relativ zur Expression eines Referenzgens untersucht. Die Transkriptmenge in den untersuchten Tumor- und Normalgeweben wurde dabei indirekt anhand des *crossing point* (Zyklenzahl, bei der sich die Fluoreszenz vom Hintergrund abhebt, Berechnung über die Methode *2<sup>nd</sup> Derivative Maximum*) verglichen. Um die unterschiedlichen Effizienzen der Zielgen- und Referenzgen-PCR bei der relativen Quantifizierung zu berücksichtigen, wurde mit Hilfe der Software Relative Quantification Software Version 1.0 (Roche) für alle Zielgene zunächst ein sogenannter *Coefficient file* erstellt. Die *Coefficient files* wurden berechnet, indem anhand von Standardkurven (mindestens sechs verschiedenen cDNA-Konzentrationen zwischen 1:10 – 1:1000, jeweils zwei oder drei Replikate) die Effizienzen der verschiedenen Zielgen-PCR's und der Referenzgen-PCR bestimmt und von der Software paarweise aufeinander abgeglichen wurden. In allen Proben konnte dann die Expression eines Ziel- und Referenzgens parallel in

einem LightCycler-Experiment bestimmt werden (Proben jeweils im Duplikat). Das Verhältnis der Genexpression vom Zielgen im Tumor- gegenüber dem Normalgewebe ergab sich aus dem Verhältnis Zielgen / Referenzgen im Tumor im Vergleich zum Verhältnis Zielgen / Referenzgen im entsprechenden Normalgewebe. Die Software berücksichtigte bei der Berechnung der Verhältnisse die unterschiedlichen Amplifikationseffizienzen der PCR-Reaktionen anhand des *Coefficient files*.

## 3.7 Präparation und Aufreinigung von Nukleinsäuren

### 3.7.1 Fällung von Gesamt-RNA

Die Fällung der Gesamt-RNA aus Patientenmaterial erfolgte zur Erhöhung und Einstellung der RNA-Konzentration für die Hybridisierungsexperimente.

Die RNA wurde mit 1 / 10 Volumen 2 M NaAc und insgesamt 2,5 Volumen EtOH (95 %) versetzt, gemischt (Vortex) und 1 h auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (Biofuge 22R, 15 min, 15.000 g, 4 °C) wurde der Überstand abgezogen, das Pellet mit EtOH (80 %) versetzt und einmal durch vorsichtiges Schwenken des ERG gewaschen. Der Alkohol wurde zum großen Teil nach erneuter Zentrifugation (15 min, 15.000 g, 4 °C), bzw. vollständig nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 15.000 g, 4 °C) entfernt. Das Pellet trocknete bei RT innerhalb von 15 min und konnte dann durch zeh- bis 20-faches Überspülen der ERG-Innenwand mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O (Clontech) gelöst werden. Die H<sub>2</sub>O-Menge wurde so bestimmt, daß die gelöste RNA eine Konzentration von ca. 2,5 µg / µl hatte. Die Messung der Konzentration erfolgte mit einem Gene Quant II Photometer, anschließend wurde die RNA auf eine Konzentration von genau 2,5 µg / µl eingestellt. 1 µl dieser RNA wurde zur Überprüfung der RNA-Qualität auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die Lagerung der restlichen RNA erfolgte bei -80 °C.

### 3.7.2 Fällung von PCR-Produkten

Vor der Sequenzierung von PCR-Produkten mußten diese mittels einer PEG-Fällung von ungebundenen Primern und Nukleotiden gereinigt werden. Die PCR-Produkte wurden im Verhältnis 1 : 1 mit einem PEG-Mix (siehe 2.5) gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (ETZ, 25 min, 13.000 Upm, RT) wurde der Überstand abgezogen und das Pellet mit EtOH (100 %) durch zweimaliges Schwenken des ERG gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (ETZ, 10 min, 13.000 Upm, RT) wurde der Überstand abgezogen, das Pellet 2 min in der SpeedVac getrocknet und wieder in 12 µl Millipore-H<sub>2</sub>O aufgenommen (ETM, 10 min, 500 Upm, 37 °C). Auf einem Agarose-Gel wurde die Konzentration der PCR-Produkte überprüft und in geeigneter Menge (0,5 – 5 µl) in die Sequenzreaktion eingesetzt.

### 3.7.3 Reinigung von PCR-Produkten

Der QIAquick PCR Purification Kit wurde verwendet, um die im PCR-Ansatz enthaltenen freien Nukleotide, überschüssigen Primer und Enzyme zu entfernen und damit die Verwendung der PCR-Produkte für nachfolgende Hybridisierungs- und Markierungsreaktionen zu ermöglichen.

Die Aufreinigung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Zur Elution wurden 30 µl Elutionspuffer verwendet und die Konzentration der PCR-Produkte dann mit dem Gene Quant II Photometer bestimmt.

### 3.7.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen mittels GENE-CLEAN (GENECLEAN II Kit, BIO 101) wurden entsprechende Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus Ethidiumbromid-gefärbten Gelen ausgeschnitten. Die Agarose-Blöckchen wurden anschließend in einem ERG mit 3 Volumen 6 M NaJ inkubiert (ETM, 500 Upm, 5 min, 55 °C), bis die Agarose gelöst war (zwischendurch mischen). Nach Zugabe von 5 µl „Glasmilch“ folgte eine Inkubation für 5 min auf Eis (Absorption der DNA an die Glasmilch, zwischendurch mischen), dann wurde die „Glasmilch“ mit der gebundenen DNA abzentrifugiert (ETZ, 13000 Upm, 5 sec, RT). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-haltige Glaspulver mit 700 µl eiskaltem *New Wash* Puffer insgesamt dreimal gewaschen (Glasmilch durch Pipettieren resuspendieren und abzentrifugieren). Anschließend konnte die DNA durch Zugabe von 20 µl H<sub>2</sub>O während einer dreiminütigen Inkubation bei 55 °C von der Glasmilch freigesetzt werden. Nach Zentrifugation (ETZ, 13000 Upm, 1 min, RT) wurde der DNA-haltige Überstand abgezogen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

## 3.8 Auftrennung von Nukleinsäuren

### 3.8.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA in analytischen Agarose-Gelen

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA wurden 2 %ige Agarose-Gele hergestellt. Eine entsprechende Menge Agarose wurde dazu in 1 x TAE-Puffer in einer Mikrowelle geschmolzen und nach Abkühlen auf handwarme Temperatur in eine Gießstation gegossen und ausgehärtet. 2 – 5 µl Probe wurden mit 2 µl DNA-Auftragspuffer gemischt und parallel zu einem Längenstandard (*HindIII* geschnittene λ-DNA) bei einer Spannung von 110 V und einem Elektrodenabstand von 14,5 cm in 30 – 40 min elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele 15 min lang in einer 0,0005 %igen Ethidiumbromidlösung gefärbt und nach kurzem Wässern auf einem UV-Leuchtschirm (Bachhofer) bei 254 nm fotografiert.

Bei der Auftrennung der RNA wurden 1 %ige Agarose-Gele verwendet. Die Herstellung der Gele sowie die Behandlung der Proben folgte analog dem für DNA beschriebenen Protokoll. Allerdings wurden alle Lösungen für die Herstellung und das Färben der RNA-Gele mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O angesetzt und die Gelapparatur kurz vor der Benutzung mit EtOH (70 %) und DEPC-H<sub>2</sub>O ausgespült. Die Auftrennung erfolgte für 2 h bei einer Spannung von 80 V.

### 3.8.2 Elektrophoretische Auftrennung von RNA für Northern Blots

Für Northern Blots erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der RNA in 1,5 %igen Agarose-Gelen. Bei der Herstellung der Gele wurden 1,5 g Agarose mit 10 ml 10 x MOPS und 73 ml DEPC-H<sub>2</sub>O aufgekocht, auf ca. 50 °C (handwarm) abgekühlt, mit 17 ml 37 %igem Formaldehyd versetzt und anschließend in eine mit EtOH (70 %) und DEPC-H<sub>2</sub>O ausgewaschene Gießstation gegossen. Die RNA (10 µg in 4,5 µl) wurde mit 2 µl 10 x MOPS, 3,5 µl 37 %igem Formaldehyd und 10 µl Formamid versetzt, 15 min bei 70 °C inkubiert und nach Zugabe von 2 µl RNA-Auftragspuffer bei einer Spannung von 60 V in 3 h elektrophoretisch aufgetrennt (Elektrodenabstand 19 cm).

### 3.8.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Verdaute PCR-Produkte aus der *Enrichment*-PCR für *K-RAS* wurden zur besseren Auflösung der Fragmentlängen in einem 5 % igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurden Acrylamidlösung, 10 x TBE, H<sub>2</sub>O, TEMED und APS durch Schwenken gemischt und auf eine Folie (Gel-Fix for PAG, Serva) zwischen gereinigte (H<sub>2</sub>O und 70 % EtOH) 20 x 16 bzw. 20 x 18 cm große Glasplatten in einer Gießstation (BIO RAD) gegossen. Nach der Polymerisation und Vorlauf (150 V, 10 min) des unbeladenen Gels in einer PROTEAN II xi *Cell*-Apparatur (BIO RAD) erfolgte die Auftrennung der Proben (5 µl verdautes PCR-Produkt + 3 µl DNA-Auftragspuffer) in Gegenwart von 1 x TBE parallel zum Standard (*Hinf*I geschnittene ΦX174 DNA). Die Spannung betrug 220 Volt, und das Gel lief 75 min, bevor es wie Agarose-Gele gefärbt und photographiert wurde (siehe 3.7.1).

## 3.9 DNA-Sequenzanalyse

In dieser Arbeit wurden DNA-Sequenzen mit einem Sequenzierautomaten ABI PRISM 310, (Applied Biosystems) unter Verwendung des BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) erhalten.

Die Sequenzbestimmung erfolgte im Prinzip nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977). Durch Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase ist die Durchführung der Sequenzierung als wiederholte Zyklen thermischer Denaturierung und Primer-Hybridisierung / Elongation (*cycle-sequencing*, Murray, 1989) möglich. Die im Kit enthaltene AmpliTaq Polymerase FS ist eine Doppelmutante ohne 5'-3'-Nuklease-Aktivität und einer höheren Akzeptanz für fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide, deren Einbau während der Elongation zum Kettenabbruch führt. Die Laser-vermittelte Anregung der markierten Didesoxynukleotide ermöglicht bei der elektrophoretischen Auftrennung der Sequenzierprodukte die Detektion der Terminationsprodukte.

Jeder Sequenzieransatz bestand aus folgenden Komponenten:

5 µl Premix	(BigDye Terminator Mix: fluoreszenzmarkierte ddNTP's, dNTP's, AmpliTaq Polymerase, Inkubationspuffer)
2 µl Primer	(3,2 µM)
1 – 3 µl PCR-Produkt	
H <sub>2</sub> O ad 20 µl	

Dieser Ansatz wurde 3 min bei 95 °C inkubiert, dann folgten 25 Zyklen bestehend aus 10 sec 96 °C, 5 sec 50 – 60 °C und 4 min 60 °C.

Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung der Sequenzierprodukte wurden diese noch durch eine Ethanol-Präzipitation von nicht-gebundenen Primern und Nukleotiden gereinigt. Dafür wurden 20 µl des Sequenzieransatzes zu einer Lösung aus 80 µl Millipore-H<sub>2</sub>O, 10 µl NaAc (3 M, pH 4,6) und 250 µl EtOH (100 %) gegeben und gemischt (Vortex). Nach 20 min Inkubation (RT, Dunkel) wurde zentrifugiert (ETZ, 13000 Upm, 20 min, RT) und der Überstand abgekippt. Das Pellet wurde durch Zugabe von 250 µl frisch verdünntem EtOH (70 %) gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (ETZ, 13000 Upm, 10 min, RT), der EtOH wurde abpipettiert und das Pellet in der SpeedVac 2 min getrocknet.

Kurz vor der Auftrennung erfolgte die Denaturierung der Sequenzierprodukte in 25 µl Puffer TSR (ETM, 500 Upm, 2 min, 90 °C). Nachdem die Lösung auf Eis abgekühlt worden war, wurde sie in die Reaktionsgefäße für den Sequenzierautomaten überführt.

### **3.10 Hybridisierung und Detektion von Nukleinsäuren**

#### **3.10.1 Übertragung von DNA und RNA aus Agarose-Gelen auf Nylonmembranen (Southern Blot, Northern Blot)**

DNA aus Agarose-Gelen wurde durch Kapillartransfer (Southern Blot, Southern, 1975) auf Nylonmembranen übertragen. Dazu wurden die Gele nach der Elektrophorese, Färbung und photographischen Dokumentation (siehe 3.7.1) 10 min in eine Vorbereitungslösung (siehe 2.5) gelegt und anschließend unter leichter Bewegung nacheinander jeweils 30 min in Denaturierungslösung und Neutralisierungslösung inkubiert. Der Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte ÜN in Gegenwart von 20 x SSC. Anschließend wurde die DNA mittels UV-Licht („Auto-Crosslink“ 120000 µJoules bei 254 nm, UV Stratalinker 2400, Stratagene) kovalent mit dem Membranmaterial verbunden.

RNA-haltige Agarose-Gele wurden nach der Elektrophorese 15 min in 20 x SSC inkubiert, dann wurde die RNA ÜN in Gegenwart von 20 x SSC auf eine Nylonmembran übertragen (Northern Blot) und durch UV-Licht kovalent mit dem Membranmaterial verbunden. Die Membran wurde zur Überprüfung des RNA-Transfers 45 sec in einer Lösung aus 0,03 % Methylenblau in 0,3 M NaAc pH 5.2 gefärbt, ca. 1 min in Millipore-H<sub>2</sub>O entfärbt und photographiert.

#### **3.10.2 Übertragung von PCR-Produkten auf Nylonmembranen (Dot Blot)**

Die Nylonmembranen wurden in Millipore-H<sub>2</sub>O getränkt und auf 2 Lagen feuchtem 3 MM-Whatman-Papier in die Dot Blot-Apparatur (Dot Blot 96-System, Biometra) eingebaut. PCR-Produkte bestimmter Konzentrationen wurden in einem Volumen von 100 µl 7 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Von dort aus wurden sie in vier Aliquots von jeweils 25 µl in die Vertiefungen der Dot Blot-Apparatur pipettiert und durch Anlegen eines Vakuums (200-300 mbar) auf die Membran übertragen. Die Membran wurde noch 3 - 5 min trocken gesaugt, 30 min an der Luft getrocknet, 5 min in einer Denaturierungslösung inkubiert (Denaturierung der DNA) und anschließend 2 x 5 min in eine Neutralisierungslösung gelegt. Nach Schwenken der Membranen in 2 x SSC erfolgte die kovalente Verbindung der DNA mit der Membran mittels UV-Licht (siehe 3.10.1).

### 3.10.3 Markierung von DNA-Sonden

Die Herstellung radioaktiver DNA-Sonden erfolgte zur Hybridisierung der Blots (3.10.1, 3.10.2) und der Arrays des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH (RZPD). Die Markierung von DNA wurde dabei nach der *random priming*-Methode mit Hilfe des Oligolabelling Kits (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt: PCR-amplifizierte, gereinigte DNA bzw. durch Restriktionsenzyme gespaltene (siehe 3.11) und aus Agarose-Gelen eluierte DNA (siehe 3.8.4) wurde in einem Volumen von 34 µl 10 min bei 98 °C denaturiert und sofort für mind. 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 µl Reaktionsmix, 5 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP (3000 Ci / mmol) und 1 µl Klenow-Enzym folgte eine Inkubation bei 37 °C für 60 min, in der die Gegenstrang-Synthese unter dem Einbau radioaktiver Nukleotide stattfand. Zur Entfernung überschüssiger Nukleotide wurden die markierten DNA-Fragmente dann über MicroSpin S-200 HR Columns (Amersham Pharmacia Biotech) gereinigt, in 50 µl Puffer eluiert und je 1 µl in 3 ml Szintillationslösung mit einem Szintillationsgerät (Liquid Scintillation Counter, Pharmacia) gemessen.

### 3.10.4 Prähybridisierung und Hybridisierung (Blots und RZPD-Arrays)

Vor der Hybridisierung der Blots (3.10.1, 3.10.2) bzw. Arrays (RZPD) wurden die Nylonmembranen mit der kovalent gebundenen DNA oder RNA zur Absättigung freier Bindungsplätze mit 6 bis 20 ml (je nach Filtergröße) Hybridisierungslösung (ULTRAhyb, Ambion) ein bis mehrere Stunden bei 42 °C in einem Hybridisierungsofen rotierend inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der frisch denaturierten (10 min, 98 °C) Sonde und die Hybridisierung wurde ÜN bei 42 °C fortgesetzt.

Am nächsten Tag wurden die Filter 2 x 5 min in 2 x SSC, 0,1 % SDS und 2 x 15 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 42 °C gewaschen, auf feuchtes Whatman-Papier gelegt und in Frischhaltefolie eingeschlagen. Die Detektion der Signale erfolgte durch Exposition gegen einen lichtempfindlichen Röntgenfilm in Gegenwart einer Verstärkerfolie bei -80 °C ÜN.

## 3.11 Spalten von DNA durch Restriktionsenzyme

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme fand zur Isolierung von cDNA-Fragmenten aus Bakterienplasmiden statt. Dazu wurden 5 µl Plasmid-DNA mit 1 µl 10 x Restriktionspuffer und je 0,5 µl Restriktionsenzym (10 U / µl) in einem Volumen von 10 µl zusammengegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in diesem Fall nach Zugabe von 2 µl Beladungspuffer auf einem 1 %igen Agarose-Gel bei 80 V für 2 h (Elektrodenabstand 14,5 cm).

## 3.12 Erstellung und Analyse von RNA-Expressionsprofilen mit cDNA-Arrays

### 3.12.1 Hybridisierung (Atlas Human Cancer 1.2 Array)

Für die Erstellung von RNA-Expressionsprofilen der Tumor- und Normalgewebe-Proben wurden Atlas Human Cancer 1.2 Arrays der Firma Clontech verwendet. Diese Arrays bestehen aus 8 x 12 cm großen Nylonmembranen und enthalten neben neun Haushaltsgenen



1176 Zielsequenzen von Genen, deren Dysregulation bekanntermaßen oder potentiell tumorrelevant ist.

Für die Prähybridisierung der Filter mußten zunächst 5 ml ExpressHyb (Clontech) 30 min bei 68 °C inkubiert und zwischendurch geschwenkt werden, um alle enthaltenen Substanzen in Lösung zu bringen. Pro Filter wurden 0,5 mg *Salmon Sperm DNA* 5 min bei 99 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt (mindestens 2 min) und zur 68 °C warmen Hybridisierungslösung gegeben. Bis zur Verwendung konnte diese Mischung bei 68 °C aufbewahrt werden. Die bei -20 °C gelagerten Membranen wurden aufgetaut, mit Millipore-H<sub>2</sub>O befeuchtet und in eine Hybridisierungsflasche gegeben. Es folgte die Zugabe von 5 ml Hybridisierungslösung (inklusive der *Salmon Sperm DNA*), die kurz durch Schwenken verteilt wurde, bevor die Flasche in den auf 68 °C vorgeheizten Ofen eingespannt wurde. Die Dauer der Prähybridisierung lag zwischen 6 und 8 h.

Die cDNA-Sonden für die Hybridisierungsexperimente wurden aus 5 µg Gesamt-RNA eng nach Vorschlag der Firma Clontech wie folgt hergestellt: Die RNA wurde zusammen mit 1 µl CDS Primer Mix in einem Volumen von 3 µl für 2 min bei 70 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach Erwärmen auf 48 °C für 2 min wurde ein Reaktionsmix aus 2 µl Reaktionspuffer, 1 µl 10 x dNTP Mix, 0,5 µl 100 mM DTT, 3,5 µl [ $\alpha^{32}$ P]dATP (3000 Ci / mmol; 10 µCi / µl) und 1 µl Superscript<sup>TM</sup> II RNase H<sup>-</sup> Reversen Transcriptase (Gibco) zugefügt. Die Inkubation wurde bei derselben Temperatur für 25 min fortgesetzt, durch Zugabe von 1 µl 10 x Terminationsmix gestoppt und auf Eis bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die Reinigung der radioaktiven cDNA erfolgte mit *NucleoSpin Extraction Spin Columns* (Clontech) nach Protokoll des Herstellers. Von den 100 µl der gereinigten Sonde wurden 2 µl in 3 ml Szintillationslösung gegeben und der Einbau von <sup>32</sup>P mit einem Szintillationsgerät (Liquid Scintillation Counter, Pharmacia) überprüft. Die restliche Sonde wurde mit 11 µl 10 x Denaturierungslösung gemischt und nach einer Inkubation von 20 min bei 68 °C kurz abzentrifugiert. Nach Zugabe von 5 µl COT-1 DNA und 115 µl 2 x Neutralisierungslösung wurde 10 min bei 68 °C weiter inkubiert und erneut kurz abzentrifugiert. Anschließend konnte die Sonde direkt zu den prähybridisierten Arrays gegeben werden; wenn mehrere Hybridisierungen gleichzeitig durchgeführt wurden, wurden die Sonden bis zur Zugabe bei 68 °C aufbewahrt. Die Hybridisierung erfolgte ÜN (16 bis 20 h).

Nach Abgießen der radioaktiven Sonde wurden die Membranen in den rotierenden Flaschen gewaschen: 4 x 30 min in 200 ml 2 x SSC, 1 % SDS bei 68 °C, 1 x 30 min in 200 ml 0,1 x SSC, 0,5 % SDS bei 68 °C, 1 x 5 min in 200 ml 2 x SSC bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden dann auf feuchtes Whatman-Papier gelegt, in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit einem lichtempfindlichen Röntgenfilm in Gegenwart einer Verstärkerfolie bei -80 °C ÜN exponiert.

Anschließend folgte die Exposition der Membranen mit einem PhosphoImager-Screen für 4 Tage bei Raumtemperatur. Die Array-Bilder auf dem Screen wurden bei 100 micron von einem PhosphoImager (Storm 860, Molecular Dynamics) gescannt und im *gel*-Format abgespeichert. Die Signalintensitäten an den einzelnen Spots wurden anschließend mit der Software AtlasImage 2.0 (Clontech) berechnet und in eine Exceltabelle exportiert. Die Berechnung der relativen Genexpressionsunterschiede beim paarweisen Vergleich der 25 Primärtumoren mit dem jeweiligen korrespondierenden Normalgewebe wurden nach globaler Normalisierung durch die Software durchgeführt.

### 3.12.2 Clusteranalyse

Zum komplexen Vergleich der Expressionsprofile aller Proben wurden Clusteranalysen durchgeführt. Das Ergebnis dieser Analysen konnte in Form von Stammbaum-ähnlichen Dendrogrammen dargestellt werden, in denen die Proben nach der Ähnlichkeit ihrer Expressionsprofile zueinander angeordnet waren. Eine hierarchische Clusteranalyse wurde mit der Software Cluster 2.02 durchgeführt, das resultierende Dendrogramm mit der Software Treeview 1.45 sichtbar gemacht (Eisen et al., 1998). Beide Programme sind im Internet unter <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm> zugänglich. Die Signalintensitäten wurden bei der Clusteranalyse zunächst logarithmisch transformiert (*Log Transform Data*), um den Median zentriert (*Median Center Genes, Median Center Arrays*) und normalisiert (*Normalize Genes, Normalize Arrays*). Nach Speichern dieser Daten wurden die Gene eliminiert, die in weniger als 80 % der Arrays einen Wert über Null hatten ( $\% \text{ Present} \geq 80$ ), bevor unter der Einstellung *Correlation (uncentered)* eine hierarchische Clusteranalyse (*Average Linkage Clustering*) über Gene und Arrays (*Cluster Genes, Cluster Arrays*) durchgeführt wurde.

### 3.12.3 Normalisierung der Array-Expressionsdaten

Bei der Normalisierung werden Differenzen in der Hybridisierungsstärke kompensiert, die aufgrund leicht unterschiedlicher Filterqualität bzw. durch Einflüsse von Varianzen während der Reversen Transkription, Probenreinigung, Hybridisierungsreaktion und den Waschschritten unvermeidlich auftreten.

Es wurden unterschiedliche Ansätze zur Normalisierung der Expressionsintensitäten gewählt:

- 1.) Für die Clusteranalysen wurden die nicht-normalisierten Intensitäten (*Adjusted Intensities* = Intensitäten abzüglich Hintergrund, bestimmt von der Software AtlasImage 2.0) aller Arrays innerhalb einer Tabelle als Textdatei abgespeichert. Die Normalisierung der Intensitäten erfolgte anschließend mit der Software Cluster 2.02 wie unter 3.12.2 beschrieben
- 2.) Um die Expressionsintensitäten einzelner Gene zwischen den verschiedenen Geweben vergleichen zu können, wurden alle Arrays mit der Software AtlasImage 2.0 relativ zu einem digitalen Referenz-Array normalisiert (globale Normalisierung, *Sum method*). Der Referenz-Array wurde mit der Software AtlasImage 2.0 aus acht verschiedenen Normalgeweben (Patienten 04, 16, 18, 25, 26, 28, 29 und 30) erstellt.
- 3.) Für den paarweisen Vergleich der Expressionsintensitäten von Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe, wurden die zu vergleichenden Arrays mit der Software AtlasImage 2.0 jeweils global gegeneinander normalisiert (*Sum method*).

### 3.12.4 Statistische Auswertung

Um die statistische Signifikanz differentieller Genexpression zu bestimmen, wurde der Mann-Whitney-U-Test im Programm SPSS 10.0 verwendet (Nichtparametrische Tests, 2 unabhängige Stichproben). Für diese Analyse mußten die Signalintensitäten zunächst normalisiert werden. Diese Normalisierung erfolgte einerseits im Programm Cluster 2.0, andererseits wurde auf einen digitalen Referenz-Array normalisiert (siehe 3.12.3). Nur Gene, die nach beiden Normalisierungsmethoden statistisch hoch signifikant differentiell exprimiert waren (Irrtumswahrscheinlichkeit  $P < 0.001$ ), wurden als verlässliche Kandidatengene betrachtet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Differentielle Genexpression zwischen der normalen Darmschleimhaut, kolorektalen Karzinomen und Lebermetastasen

Die Genexpression von normaler Darmschleimhaut, kolorektalen Karzinomen und deren Lebermetastasen wurde untersucht, um Gene zu identifizieren, die während der Progression und Metastasierung kolorektaler Tumoren differentiell exprimiert werden.

#### 4.1.1 Auswahl der Patientenproben für die Hybridisierungsexperimente

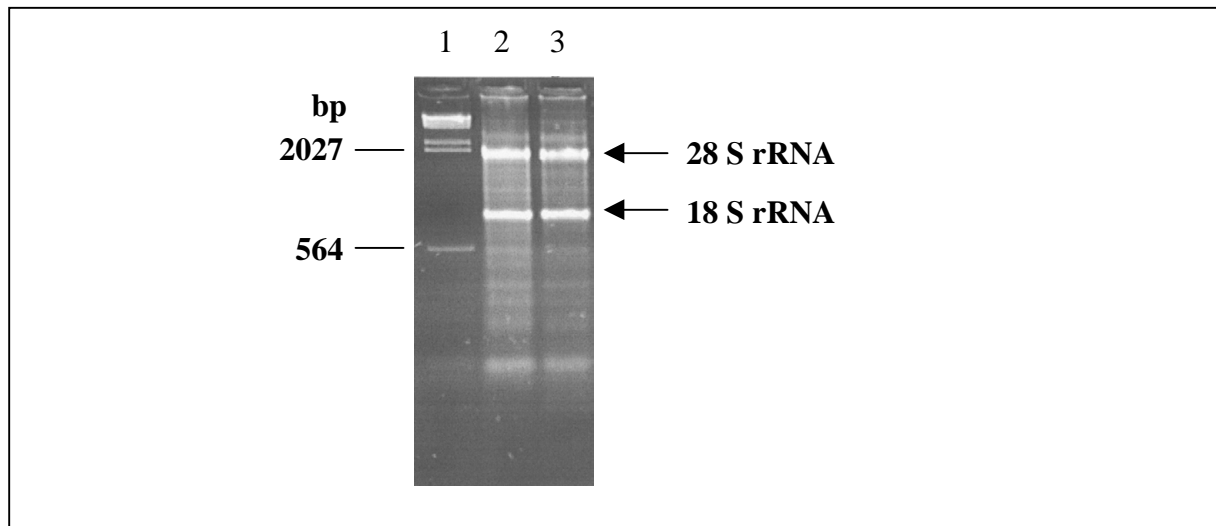
Im Zeitraum Juni 1999 bis Januar 2002 wurde eine Frischgewebe-Tumorbank (Lagerung -80 °C) mit 548 Patientenproben von insgesamt 260 verschiedenen Patienten angelegt: 198 kolorektale Tumorgewebe, 197 Proben normaler Darmschleimhaut, 103 Metastasen kolorektaler Tumoren, sechs Adenome und 44 Leber-Normalgewebe. Zur Dokumentation und Auswahl der gesammelten Proben dienten die Daten aus der Routine-Diagnostik am formalinfixierten Patientenmaterial. Von allen Metastasen und dem größten Teil der Tumoren wurden Gefrierschnitte angefertigt, um den Anteil maligner Zellen im Gewebe zu überprüfen. Dabei stellte sich heraus, daß die neoplastischen Gewebe (v.a. Metastasen) oftmals nicht geeignet waren, weil aufgrund von Nekrosen und infiltrierenden Leukozyten oder einer ausgeprägten Stomareaktion die in dieser Arbeit festgelegte Mindest-Anzahl von 70 % Tumorzellen nicht erreicht wurde. Gewebeproben von wenig fortgeschrittenen Tumoren (Stadium pT1 und pT2) enthielten in vielen Fällen zu große Bereiche von Adenom, dem noch gutartigen Vor-Stadium des Karzinoms, und konnten daher nicht verwendet werden.

Insgesamt wurden 25 kolorektale Tumoren unter Berücksichtigung des Tumor-Stadiums und des Lymphknotenstatus, entsprechendes normales Darmepithel derselben Patienten und 14 Lebermetastasen für die Genexpressionsanalysen ausgewählt (Tab. 1). Es wurden verschieden stark fortgeschrittene Tumoren (pT1- bis pT4-Tumoren) untersucht, um potentielle Stadium-abhängige Expressionsunterschiede in den Tumoren zu erfassen. Bei der Auswahl der Metastasen wurde besonders auf Fälle geachtet, bei denen sowohl der Primärtumor als auch folgende Lebermetastasen im Klinikum der Universität Regensburg entfernt und gesammelt worden waren. Sieben der 14 Lebermetastasen stammen daher von sechs Patienten, von denen auch Material des Primärtumors für Expressionsuntersuchungen verwendet wurde.

#### 4.1.2 Erstellung von Genexpressionsprofilen mit der cDNA-Array-Technik

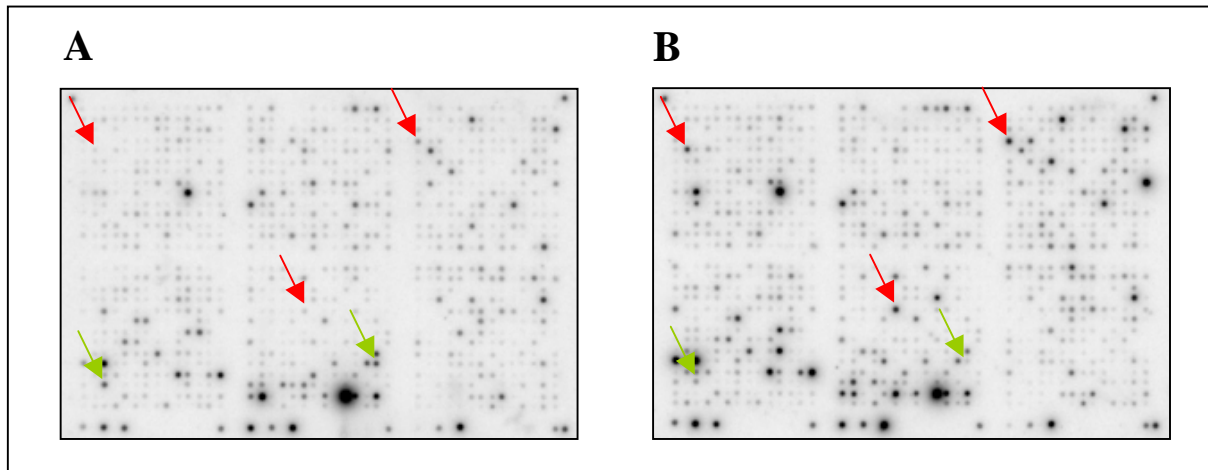
Um ein breites Spektrum von Genen in den Geweben zu untersuchen, wurden Array-Hybridisierungen mit dem Atlas Human Cancer 1.2 Array (Clontech) durchgeführt. Auf diesen Arrays konnte die Expression von ca. 1.200 potentiell krebsrelevanten Genen gleichzeitig in einer Patientenprobe bestimmt werden.

Als Ausgangsmaterial für die Hybridisierungsexperimente diente Gesamt-RNA, die aus 15 bis 30 mg tiefgefrorenem Frischgewebe isoliert worden war. Die Integrität der RNA wurde durch elektrophoretische Auftrennung eines Aliquots überprüft und konnte bei allen untersuchten Proben anhand der intensiven Banden der 28 S und 18 S rRNA bestätigt werden (Abb. 6).



**Abb. 6:** 1 %iges Agarose-Gel mit repräsentativ ausgewählter Gesamt-RNA 1:  $\lambda$ HindIII; 2: 2  $\mu$ g RNA aus Normalgewebe von Patient 15; 3: 2  $\mu$ g RNA aus Tumorgewebe von Patient 15. Die Integrität der RNA ist erkennbar an den Banden der 18S und 28 S rRNA.

Je 5  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden in die reverse Transkription eingesetzt, in der die Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Moleküle aus den Gen-Transkripten erfolgte. cDNA-Moleküle banden während der anschließenden Hybridisierungsreaktion spezifisch an solche Spots auf dem Array, die korrespondierende Gen-Fragmente enthielten. Da die Menge gebundener cDNA-Moleküle mit der Intensität radioaktiver Signale am entsprechenden Spot korreliert, konnte anhand der Signalintensitäten die Expression der Gene bestimmt und zwischen verschiedenen Geweben verglichen werden (Abb. 7).



**Abb. 7:** Atlas Human Cancer 1.2 Arrays, hybridisiert mit radioaktiv markierter cDNA. Jeder Spot repräsentiert ein Gen. Die Pfeile zeigen auf Gene, die im Tumorgewebe überexprimiert (rot) bzw. unterrepräsentiert sind (grün). [A] Normale Darmschleimhaut von Patient 15. [B] Kolonkarzinom von Patient 15.

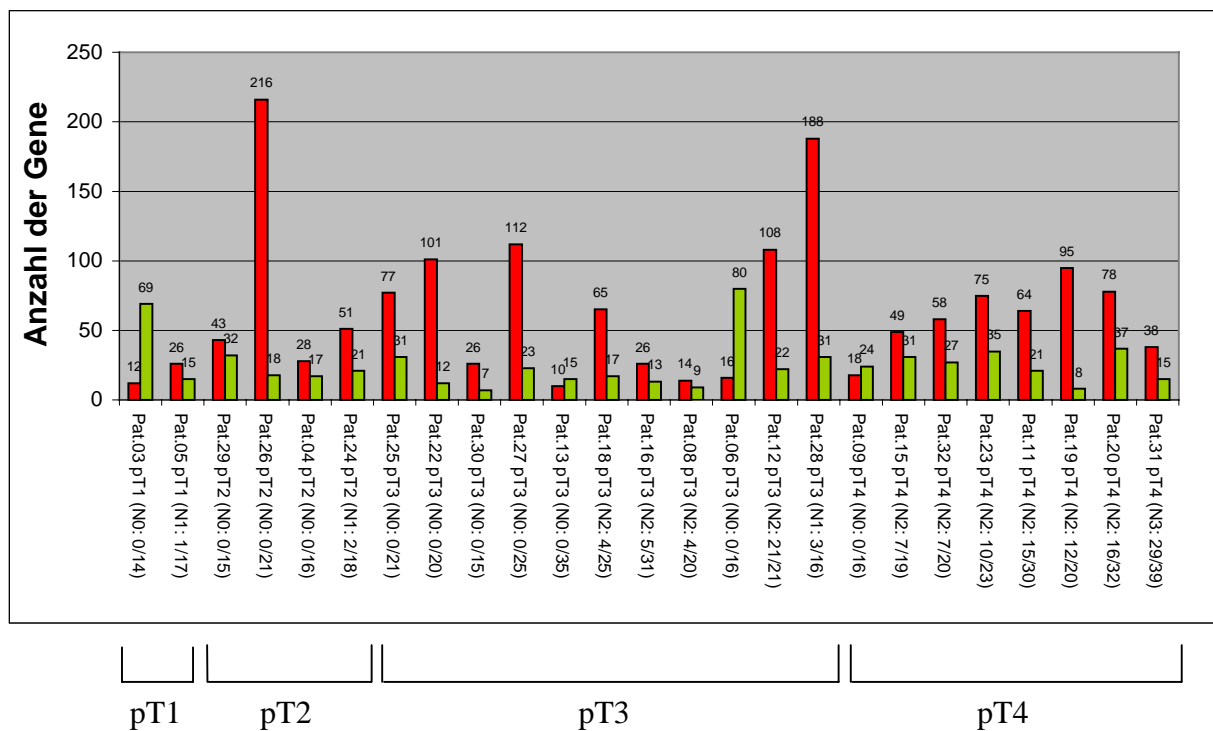
#### 4.1.3 Differentiell exprimierte Gene zwischen Primärtumoren und normaler Darmschleimhaut

Die Identifizierung von differentiell exprimierten Genen zwischen Tumor- und Normalgewebe, erfolgte mit Hilfe der Software AtlasImage 2.0 (Clontech) durch den paarweisen Vergleich der Tumor- / Normalgewebepaare von 25 Patienten (siehe Tab. 1). Bei diesem Vergleich wurden von der Software die Intensitäten aller Hybridisierungssignale in korrespondierenden Gewebeprobeen ermittelt und global zueinander normalisiert. Anhand der normalisierten Werte konnte für jedes Gen das Verhältnis der differentiellen Expression berechnet werden.

Zur Beschränkung auf deutliche Expressionsunterschiede wurden Gene ausgewählt, die zwischen Tumor- und Normalgewebe mindestens um den Faktor 4 differentiell exprimiert waren. Die Anzahl der selektierten Gene variierte dabei deutlich zwischen den verschiedenen Patientenproben. Während z.B. im Tumor von Patient 13 nur zehn Gene eine mehr als vierfache Überexpression im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe aufwiesen, wurden 210 Gene bei Patient 26 ermittelt. Auch die Anzahl der Gene, die in den Tumorgeweben geringer exprimiert waren, lag abhängig vom Patienten zwischen sieben und 80 (Abb. 8).

Um generelle Unterschiede in der Expression zwischen kolorektalen Tumor- und Normalgeweben zu ermitteln, wurde nach Genen gesucht, die in mehreren Tumoren eine deutliche differentielle Expression aufwiesen. Es wurden entsprechende Selektionskriterien

definiert, nach denen nur Gene berücksichtigt wurden, die in mindestens 25 % der untersuchten Tumoren eine mehr als vierfache Expression aufwiesen. Unter diesen Kriterien konnten 34 Gene identifiziert werden, die in den Tumorgeweben überexprimiert waren, 16 Gene zeigten in den Tumorgeweben eine geringere Expression als in den entsprechenden Normalgeweben (Tab. 2).



**Abb. 8:** Anzahl der Gene, die beim Vergleich der Primärtumoren mit dem jeweils korrespondierenden Normalgewebe derselben Patienten mindestens um den Faktor vier überexprimiert (rot) bzw. unterrepräsentiert (grün) waren.

**Tab. 2**

Accession Nummer	Gen-Name	Häufigkeit (%)	Maximum Ratio T / N	Durchschnitt Ratio T / N
<b>V00568</b>	<b>c-myc oncogene</b>	<b>88</b>	<b>41</b>	<b>12</b>
<b>X54942</b>	<b>cyclin-dependent kinase regulatory subunit (CKS2)</b>	<b>88</b>	<b>40</b>	<b>11</b>
M81934; S78187	CDC25B; CDC25HU2; M-phase inducer phosphatase 2	88	36	13
U18018	adenovirus E1A enhancer-binding protein; E1A-F; ets translocation variant 4	80	20	12
<b>M77349</b>	<b>BIGH3</b>	<b>76</b>	<b>41</b>	<b>15</b>
<b>J04164</b>	<b>interferon-inducible protein 9-27; interferon induced transmembrane protein 1 (IFITM)</b>	<b>72</b>	<b>39</b>	<b>13</b>
J03040	secreted protein acidic and rich in cysteine precursor (SPARC); osteonectin (ON); basement membrane protein (BM40)	72	56	13

**Fortsetzung Tab. 2**

Accession Nummer	Gen-Name	Häufigkeit (%)	Maximum Ratio T / N	Durchschnitt Ratio T / N
<b>AF019770</b>	<b>macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC1)</b>	<b>68</b>	<b>99</b>	<b>21</b>
U01038	serine/threonine-protein kinase PLK1 (STPK13)	68	43	14
X54941	cyclin-dependent kinase regulatory subunit 1 (CKS1)	68	13	7
M25753	G2/mitotic-specific cyclin B1 (CCNB1)	64	15	7
X02761; K00799; K02273; X00307; X00739	fibronectin precursor (FN)	60	35	13
M23619	high mobility group protein (HMG-I)	60	15	8
M65062	insulin-like growth factor binding protein 5 precursor (IGF-binding protein 5; IGFBP5; IBP5)	60	48	12
X60957; S89716	tyrosine kinase receptor tie-1 precursor	60	28	13
M15796; J04718	proliferating cyclic nuclear antigen (PCNA); cyclin	56	19	9
X57766	matrix metalloproteinase 11 (MMP11); stromelysin 3	52	20	9
<b>X99133</b>	<b>neutrophil gelatinase-associated lipocalin precursor (NGAL); 25-kDa alpha-2-microglobulin-related subunit of MMP9); lipocalin 2; oncogene 24P3</b>	<b>52</b>	<b>34</b>	<b>16</b>
X63629	cadherin 3 (CDH3); placental cadherin precursor (P-cadherin; CDHP)	52	24	10
J04088	DNA topoisomerase II alpha (TOP2A)	52	15	7
U12595	tumor necrosis factor type 1 receptor associated protein (TRAP1)	52	10	7
U19769	CENP-F kinetochore protein	52	15	8
U37436	bifunctional purine biosynthesis protein	52	15	8
X13293	B-myb	48	29	13
Z30183	metalloproteinase inhibitor 3 precursor; tissue inhibitor of metalloproteinases 3 (TIMP3); mitogen-inducible gene 5 (MIG5)	48	18	9
J02958	met proto-oncogene; hepatocyte growth factor receptor precursor (HGF-SF receptor)	48	18	9
M35410	insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	48	24	9
U59435	cell cycle protein P38-2G4 homolog; HG4-1	44	11	6
X62534	high mobility group protein HMG2	40	14	7
U10564	wee1Hu CDK tyrosine 15-kinase; wee-1-like protein kinase	40	18	9
S73885	AP4 basic helix-loop-helix DNA-binding protein	40	16	7
L33842	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (IMP dehydrogenase 2; IMPD2)	40	14	8
J04031	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase	40	9	6
J05272	IMP dehydrogenase 1	36	10	8

**Fortsetzung Tab. 2**

Accession Nummer	Gen-Name	Häufigkeit (%)	Maximum Ratio T / N	Durchschnitt Ratio T / N
U07418	mutL protein homolog; DNA mismatch repair protein MLH1; COCA2	36	16	8
U78525	eukaryotic translation initiation factor 3 beta subunit (EIF-3 beta); EIF3 P116	36	26	9
X16707	fos-related antigen (FRA1)	32	17	10
D30751 + M22490	bone morphogenetic protein 4 (BMP4) + bone morphogenetic protein 2B (BMP2B)	32	12	8
X16277	ornithine decarboxylase	32	12	7
X51688	G2/mitotic-specific cyclin A (CCNA; CCN1)	32		
X67081	histone H4	32	11	7
X59618	ribonucleoside-diphosphate reductase M2 subunit; ribonucleotide reductase	32	15	10
M90813 + D13639	G1/S-specific cyclin D2 (CCND2) + KIAK0002	28	12	6
U20770	CD82 antigen; inducible membrane protein R2; C33 antigen; metastasis suppressor kangai 1; suppressor of tumorigenicity 6	28	10	7
<b>U08854; X63359; U06641; J05428; Y00317</b>	<b>microsomal UDP-glucuronosyltransferase 2B15 precursor (UDPGT); UDPGTH-3; UGT2B15 + microsomal 2B10 precursor (UDPGT); UGT2B10 + 2microsomal B8 precursor</b>	<b>84</b>	<b>0.01</b>	<b>0.06</b>
J00220 + S71043	immunoglobulin alpha 1 heavy chain constant region (IgA1; IGHA1) + immunoglobulin alpha 2 heavy chain constant region (IgA2; IGHA2)	84	0,006	0,1
X66079	transcription factor Spi-B	76	0.06	0.12
M22324	microsomal aminopeptidase N; myeloid plasma membrane glycoprotein CD13	72	0.02	0.13
D13365; M93311	growth inhibitory factor; metallothionein-III (MT-III)	60	0.02	0.09
U17077	BENE	56	0.04	0.12
M22491	bone morphogenetic protein 3 (BMP3); osteogenin	52	0.03	0.09
X57086; X57331	IgC mu heavy chain constant region	48	0.02	0.10
U17075; L36844	cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B (CDKN2B); p14-INK4B; multiple tumor suppressor 2 (MTS2)	48	0.05	0.16
M34181	cAMP-dependent protein kinase beta-catalytic subunit (PKA C-beta)	44	0.12	0.19
M63438 + U72063	immunoglobulin rearranged gamma chain (IgG) + immunoglobulin kappa chain constant region (IgGK)	40	0.01	0.14
AJ000512	serum- & glucocorticoid-regulated serine/threonine protein kinase (SGK)	40	0.03	0.13
M60527	deoxycytidine kinase	36	0.03	0.14
X02811; X02744; M12783; M16288	platelet-derived growth factor B subunit precursor (PDGFB; PDGF2); bacaplermin; c-sis	32	0.02	0.09



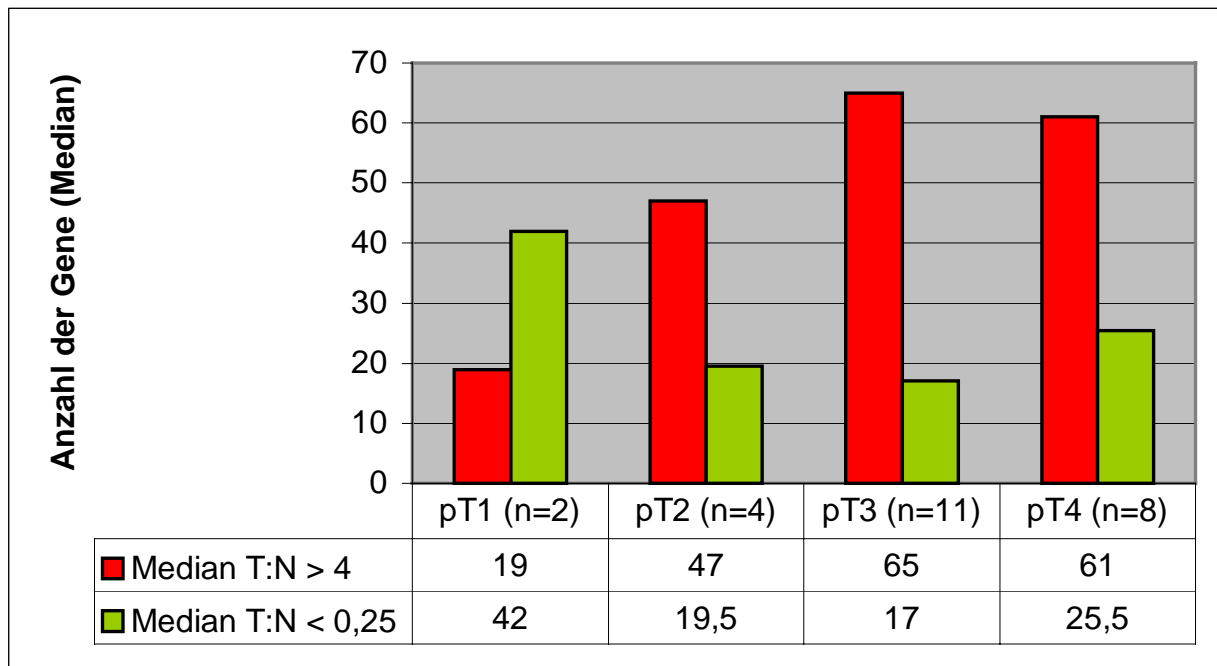
**Fortsetzung Tab. 2**

<i>Accession</i> Nummer	Gen-Name	Häufigkeit (%)	Maximum Ratio T / N	Durchschnitt Ratio T / N
M27749	immunoglobulin-related 14.1 protein precursor	32	0.03	0.14
Y00503	type I cytoskeletal 19 keratin; cytokeratin 19 (K19; CK19)	32	0.06	0.16
L17075	serine/threonine-protein kinase receptor R3 precursor (SKR3); activin receptor-like kinase 1 (ACVRL1; ALK1); TGF-beta superfamily receptor type I (TSR1)	32	0.08	0.18
M60314	bone morphogenetic protein 5 precursor (BMP5)	28	0.01	0.13

**Tab. 2:** Differentiell exprimierte Gene in 25 kolorektalen Tumoren (T) verglichen mit korrespondierender normaler Darmschleimhaut (N). Die Häufigkeit bezieht sich prozentual auf den Anteil der Patienten, bei denen die genannten Gene eine mindestens vierfache differentielle Expression aufwiesen. Angegeben sind auch das maximale und durchschnittliche Verhältnis der Genexpression zwischen diesen Tumor- und Normalgeweben. Gene, deren differentielle Expression mittels *real-time* PCR verifiziert wurde (s.u.) sind in Fettschrift gedruckt (anhand der *Accession*-Nummer kann die Identifizierung der Gene in Datenbanken erfolgen, die Auswahl der Gen-Namen erfolgte von der Firma Clontech).

#### **4.1.4 Korrelation zwischen der Zahl differentiell exprimierter Gene und dem Tumorstadium**

Nachdem in den Tumorgeweben verschiedener Patienten auffällige Unterschiede in der Genexpression festgestellt worden waren (siehe 4.1.3), wurde der Zusammenhang zwischen der Anzahl deutlich differentiell exprimierter Gene (Verhältnis der Genexpression zwischen Tumor- und Normalgewebe mindestens 4) und dem Tumorstadium überprüft. Obwohl die Zahl der Gene auch zwischen Tumoren desselben Tumorstadiums erheblich variierte, zeigte sich eine Tendenz für eine zunehmende Zahl an überexprimierten Genen zwischen pT1-, pT2- und pT3-Tumoren, während die unterrepräsentierten Gene in gleicher Richtung abnahmen (Abb. 9). Die Tendenz setzte sich zwischen pT3- und pT4-Tumoren allerdings nicht fort. (Bei pT1- und pT2-Tumoren sind Aussagen über die statistische Signifikanz der Unterschiede aufgrund der geringen Fallzahlen [n, erscheint in Abb. 9] nicht sinnvoll).



**Abb. 9:** Anzahl (Median) der differentiell exprimierten Gene in den verschiedenen Tumorstadien (pT1 – pT4). Berücksichtigt wurden Gene, die in den Tumoren mindestens um den Faktor vier überexprimiert (rot) bzw. unterrepräsentiert (grün) waren (n = Fallzahl).

#### 4.1.5 Verifizierung differentieller Genexpression durch relative quantitative RT-PCR (LightCycler)

Um die auf den Arrays detektierten Expressionsunterschiede repräsentativ mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurde die Expression von sieben Genen mittels *real-time* PCR am LightCycler (Roche) quantifiziert. Bei der Auswahl der Zielgene wurde auf deutliche Expressionsunterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe geachtet (siehe Tab. 2) und die Lage der Intron-Exon-Übergänge in den Genen berücksichtigt (4.1.5.1).

Das Prinzip der relativen Quantifizierung beruht auf der Expressionsanalyse eines Zielgens im Verhältnis zu einem Referenzgen, dessen Expression zwischen den untersuchten Geweben nicht variiert (Haushaltsgen). In dieser Arbeit wurden daher auch PCR-Amplifikationen für verschiedene Haushaltsgene etabliert, von denen das *TXBP151* (*Tax 1 binding protein 151*) aufgrund konstanter Expressionsdaten am besten als Referenzgen geeignet war (4.1.5.2).

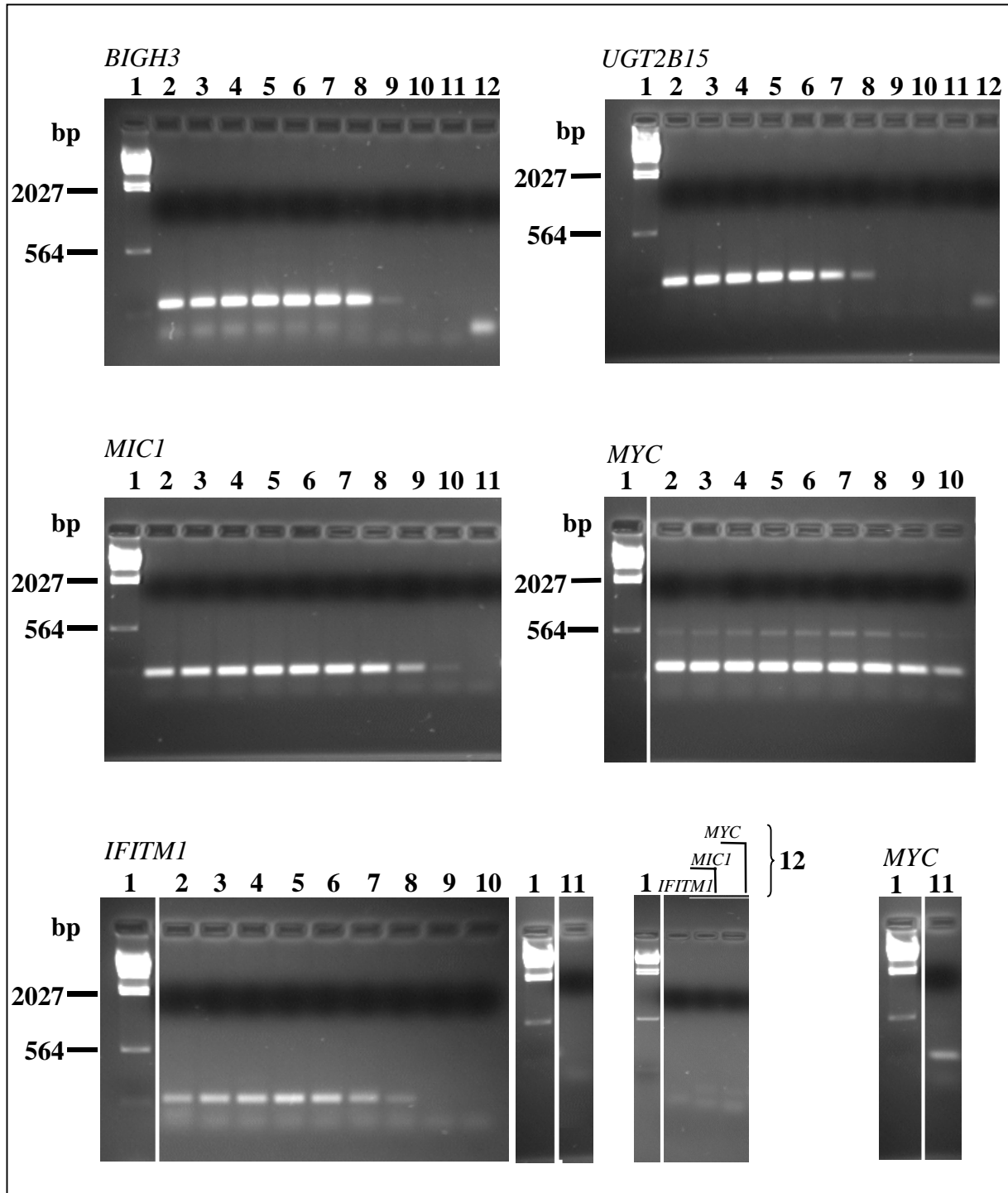
#### 4.1.5.1 Primerauswahl für die Zielgene

Die Primer für die Zielgene *CKS2*, *BIGH3*, *MYC*, *MIC1*, *UGT2B15*, *NGAL* und *IFITM1* (siehe Tab. 2) wurden so gewählt, daß die PCR einheitlich bei einer Annealing-Temperatur von 58 °C durchgeführt werden konnte und PCR-Produkte ähnlicher Länge produziert wurden (116 – 173 bp). Durch eine Gradienten-PCR im konventionellen Thermocycler wurde für fünf Gene bestätigt, daß die Amplifikation bei 58 °C optimal verläuft (Abb. 10, unterstrichen). Weitere PCR-Reaktionen wurden daher direkt im LightCycler getestet. Obwohl die Primer so gewählt wurden, daß zumindest ein Primer über einem Exon-Exon-Übergang in der cDNA lag, wurden z.B. bei *MYC* auch DNA-Sequenzen amplifiziert (Abb. 11). Durch einen Vergleich von RT<sup>minus</sup>-Kontrollen (keine Reverse Transkriptase im Ansatz für die cDNA-Synthese) mit DNase-behandelter RNA bzw. nicht-behandelter RNA wurde deutlich, daß die RNA nach der Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit nicht frei von DNA ist. Nach DNase-Verdau konnten allerdings DNA-Sequenzen in einer konventionellen PCR mit 35 Zyklen nicht mehr nachweisbar amplifiziert werden. Bei anderen Genen, z.B. *MIC1* waren die Primer spezifisch für die Amplifikation von cDNA-Sequenzen (Abb. 11).

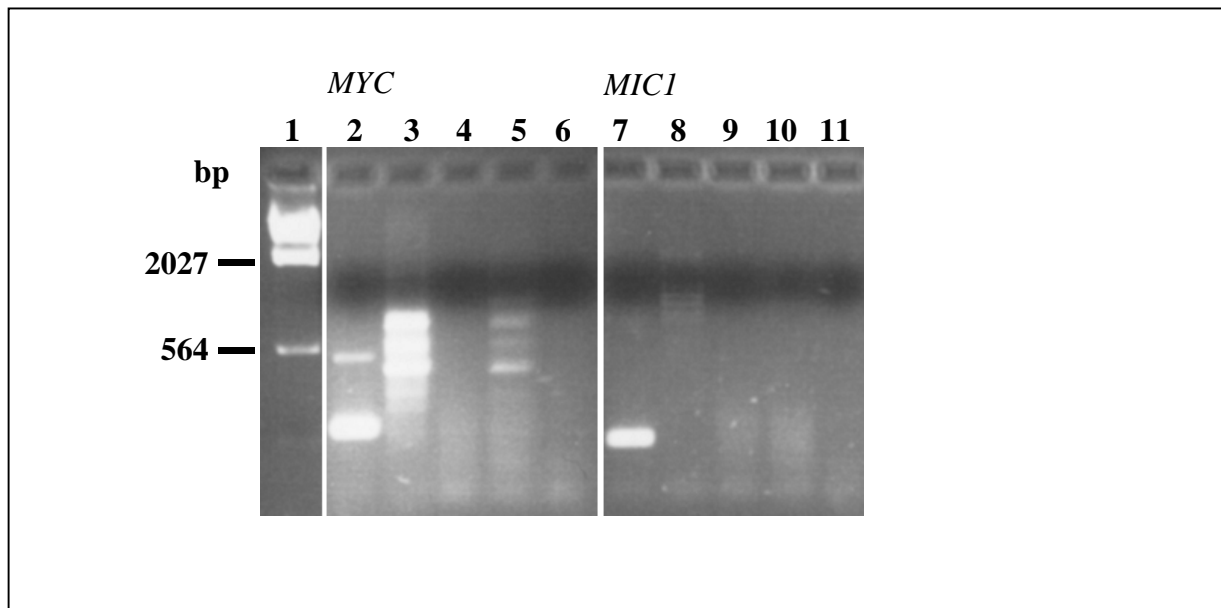
#### 4.1.5.2 Primerauswahl für die Referenzgene

Primer für die Amplifikation der potentiellen Referenzgene *TXBP151* (*Tax 1 binding protein 151*), *PBGD* (*Porphobilinogendeaminase*) und *HDAC1* (*Histone deacetylase 1*) wurden so über Exon-Exon-Grenzen gelegt, daß spezifisch cDNA-Fragmente amplifiziert wurden und keine Vermehrung genomischer Sequenzen erfolgte (Abb. 12). Die Fragmentlängen lagen mit 137 bp (*TXBP151*), 139 bp (*PBGD*) bzw. 158 bp (*HDAC1*) im Bereich der amplifizierten Zielgene. Als Referenzgen für die Quantifizierungsexperimente am LightCycler wurde aus folgenden Gründen schließlich das *TXBP151* ausgewählt. In einem Vorversuch, in dem die Expression der Referenzgene in drei Tumor- und korrespondierenden Normalgeweben ermittelt wurde (Einsatz gleicher Mengen an RNA für die cDNA-Synthese), zeigte das *TXBP151* die geringste Varianz zwischen den Geweben (nicht gezeigt). Darüberhinaus erwies sich das Gen auch auf den Arrays in den meisten untersuchten Patientenproben als stabil exprimiert.

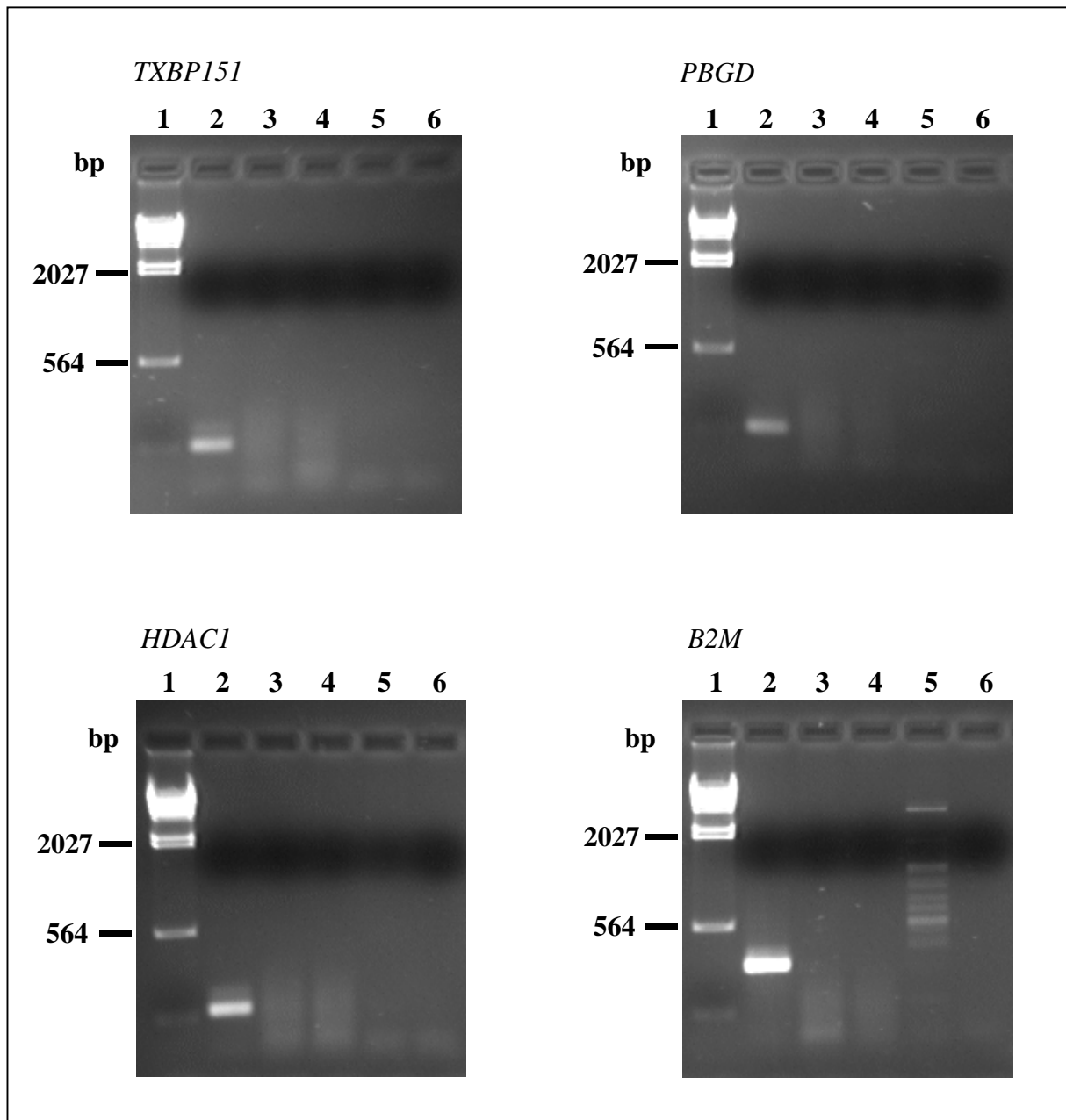
Primer für das Haushaltsgen *B2M* (*beta-2-microglobulin*) standen bereits im Labor zur Verfügung, amplifizierten aber geringfügig DNA-Sequenzen (Spur 5, Abb. 12). Auch aufgrund der Fragmentlänge (326 bp) der amplifizierten cDNA-Moleküle war *B2M* nicht für den Vergleich mit den Zielgensequenzen geeignet.



**Abb. 10:** 2 %ige Agarose-Gele mit PCR-Amplifikaten von verschiedenen cDNA-Sequenzen aus einem Gradienten für die Annealing-Temperatur. Die cDNA stammt aus der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116. 1:  $\lambda$ HindIII; 2 – 11: verschiedene Annealing-Temperaturen während der PCR-Reaktion (2: 50,6 °C; 3: 51,6 °C; 4: 53,4 °C; 5: 55,8 °C; 6: 58,5 °C; 7: 61,4 °C; 8: 64,2 °C; 9: 66,7 °C; 10: 68,7 °C; 11: 69,9 °C); 12: H<sub>2</sub>O-Kontrolle.



**Abb. 11:** 2 %iges Agarose-Gel mit PCR-Amplifikaten der cDNA von *MYC* und *MIC1*. Mit den Primern für *MYC* wurden DNA- und cDNA-Sequenzen amplifiziert, während die Primer für *MIC1* nur spezifisch an cDNA banden. 1:  $\lambda$ HindIII; 2, 7: cDNA HCT116 nach DNase Verdau; 3, 8: Blut-DNA; 4, 9: RT<sup>minus</sup>-Kontrolle mit RNA HCT116 nach DNase Verdau; 5, 10: RT<sup>minus</sup>-Kontrolle mit RNA HCT116 ohne DNase Verdau; 6, 11: H<sub>2</sub>O-Kontrolle.



**Abb.: 12:** 2 %ige Agarose-Gele mit amplifizierten Fragmenten aus den potentiellen Referenzgenen *TXBP151*, *PBGD*, *HDAC1* und *B2M*. Die Primer für *TXBP151*, *PBGD* und *HDAC1* zeigten hohe Spezifität für die Amplifizierung von cDNA-Sequenzen, während mit *B2M*-Primern geringfügig auch genomische DNA vermehrt wurde (Spur 5). 1:  $\lambda$ HindIII; 2: cDNA aus HCT116 (1:10 verdünnt) nach DNase Verdau; Spur 3: RT<sup>minus</sup>-Kontrolle mit RNA aus HCT116 ohne DNase Verdau; 4: RT<sup>minus</sup>-Kontrolle mit RNA aus HCT116 nach DNase Verdau; 5: Blut-DNA; 6: H<sub>2</sub>O-Kontrolle.

#### 4.1.5.3 Relative quantitative PCR am LightCycler

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte mittels *real-time* PCR am LightCycler. Durch Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I, der während der Elongationsreaktion in die doppelsträngigen PCR-Produkte eingebaut wird, konnte die Amplifikation der cDNA-Moleküle von der LightCycler Software in Echtzeit detektiert werden. Anhand dieser Daten erfolgte die Bestimmung eines *crossing point* (Zyklenzahl, an dem die Fluoreszenz gegenüber dem Hintergrund signifikant ansteigt), der für die Berechnung der Genexpressionsdifferenzen zwischen verschiedenen Proben verwendet wurde. Auch wenn sich die Amplifizierungseffizienzen der PCR-Reaktionen für Zielgen und Haushaltsgen unterschieden, konnte mit Hilfe der Relative Quantification Software 1.0 (Roche) eine Quantifizierung durchgeführt werden. Dafür mußten Standardkurven mit verschiedenen cDNA-Verdünnungen erstellt werden, die von der Software in die Quantifizierungsanalyse mit einbezogen wurden. Die Spezifität der amplifizierten Produkte konnte im Anschluß an die PCR-Reaktion mittels Schmelzpunktanalyse im LightCycler überprüft werden. Das Prinzip dieser Analytik besteht darin, verschiedene PCR-Amplifikate anhand der Temperatur zu unterscheiden, bei der eine Trennung der komplementären Doppelstränge erfolgt.

Die Expression der oben genannten Zielgene wurde in vier verschiedenen Tumor / Normalgewebe-Paaren, relativ zur Expression des Gens *TXBP151*, quantifiziert (Abb. 13) und mit den entsprechenden Ergebnissen aus den Array-Experimenten verglichen. Obwohl das exakte Verhältnis der Expressionsunterschiede nicht in allen Fällen bestätigt werden konnte, wurde aber grundsätzlich die Tendenz und meistens auch die Größenordnung der differentiellen Genexpression zwischen normalem und neoplastischem Gewebe durch die LightCycler-Analyse verifiziert (Tab. 3). Die mit den verschiedenen Methoden bestimmten Expressionsverhältnisse variierten für die meisten überexprimierten Gene weniger als um den Faktor zwei. Deutlichere Abweichungen zeigten sich nur in zwei Fällen. Das Verhältnis der Genexpression von *CKS2* zwischen Tumor- und Normalgewebe von Patient 25 wurde mit dem Array ca. dreifach höher bestimmt als durch die LightCycler-Analyse. *BIGH3* bei Patient 04 dagegen zeigte im LightCycler eine nahezu sechsfach höhere differentielle Genexpression als auf dem Array. Die Expression von *UGT2B15* befand sich in allen untersuchten Tumoren an der Detektionsgrenze, daher ist ein Vergleich der Expressionsverhältnisse wenig aussagekräftig.

Die Transkriptionsrate der genannten Gene wurde mittels LightCycler-Analyse in drei weiteren Tumor / Normalgewebe-Paaren, die zuvor nicht auf Arrays untersucht worden waren, quantifiziert. Damit sollte überprüft werden, ob die differentielle Expression dieser Gene ein „allgemeingültiges“ Merkmal kolorektaler Karzinome darstellt. Die Tendenz der abnormalen Expression wurde für alle untersuchten Gene in den Tumorgeweben bestätigt.

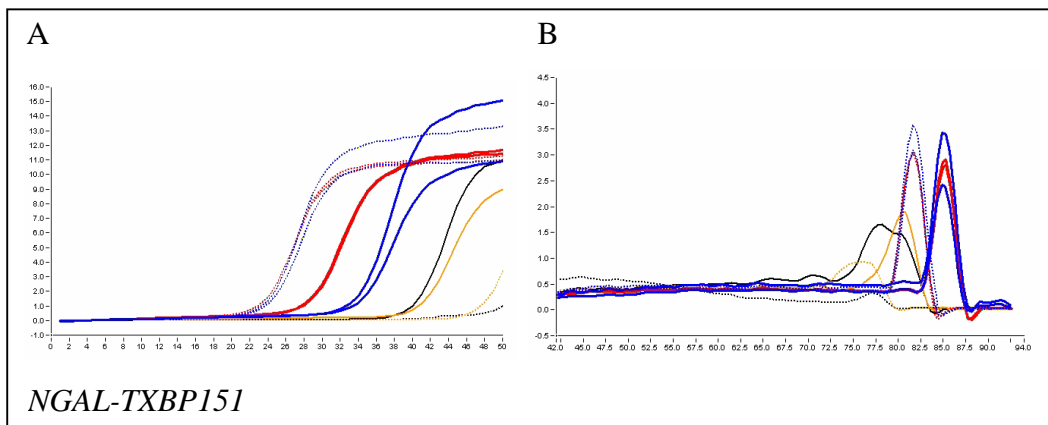
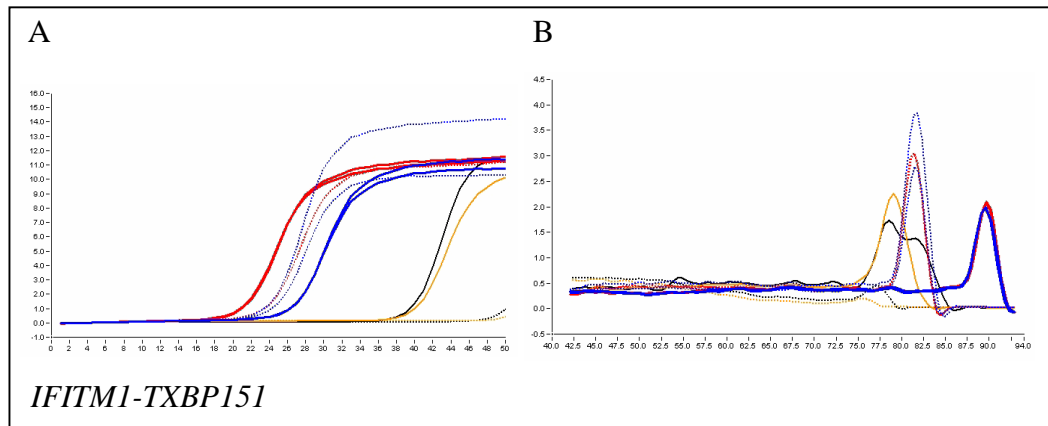
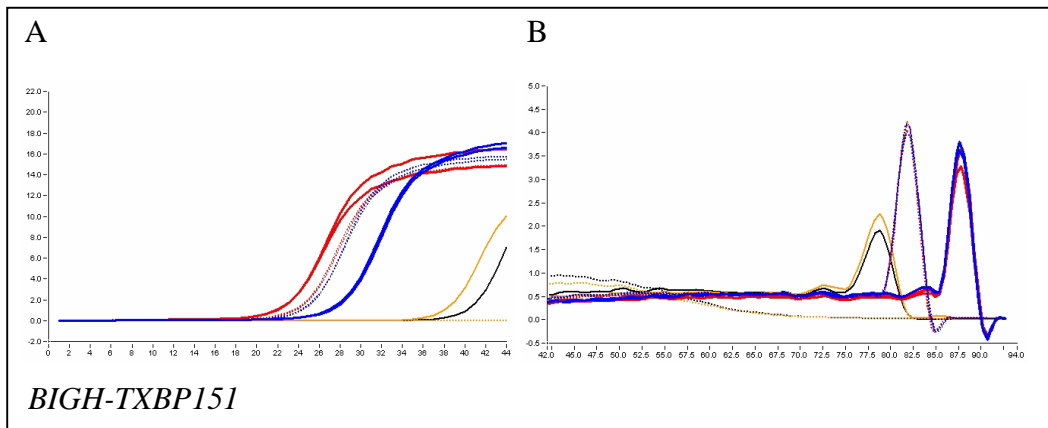
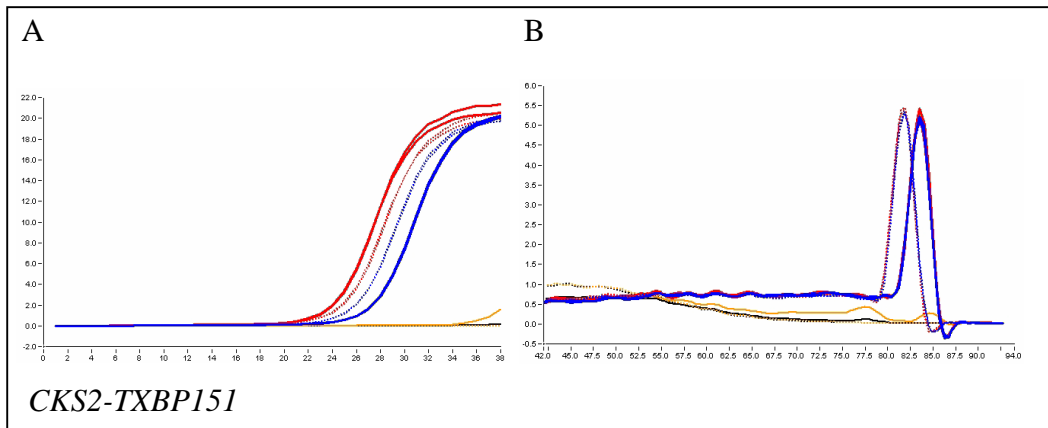
Bei der Schmelzpunktanalyse wurden nur in den RT<sup>minus</sup>- und H<sub>2</sub>O-Kontrollen unspezifisch amplifizierte Sequenzen festgestellt, die sich jedoch von den spezifischen Produkten in ihrem Schmelzpunkt unterschieden. Die PCR-Produkte der Normal- und Tumorproben wiesen klar definierte Schmelzkurven auf und konnten daher für die Quantifizierung der Genexpression verwendet werden.

Pat-Nr.	staging	Methode	Gene:						
			<i>CKS2</i>	<i>BIGH3</i>	<i>IFITM1</i>	<i>NGAL</i>	<i>MYC</i>	<i>MIC1</i>	<i>UGT2B15</i>
Pat.04	pT2 N0 (0/16)	Array	4.0	4.4	14.0	34.1	5.4	21.5	0.002
		LC	4.1	25.3	20.1	23.1	8.9	21.7	0.003
Pat.25	pT3 N0 (0/21)	Array	19.7	8.5	13.9	1.8	31.2	5.7	0.006
		LC	6.3	20.8	6,3	1.5	69.8	4.5	0.002
Pat.20	pT4 N2 (16/23)	Array	5.0	41.9	20.5	8.9	9.5	7.3	0.04
		LC	6.5	93.7	10,4	6.5	9.4	7.8	0.004
Pat.15	pT4 N2 (7/19)	Array	3.5	32.2	18.7	22.9	10.6	14.6	0.015
		LC	3.4	19.1	15.7	13.3	9.5	7.6	0.001
Pat.33	pT3 N1 (1/16)	LC	2.2	13.5	3.3	3.6	3.1	4.0	0.03
Pat.34	pT3 N0 (0/15)	LC	6.9	3.6	8.6	115	6.5	4.0	0.12
Pat.35	pT3 N0 (0/11)	LC	2.3	9.3	1.8	25.3	1.6	7.0	0.73

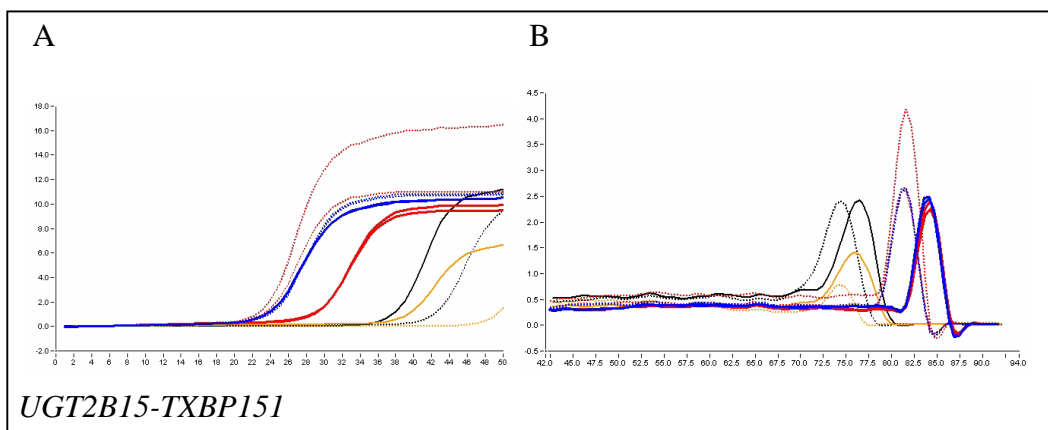
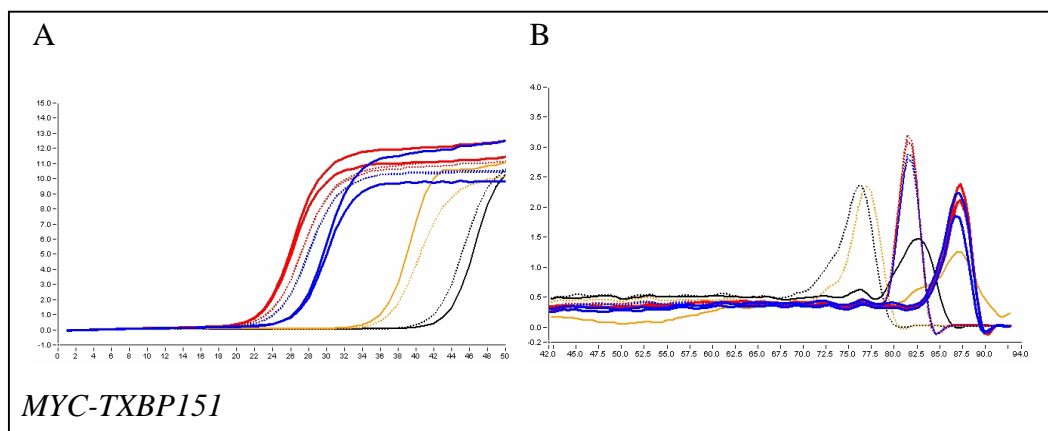
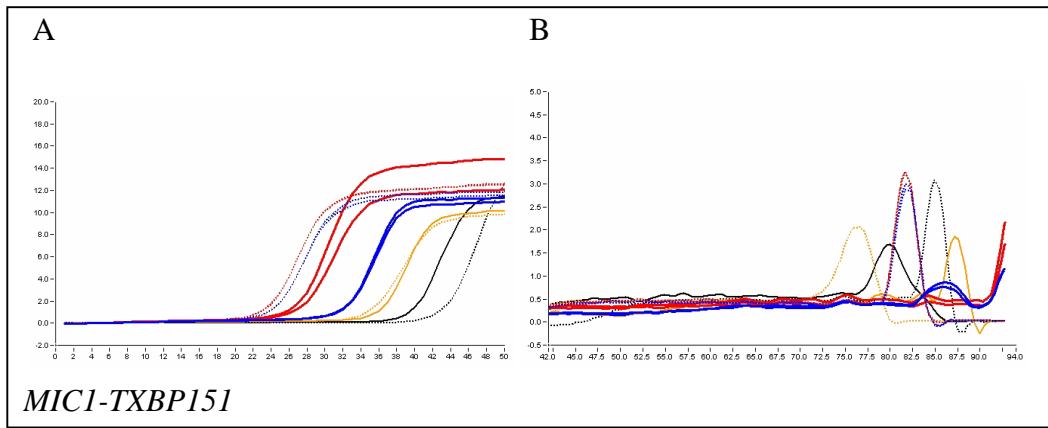
**Tab. 3:** Verhältnis der Expression von sieben Genen zwischen Tumor- und Normalgewebe, bestimmt mit Arrays bzw. dem LightCycler (LC). Gewebeproben der Patienten 04, 25, 20 und 15 wurden mit beiden Methoden untersucht, bei den Patienten 33, 34, und 35 wurde die Genexpression nur mit dem LightCycler bestimmt.



Abb. 13



Fortsetzung Abb. 13



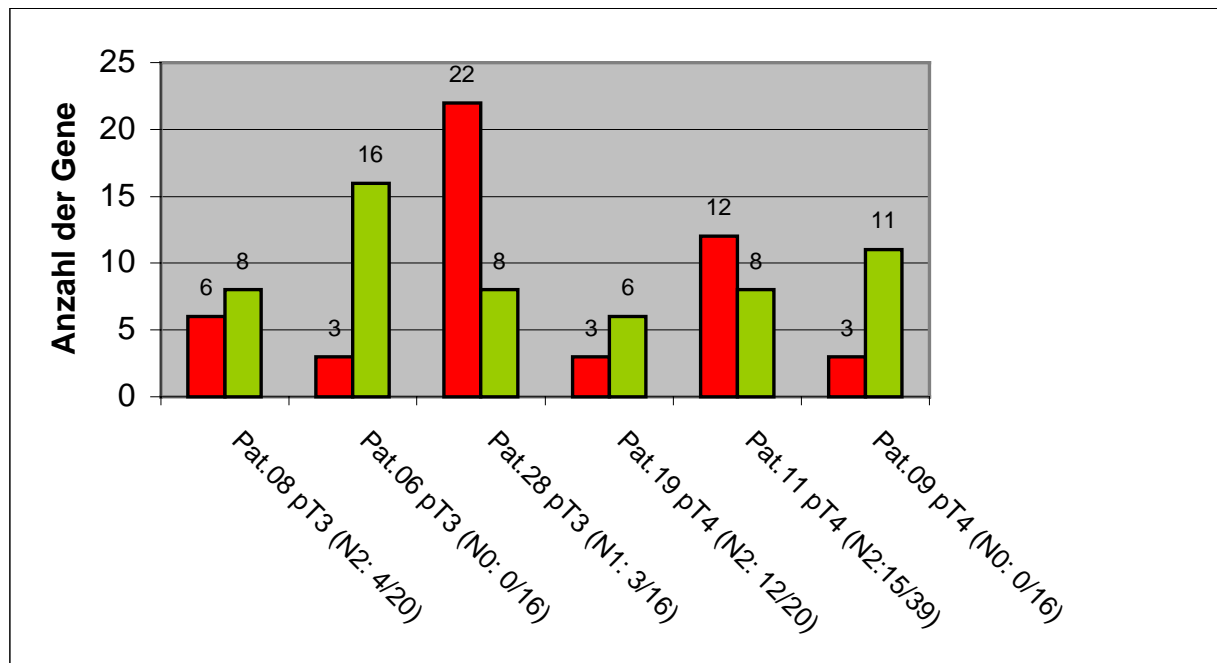
- Normalgewebe Pat.04 Ziel-Gen
- ..... Normalgewebe Pat.04 *TXBP151*
- Tumorgewebe Pat.04 Ziel-Gen
- ..... Tumorgewebe Pat.04 *TXBP151*
- RT- Tumorgewebe Pat.04 Ziel-Gen
- ..... RT- Tumorgewebe Pat.04 *TXBP151*
- H<sub>2</sub>O Ziel-Gen
- ..... H<sub>2</sub>O *TXBP151*

**Abb. 13:** [A] Amplifikationskurven der sieben Zielgene *CKS2*, *BIGH3*, *IFITM1*, *NGAL*, *MIC1*, *MYC* und *UGT2B15* mittels *real-time* PCR am LightCycler, relativ zum Referenzgen *TXBP151*. Dargestellt ist die Fluoreszenz, gemessen im F1-Kanal, gegenüber der Zyklenzahl der PCR. [B] Schmelzkurven der jeweils amplifizierten Produkte, zur besseren Übersicht dargestellt als negative 1. Ableitung ( $-d[F1] / dT$ ) gegen die Zeit. Das PCR-Produkt von *MIC1* schmilzt bei Temperaturen  $> 90$  °C und konnte von der Software nicht vollständig in die Abbildung integriert werden. Tumor- und Normalgewebe wurden jeweils im Duplikat untersucht.

#### **4.1.6 Differentiell exprimierte Gene zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Lebermetastasen**

Sieben der insgesamt 14 untersuchten Lebermetastasen stammen von sechs Primärtumoren, deren Genexpression ebenfalls auf den Arrays analysiert wurde (siehe Tab. 1; von Patient 06 wurde hier nur die Metastase M1 berücksichtigt, da die Expressionsmuster der beiden Metastasen M1 und M2 keine deutlichen Unterschiede zeigten). Zur Identifizierung metastasierungsrelevanter Gene wurden mit Hilfe der Software AtlasImage 2.0 (Clontech) paarweise Vergleiche der Expressionsprofile von Primärtumoren und korrespondierenden Lebermetastasen durchgeführt.

Es wurde festgestellt, daß zwischen Primärtumoren und Metastasen derselben Patienten nur geringe Unterschiede in der Genexpression bestanden (Abb. 14). Abgesehen von Immunglobulinen-Transkripten, die in den Metastasen vermindert waren, zeigten im Median fünf Gene eine mehr als vierfache Überexpression in den Metastasen, acht Gene waren um denselben Faktor geringer exprimiert als in den korrespondierenden Primärtumoren. Die meisten dieser Gene unterschieden sich allerdings zwischen den Patienten. Zur Identifizierung genereller Expressionsdifferenzen wurden daher in einer weiteren Analyse alle Gene berücksichtigt, die zwischen Metastasen und Primärtumoren um den Faktor 2 differentiell exprimiert waren. Dadurch konnten zwölf Gene bestimmt werden, die in mindestens drei der sechs Metastasen eine mehr als zweifache differentielle Expression zeigten. Acht dieser Gene waren in den Metastasen überexprimiert, vier Gene wiesen eine geringere Expression auf als in den entsprechenden Tumorgeweben (Tab. 4).



**Abb. 14:** Anzahl der Gene, die beim Vergleich der Lebermetastasen mit dem jeweils korrespondierenden Primärtumor desselben Patienten mindestens um den Faktor vier überexprimiert (rot) bzw. unterrepräsentiert (grün) waren.

Accession Nummer	Anzahl	Median Ratio M / T	Gen-Name
AF019562	5	3.5	DNAX activation protein 12
X02761	4	6	fibronectin precursor
M32977	4	3.1	vascular endothelial growth factor precursor
X03168	3	5	vitronectin precursor
J05070	3	4.4	matrix metalloproteinase 9
U44975	3	3	DNA-binding protein CPBP
X79067	3	2.3	TIS11B protein; EGF response factor 1
J03040	3	2.1	secreted protein acidic and rich in cysteine precursor
X60957	4	0.25	tyrosine kinase receptor tie-1 precursor
X99133	3	0.07	neutrophil gelatinase-associated lipocalin precursor
M60527	3	0.12	deoxycytidine kinase
X02811	3	0.16	platelet-derived growth factor B subunit precursor

**Tab. 4:** Differenziell exprimierte Gene in sechs Lebermetastasen (M) im Vergleich zu korrespondierenden Primärtumoren (T). Die Anzahl bezieht sich auf die Patienten, bei denen die genannten Gene eine mindestens zweifache differentielle Expression zwischen den neoplastischen Geweben aufwiesen. Angegeben ist auch der Median der Expressionsverhältnisse zwischen diesen Geweben.

#### 4.1.7 Hierarchische Clusteranalyse

Mittels hierarchischer Clusteranalyse lassen sich anhand der Genexpressionsdaten Ähnlichkeiten zwischen allen untersuchten neoplastischen und normalen Darmgeweben ermitteln. Das Ergebnis kann in Form eines stammbaumähnlichen Dendrogrammes dargestellt werden, in dem die einzelnen Gewebe, entsprechend ihrer Ähnlichkeit im Expressionsmuster, an den Endverzweigungen der Äste angeordnet sind. Die Astlängen repräsentieren dabei den Grad der Ähnlichkeit.

Die Clusteranalyse wurde mit Hilfe der Software Cluster (Version 2.11) und TreeView (Version 1.50) durchgeführt (Eisen et al., 1998). Es wurden nur Gene berücksichtigt, die in mindestens 80 % der Gewebe von der Software AtlasImage 2.0 detektierbar (Intensität > 0) exprimiert wurden (1018 von 1185).

Die Gewebeproben wurden durch die Clusteranalyse in zwei Hauptgruppen getrennt (Abb. 15). Eine Hauptgruppe (unterer Ast) enthält alle normalen Darmgewebeproben bzw. den Tumor von Patient 13 und das Normalgewebe einer Leber, das sich in einer eigenen Abzweigung von den übrigen Proben trennt. Die andere Hauptgruppe (oberer Ast) umfaßt alle übrigen Tumoren und Metastasen, wobei die Gewebe in zwei verschiedene Subgruppen unterteilt sind. Diese Subgruppen korrelieren mit dem histologischen Stadium der Tumoren wie folgt. Alle untersuchten pT1- und pT2-Tumoren, sowie acht der elf untersuchten pT3-Tumoren und drei Metastasen, die von zwei dieser pT3-Tumoren stammen, befinden sich in der Subgruppe 1 (*low stage*-Gruppe). In der Subgruppe 2 (*high stage*-Gruppe) sind zwei pT3-, alle pT4-Tumoren und elf der 14 untersuchten Lebermetastasen klassifiziert.

Primärtumoren und korrespondierende Lebermetastasen derselben Patienten sind jeweils in der gleichen Tumor-Subgruppe des Dendrogrammes angeordnet. Metastasen, die im Rahmen derselben Operation mit dem Primärtumor reseziert worden waren, finden sich zusammen mit dem entsprechenden Tumor an den gleichen Endverzweigungen des Dendrogrammes (Patienten 11, 19 und 06 [M1]). Von den vier Metastasen, deren Operation ein bis vier Monate nach dem Primärtumor erfolgt war (Patienten 08 [1 Monat], 28 [1,5 Monate], 09 [4 Monate] und 06 [M2; 4 Monate]), sind zwei im Dendrogramm benachbart zum Tumor klassifiziert (Patienten 28 und 06 [M2]).

Die bildliche Darstellung der prozessierten und organisierten Expressionsdaten aus der Clusteranalyse ist das Clusterdiagramm (Abb. 16, A). Jede Spalte des Diagrammes

repräsentiert ein Gewebe, jede Zeile repräsentiert ein Gen, dessen Expressionsintensität in den einzelnen Geweben relativ zum Median dieser Intensitäten farblich abgebildet ist.

Anhand dieser Darstellung können Gengruppen erkannt werden, die für die Gruppenbildung verantwortlich sind und diese Gruppen charakterisieren (Abb. 16, B – E).

Um die Zuverlässigkeit bei der Subgruppierung der Tumorproben zu überprüfen, wurde eine Clusteranalyse unter gleichen Bedingungen, allerdings nur mit den Expressionsprofilen der 39 neoplastischen Gewebe durchgeführt (1011 Gene). Das resultierende Dendrogramm (Abb. 17) ähnelt der oben genannten Einteilung bis auf die Anordnung von drei Geweben (pT3-Tumor des Patienten 12; pT3-Tumor und korrespondierende Lebermetastase des Patienten 28).

#### **4.1.8 Ermittlung von statistisch signifikant differentiell exprimierten Genen**

Nachdem sich in der Clusteranalyse die Klassifizierung der Gewebeproben in verschiedene Gruppen gezeigt hatte, sollten mittels statistischer Auswertung Gene identifiziert werden, auf denen die Unterscheidung der Tumor- und Normalgewebe bzw. der zwei verschiedenen Tumor-Subgruppen basierte.

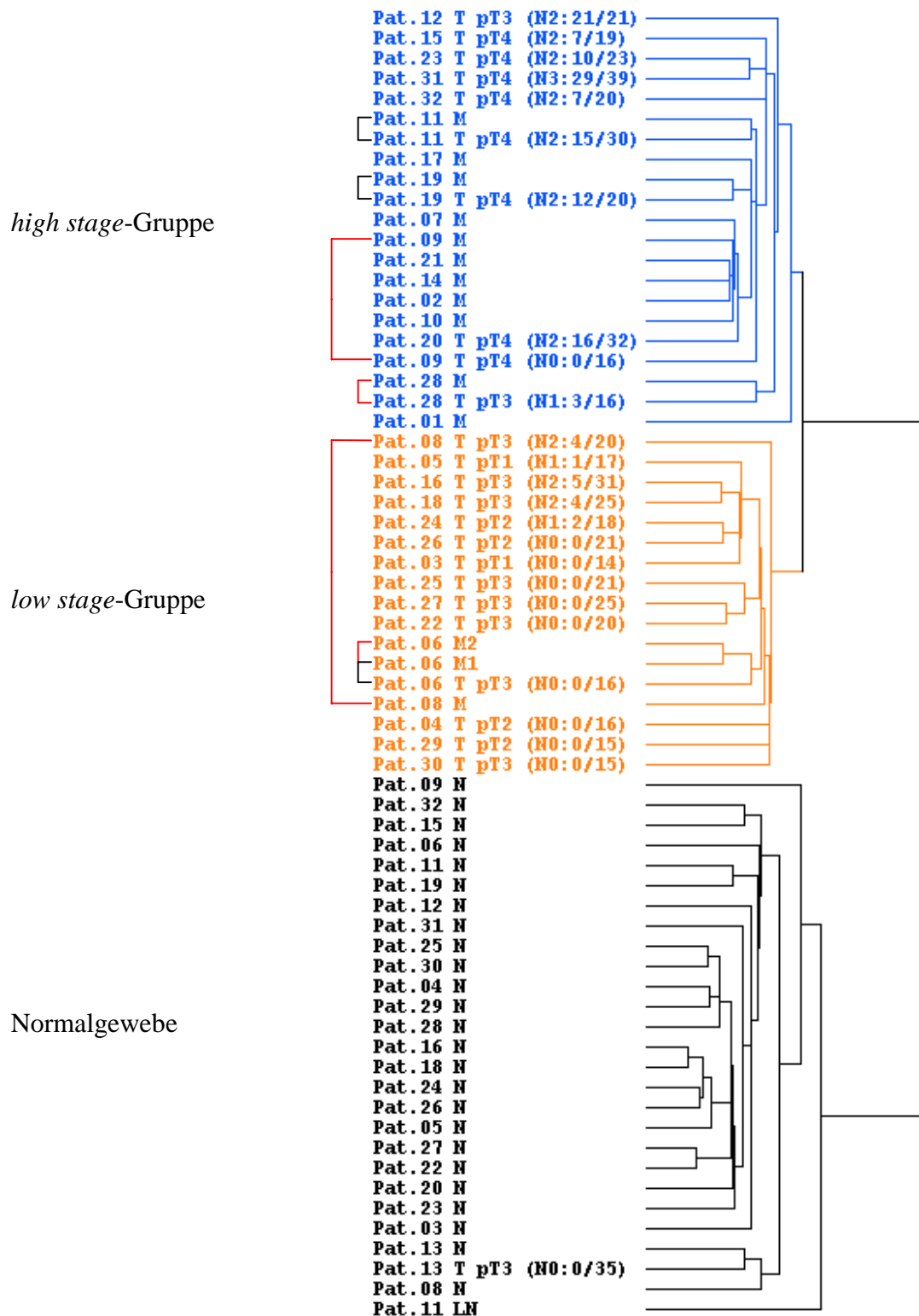
Dabei zeigten sich Unterschiede in der Genexpression besonders deutlich beim Vergleich der normalen Darmgewebe mit den Tumorproben. In Tabelle 5 sind Gene aufgelistet, die nach folgenden Bedingungen selektiert wurden:

- 1.) Differentielle Genexpression mit hoher statistischer Signifikanz (Irrtumswahrscheinlichkeit  $P < 0.001$ ).
- 2.) Die Expression innerhalb der Gruppe überschritt eine definierte Mindestintensität (Median  $> 30$ ).  
(Die Mindestgröße für den Median wurde so definiert, daß Signale auf den Arrays per Auge erkennbar waren und daher überprüft werden konnten. Dieser Wert lag, nach den relativen Intensitätsangaben der Software AtlasImage 2.0, bei ca. 30).
- 3.) Der Median der Expressionsintensitäten unterschied sich mindestens um den Faktor 4 zwischen den Gewebegruppen.

Unter diesen Auswahlkriterien wiesen 29 Gene eine Überexpression im neoplastischen Gewebe auf, elf Gene zeigten eine verminderte Expression gegenüber dem normalen Darmepithel.

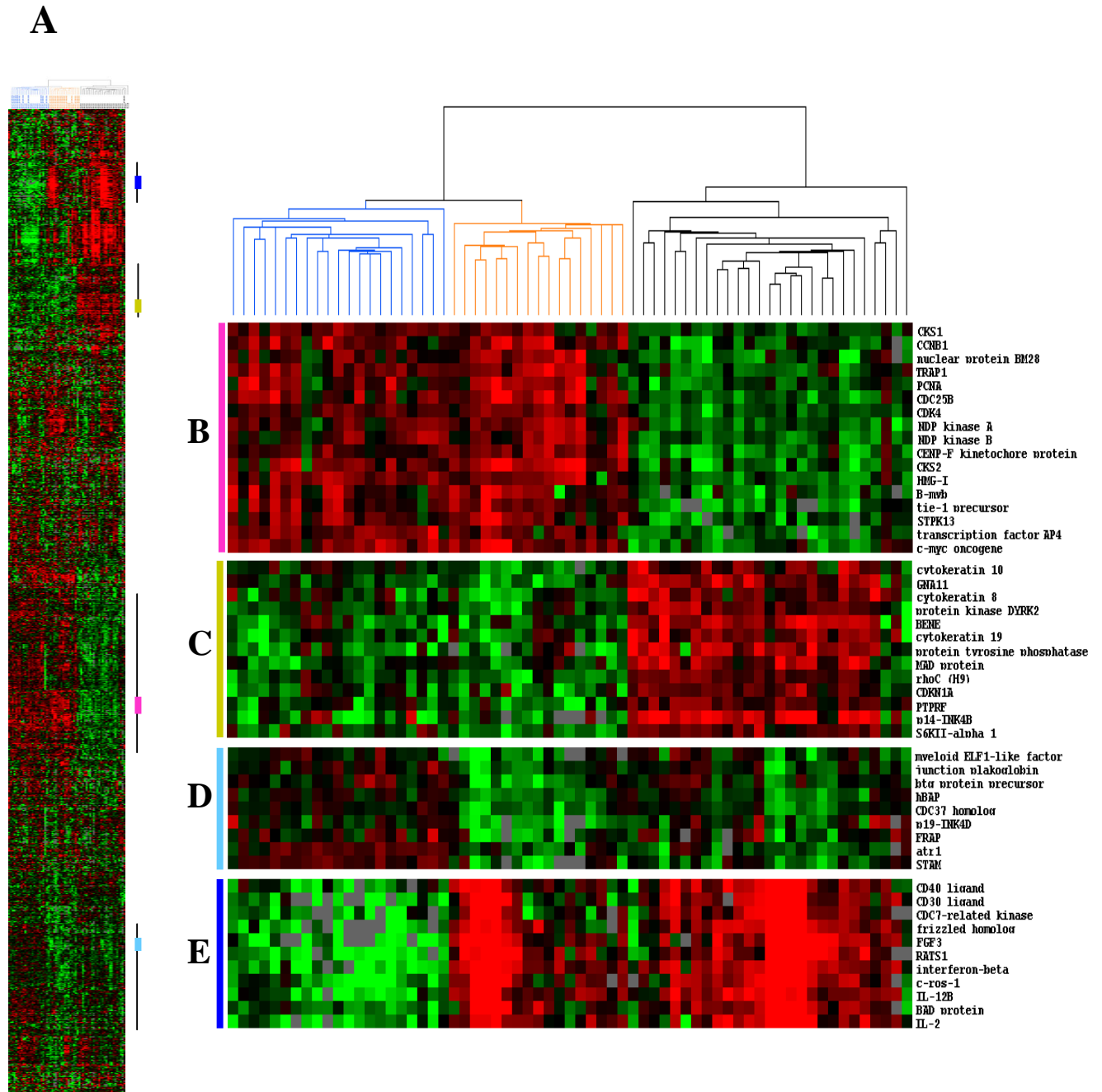
Für die statistische Auswertung zur Identifizierung signifikant differentiell exprimierter Gene zwischen den Tumor-Subgruppen (*high stage*-Gruppe und *low stage*-Gruppe) wurden ausschließlich Expressionsdaten von Tumoren verwendet, die in der Clusteranalyse eine robuste Klassifizierung aufwiesen (d.h. ohne die Patienten 28 und 12). Unter den oben genannten Selektionskriterien zeigten nur zwölf Gene eine differentielle Genexpression. In Tabelle 6 wurden daher Gene aufgelistet, die ab dem Faktor drei differentiell zwischen den Gruppen exprimiert waren. Nach diesen Kriterien zeigten 18 Gene in der *high stage*-Gruppe eine Überexpression, fünf Gene waren in dieser Gruppe geringer exprimiert als in der *low stage*-Gruppe.

Bei der Ermittlung von hoch signifikant differentiell exprimierten Genen zwischen Tumor- und Normalgeweben bzw. zwischen den beiden Tumor-Subgruppen wurden unter den genannten Kriterien insgesamt 60 verschiedene Gene selektiert. Drei Gene wurden in beiden Analysen als differentiell exprimiert identifiziert: *WEE1* (*wee1Hu CDK tyrosine 15-kinase*), *EIF3-P116* (*eukaryotic translation initiation factor 3 beta subunit*) und *PDGFB* (*platelet-derived growth factor B subunit precursor*). Während *PDGFB* im Tumor und in der *high stage*-Gruppe geringer exprimiert war als in den Normalgeweben bzw. der *low stage*-Gruppe, zeigten *WEE1* und *EIF3-P116* in den Tumoren bzw. der *high stage*-Gruppe jeweils eine stärkere Genexpression.

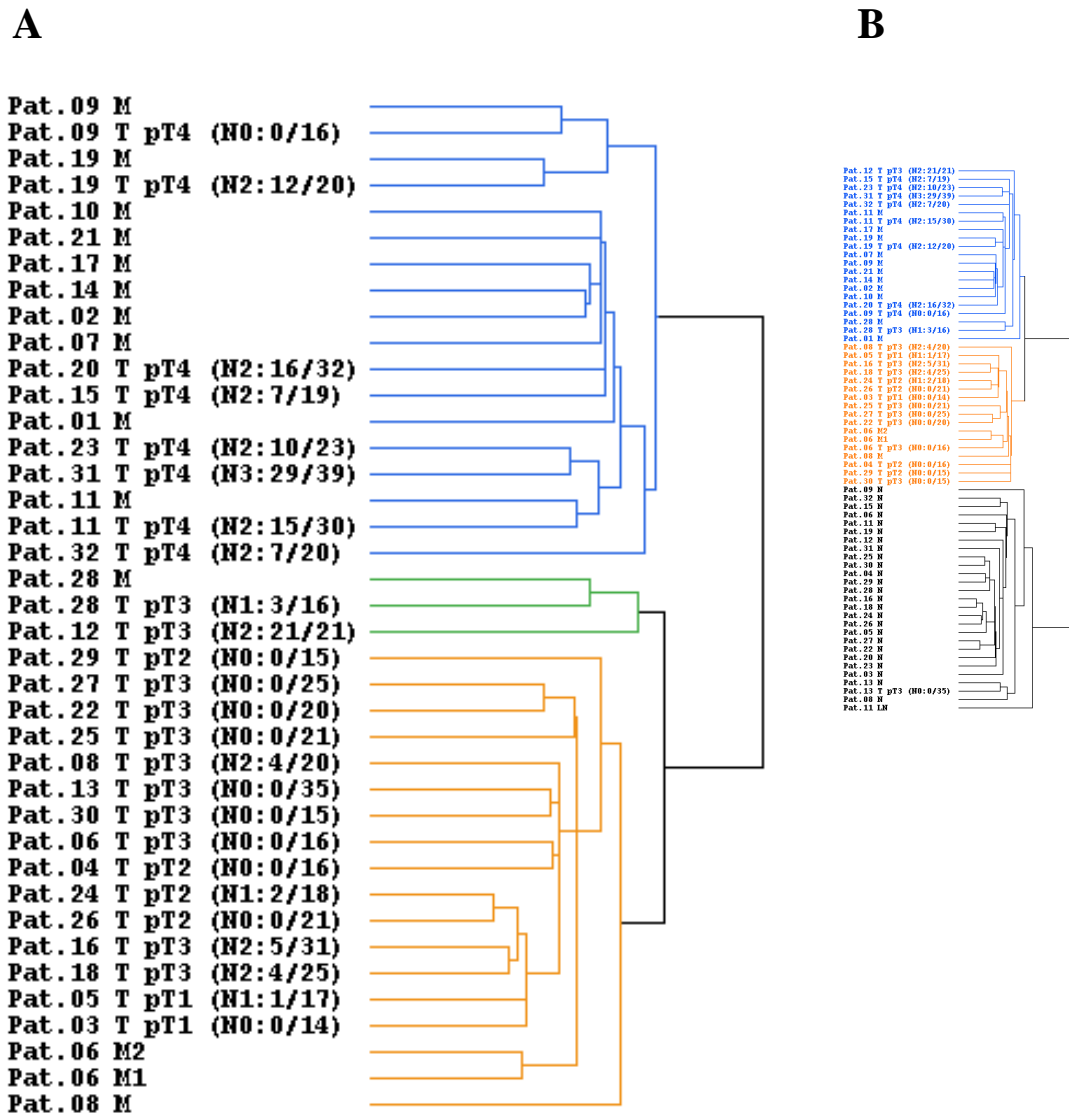


**Abb. 15:** Dendrogramm nach Clusteranalyse mit Expressionsprofilen von 65 Patientenproben (25 kolorektale Karzinome [T], entsprechende normale Darmgewebe [N], 14 Lebermetastasen [M] und ein Leber-Normalgewebe [LN]) unter Angabe der Patientenummer (Pat.), der TumorgroÙe (pT) und des Lymphknotenstatus (N). Die Farben der Äste sind wie folgt gewählt: Normalgewebe-Gruppe, schwarz; *high stage*-Gruppe, blau; *low stage*-Gruppe, orange. Primärtumoren und korrespondierende Metastasen derselben Patienten sind durch Balken links neben dem Dendrogramm verbunden. Gewebe, die am gleichen Tag reseziert wurden, haben schwarze Balken. Rote Balken verbinden Gewebe, die innerhalb von 4 Monaten operiert wurden.





**Abb. 16:** Clusterdiagramm der Expressionsprofile von 65 Patientenproben (25 kolorektale Karzinome, entsprechende normale Darmgewebe, 14 Lebermetastasen und ein normales Lebergewebe). Jede Zeile repräsentiert ein einzelnes Gen, jede Säule ein Gewebe. Die Farben rot und grün kennzeichnen Überexpression bzw. geringere Expression relativ zum Median der Expressionsintensitäten des Gens in den verschiedenen Geweben. [A] Cluster-Diagramm; [B – E] Teile des Clusterdiagrammes, die verschiedene Gruppen und Subgruppen charakterisieren: [B] Gene, die in den neoplastischen Geweben überexprimiert sind; [C] Gene, die in den neoplastischen Geweben unterrepräsentiert sind; [D] Gene, die in der *high stage*-Gruppe höher exprimiert sind als in der *low stage*-Gruppe; [E] Gene, die in der *high stage*-Gruppe niedriger exprimiert sind als in der *low stage*-Gruppe.



**Abb. 17:** [A] Dendrogramm nach Clusteranalyse mit Expressionsprofilen von 39 Patientenproben (25 kolorektale Karzinome und 14 Lebermetastasen) im Vergleich zum Dendrogramm nach Clusteranalyse mit Expressionsprofilen von 64 Patientenproben ([B], entspricht Abb. 15). Die Dendrogramme unterscheiden sich hinsichtlich der Klassifizierung der Gewebe in der Anordnung von drei Gewebeproben der Patienten 28 und 12 (grün).

**Tab. 5**

Accession Nummer	Gen-Name	Intensität N	Intensität T, M	Ratio T, M / N
U18018	adenovirus E1A enhancer-binding protein; E1A-F; ets translocation variant 4	1	92	92.0
X02761; K00799; K02273; X00307; X00739	fibronectin precursor (FN)	81	1109	13.7
AF019770	macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC1)	166	2026	12.2
J04164	interferon-inducible protein 9-27	211	1956	9.3
M81934; S78187	CDC25B; CDC25HU2; M-phase inducer phosphatase 2	13	120	9.2
X51688	G2/mitotic-specific cyclin A (CCNA; CCN1)	5	44	8.8
V00568	c-myc oncogene	141	1116	7.9
J03040	secreted protein acidic and rich in cysteine precursor (SPARC); osteonectin (ON); basement membrane protein (BM40)	18	141	7.8
X60957; S89716	tyrosine kinase receptor tie-1 precursor	7	54	7.7
M77349	BIGH3	68	506	7.4
X54942	cyclin-dependent kinase regulatory subunit (CKS2)	41	295	7.2
M13982	interleukin-4 precursor (IL-4); B-cell stimulatory factor 1 (BSF-1); lymphocyte stimulatory factor	5	34	6.8
X59618	ribonucleoside-diphosphate reductase M2 subunit; ribonucleotide reductase	9	61	6.8
M65062	insulin-like growth factor binding protein 5 precursor (IGF-binding protein 5; IGFBP5; IBP5)	16	105	6.6
M23619	high mobility group protein (HMG-I)	230	1496	6.5
U10564	wee1Hu CDK tyrosine 15-kinase; wee-1-like protein kinase	9	56	6.2
M31469	GTP-binding nuclear protein RAN (TC4)	7	41	5.9
X63629	cadherin 3 (CDH3); placental cadherin precursor (P-cadherin; CDHP)	12	70	5.8
J04162	leukocyte IgG receptor (FC-gamma-R)	7	40	5.7
J04088	DNA topoisomerase II alpha (TOP2A)	13	73	5.6
S73885	AP4 basic helix-loop-helix DNA-binding protein	10	56	5.6
U01038	serine/threonine-protein kinase PLK1 (STPK13)	29	159	5.5
X57766	matrix metalloproteinase 11 (MMP11); stromelysin 3	87	476	5.5
X54941	cyclin-dependent kinase regulatory subunit 1 (CKS1)	37	191	5.2
X16707	fos-related antigen (FRA1)	12	61	5.1
M15796; J04718	proliferating cyclic nuclear antigen (PCNA); cyclin	83	400	4.8
U59435	cell cycle protein P38-2G4 homolog; HG4-1	47	216	4.6
J02958	met proto-oncogene; hepatocyte growth factor receptor precursor (HGF-SF receptor)	19	85	4.5

**Fortsetzung Tab. 5**

Accession Nummer	Gen-Name	Intensität N	Intensität T, M	Ratio T, M / N
U78525	eukaryotic translation initiation factor 3 beta subunit (EIF-3 beta); EIF3 P116	21	90	4.3
U17077	BENE	998	227	0.2
M60314	bone morphogenetic protein 5 precursor (BMP5)	37	1	0.03
U17075; L36844	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B (CDKN2B); p14-INK4B; multiple tumor suppressor 2 (MTS2)	39	5	0.1
D13365; M93311	Growth inhibitory factor; metallothionein-III (MT-III)	409	86	0.2
X57086; X57331	IgC mu heavy chain constant region	2609	314	0.1
J00220 + S71043	Immunoglobulin alpha 1 heavy chain constant region (IgA1; IGHA1) + immunoglobulin alpha 2 heavy chain constant region (IgA2; IGHA2)	12878	739	0.1
M27749	Immunoglobulin-related 14.1 protein precursor	228	50	0.2
M22324	Microsomal aminopeptidase N; myeloid plasma membrane glycoprotein CD13	265	56	0.2
U08854; X63359; U06641; J05428; Y00317	Microsomal UDP-glucuronosyltransferase 2B15 precursor (UDPGT); UDPGTH-3; UGT2B15 + microsomal 2B10 precursor (UDPGT); UGT2B10 + 2microsomal B8 precursor	401	7	0.02
X02811; X02744; M12783; M16288	Platelet-derived growth factor B subunit precursor (PDGFB; PDGF2); bacaplermin; c-sis	563	86	0.2
X66079	Transcription factor Spi-B	39	1	0.03

**Tab. 5:** Zwischen neoplastischen Geweben (Tumoren und Metastasen, [T und M]) und der normalen Darmschleimhaut (N) statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene ( $P < 0.001$ ), deren Median-Intensität innerhalb der Gruppen einen Mindestwert von 30 überschritt. Für jedes Gen sind die Expressionsintensitäten (Median) in den Gruppen sowie das Verhältnis dieser Werte angegeben (die Auswahl der Gen-Namen erfolgte von der Firma Clontech).

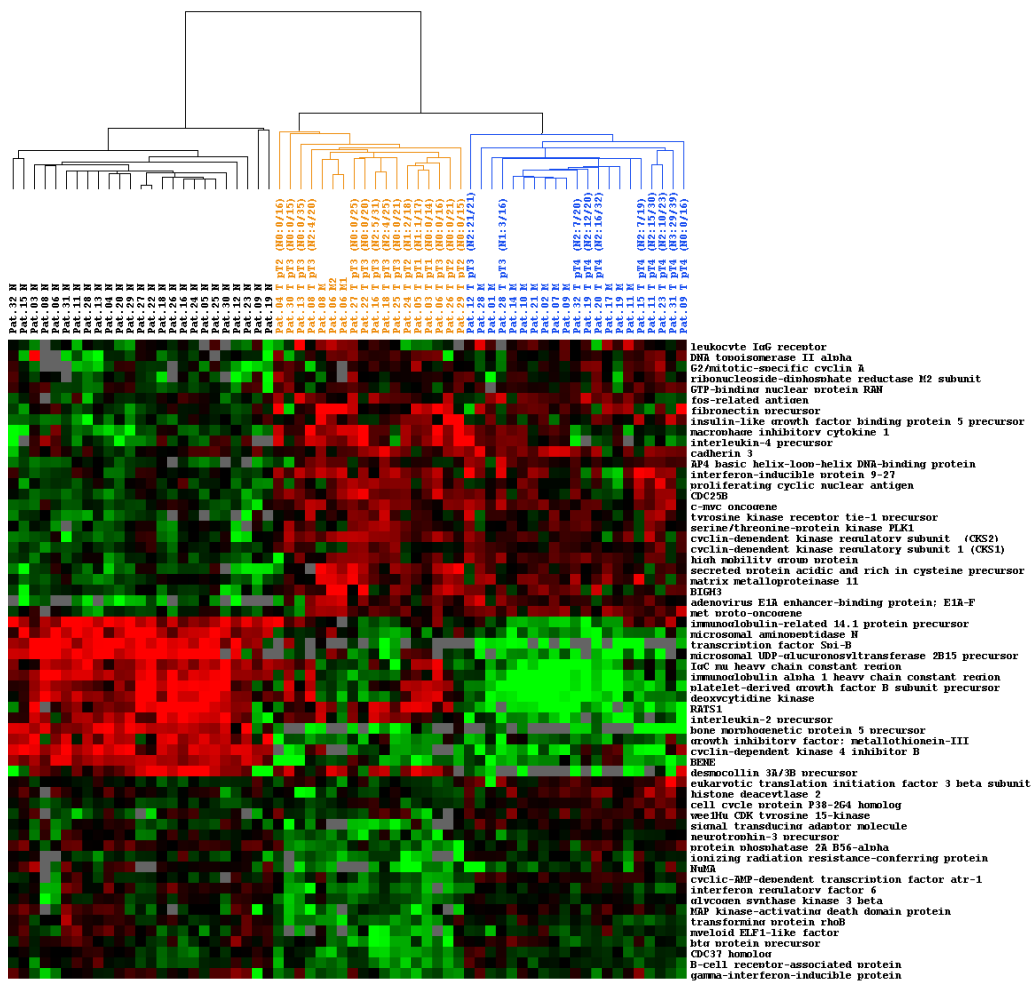
Accession Nummer	Gen-Name	Intensität <i>low stage</i> - Gruppe	Intensität <i>high stage</i> - Gruppe	Ratio <i>high stage</i> - / <i>low stage</i> - Gruppe
U10564	wee1Hu CDK tyrosine 15-kinase; wee-1-like protein kinase	16	83	5.2
U43899	signal transducing adaptor molecule (STAM)	13	66	5.1
X53655; M37763	neurotrophin-3 precursor (NT-3); neurotrophic factor (HDNF); nerve growth factor 2 (NGF-2)	74	384	5.2
U63131	CDC37 homolog	24	117	4.9
U32645	myeloid ELF1-like factor	10	48	4.8
U72649	btg protein precursor; NGF-inducible anti-proliferative protein PC3	56	252	4.5
X06820	transforming protein rhoB; ARHB; ARH6	58	239	4.1
Z11583	NuMA	9	35	3.9
AF027292	interferon regulatory factor 6 (IRF6)	22	83	3.8
U78525	eukaryotic translation initiation factor 3 beta subunit (EIF-3 beta); EIF3 P116	47	162	3.4
U31814	histone deacetylase 2 (HD2)	30	102	3.4
U18321 + X83544	ionizing radiation resistance-conferring protein + death-associated protein 3 (DAP3)	10	33	3.3
L42373	protein phosphatase 2A B56-alpha	23	74	3.2
L33801	glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 beta); tau kinase subunit; factor A	37	119	3.2
U77352	MAP kinase-activating death domain protein	10	33	3.3
U77352	cyclic-AMP-dependent transcription factor atr-1; TREB36 protein	25	81	3.2
J03909	gamma-interferon-inducible protein; IP-30	28	87	3.1
U72511	B-cell receptor-associated protein (hBAP)	139	428	3.1
A14844	interleukin-2 precursor (IL-2); T-cell growth factor (TCGF)	31	8	0.3
M60527	deoxycytidine kinase	195	36	0.2
X02811; X02744; M12783; M16288	platelet-derived growth factor B subunit precursor (PDGFB; PDGF2); bacaplermin; c-sis	353	35	0.1
U37688	RATS1	32	4	0.1
X83929 + D17427	desmocollin 3A/3B precursor (DSC3) + desmocollin 4 (DSC4)	47	1	0.02

**Tab. 6:** Zwischen der *high stage*- und *low stage*-Gruppe statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene ( $P < 0.001$ ), deren Median-Intensität innerhalb der Gruppen einen Mindestwert von 30 überschritt. Für jedes Gen sind die Expressionsintensitäten (Median) in den Gruppen sowie das Verhältnis dieser Werte angegeben (die Auswahl der Gen-Namen erfolgte von der Firma Clontech).

### 4.1.9 Clusteranalyse mit selektierten Genen

Bei der statistischen Auswertung unter 4.1.8 konnten insgesamt 60 verschiedene Gene als differentiell exprimiert zwischen den verschiedenen Gewebegruppen identifiziert werden. Um die Bedeutung dieser Gene für die unter 4.1.7 beschriebene molekulare Klassifizierung der Gewebe zu überprüfen, wurde mit den entsprechenden Expressionsdaten dieser 60 Gene eine separate Clusteranalyse durchgeführt (Abb. 18).

Die Klassifizierung der Gewebe entsprach der Clusteranalyse mit 1018 Genen unter 4.1.7, mit Ausnahme des Tumors von Patient 13, der nicht in die Normalgewebe-Gruppe, sondern hier in die *low stage*-Gruppe geordnet wurde.



**Abb. 18:** Clusteranalyse mit einem Set aus 60 verschiedenen Genen, die mittels Statistik zwischen Tumor- und Normalgeweben, bzw. zwischen *high stage*- und *low stage*-Gruppe als hoch signifikant differentiell exprimiert ermittelt worden waren. Im Dendrogramm sind die Gewebeproben bis auf einen Tumor (Patient 13) in denselben Gruppen klassifiziert wie im Dendrogramm der Clusteranalyse mit 1018 Genen (siehe Abb. 15).

## 4.2 Untersuchung epithelialer Tumorzellen aus Blut und Knochenmark

Es wurde zunächst eine Methode zur Isolierung lebender Tumorzellen aus dem Knochenmark von Patienten etabliert. Diese Methode besteht aus einer immunomagnetischen Anreicherung epithelialer Zellen aus Knochenmarksaspiraten und einer nachfolgenden Isolierung einzelner Zellen mittels Mikromanipulation. Die isolierten Zellen konnten anschließend für molekulargenetische Untersuchungen verwendet werden.

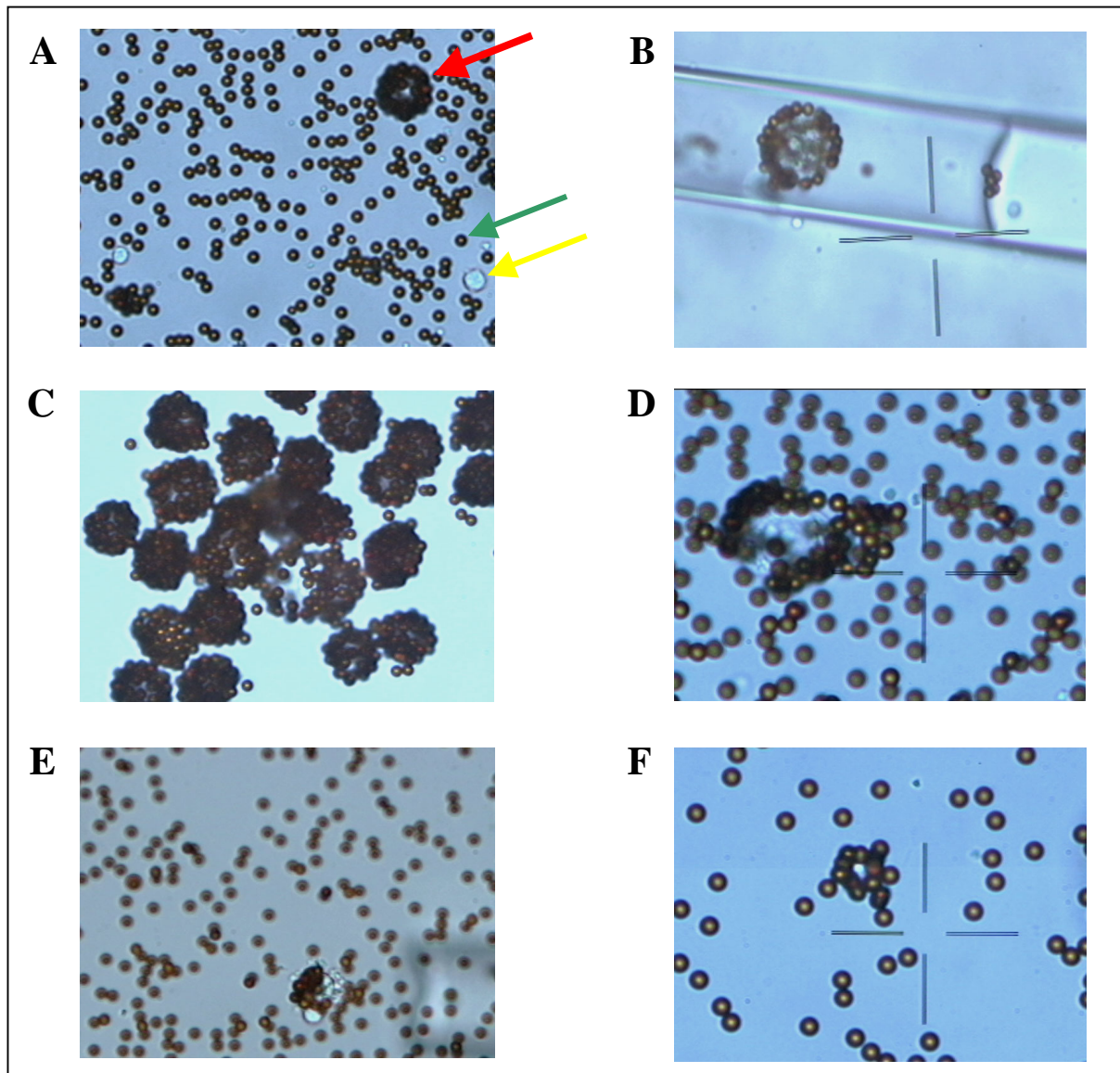
### 4.2.1 Isolierung epithelialer Tumorzellen aus Blut

In Vorversuchen wurde die Isolierung epithelialer Zellen aus normalen hämatopoetischen Zellen etabliert und optimiert. Dazu wurde jeweils eine definierte Zahl von Tumorzellen zu menschlichem Blut gegeben und anschließend mit Hilfe der in 3.3 beschriebenen immunomagnetischen Anreicherung und Isolierung mittels Mikromanipulation separiert. Von besonderem Interesse war dabei neben der Bestimmung der Ausbeute an Tumorzellen vor allem die Charakterisierung ihrer Morphologie.

Das typische Aussehen markierter Tumorzellen war zum einen geprägt durch eine dichte Besetzung der Zelloberfläche mit magnetischen *beads* (Abb. 19, A - C), zum zweiten durch den gegenüber anderen Zellen wesentlich größeren Zelldurchmesser. Die mikroskopische Abschätzung der Größe der Tumorzellen ergab einen Durchmesser von ca. 20 bis 30  $\mu\text{m}$ . Darüber hinaus war zu beobachten, daß der Anteil an Zellen mit morphologisch erkennbaren Schädigungen mit ca. 5 % gering war (Abb. 19, D und E).

Von den ursprünglich zugegebenen Tumorzellen konnten nach den Markierungsschritten etwa 70 % eindeutig identifiziert werden, so daß die beschriebene Methode auch für die Isolierung von Tumorzellen aus Knochenmarksaspiraten geeignet erschien.

Zum Ausschluß falsch positiver Ergebnisse wurden parallel Blutproben ohne Zugabe von Tumorzellen untersucht. Dabei zeigte sich, daß die *bead*-gekoppelten Antikörper eine geringe Rate unspezifischer Bindungen bildeten, diese markierten Zellen sich aber sowohl hinsichtlich der Zellgröße als auch der Dichte der *bead*-Besetzung an der Oberfläche deutlich von den Tumorzellen unterschieden (Abb. 19, F).



**Abb. 19:** Bildausschnitte mikroskopischer Aufnahmen von Zellen nach immunomagnetischer Anreicherung epithelialer Tumorzellen (SW480) aus Blut mittels BerEP4-gekoppelten magnetischen *beads* (Durchmesser 4,5 µm). [A] Intakte *bead*-markierte Tumorzelle ( → ) im Vergleich zu nicht-markierten normalen Blutzellen ( → ) und den einzelnen *beads* ( → ); [B] Isolierte *bead*-markierte Tumorzelle in einer Glaskapillare (Durchmesser 50 µm); [C] Mehrere von den normalen Blutzellen separierte *bead*-markierte Tumorzellen; [D] Morphologisch nicht intakte Zelle mit deformierter Struktur; [E] Morphologisch nicht intakte Zelle mit Ausstülpungen der Zelloberfläche in Assoziation mit einer nicht-markierten Blutzelle; [F] Unspezifisch markierte Blutzelle (die Bilder A,C und E wurden bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen, die Bilder B, D und F bei 400-facher Vergrößerung).



#### 4.2.2 Isolierung epithelialer Zellen aus Knochenmark

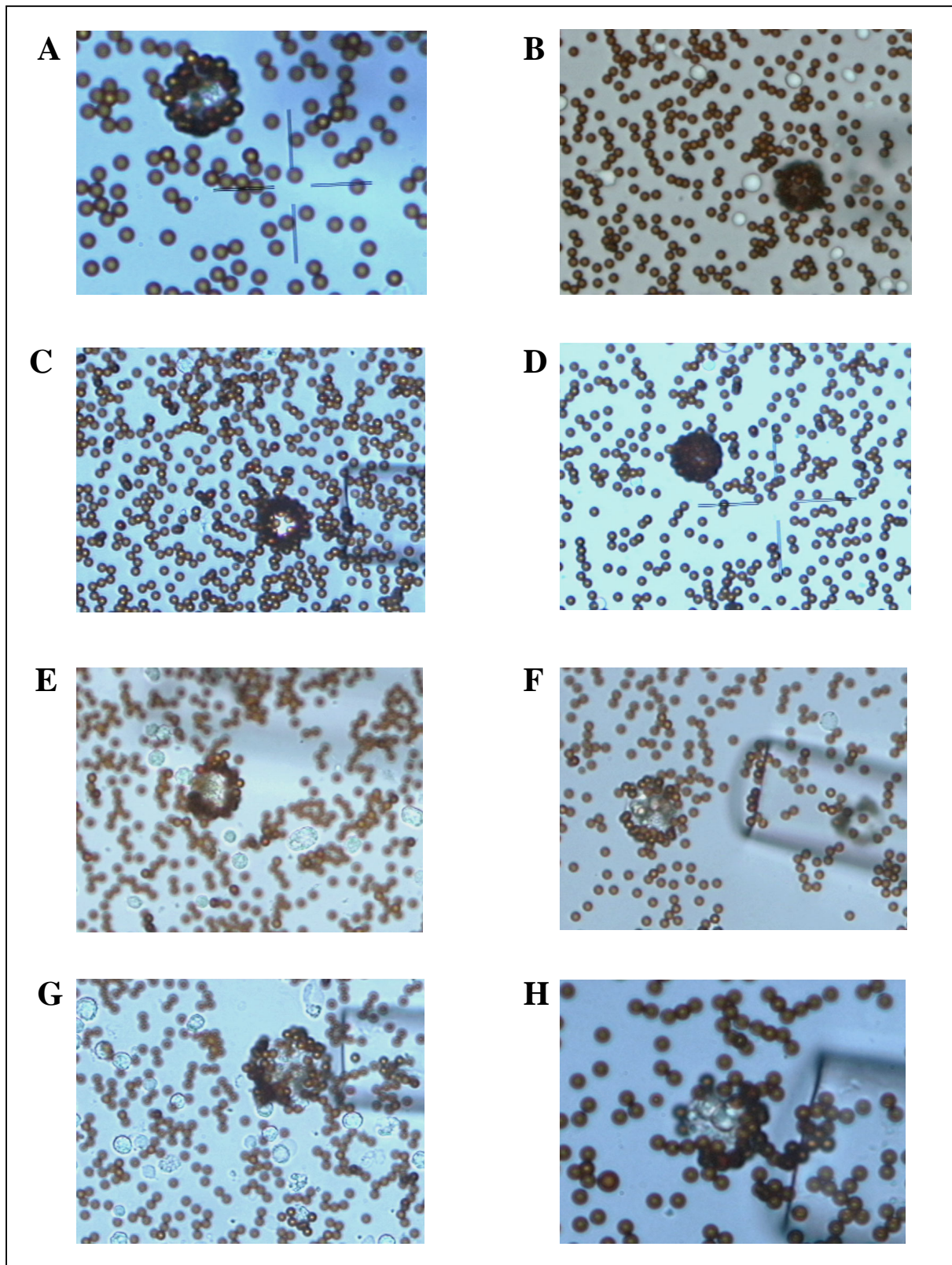
Die in 4.2.1 beschriebene Zellisolierungs-Methode wurde verwendet, um Tumorzellen aus Knochenmarksaspiraten von 82 Patienten (mit vorwiegend gastrointestinalen Tumoren) zu isolieren. Die Identifizierung von Tumorzellen in den Aspiraten erfolgte nach dem im vorigen Abschnitt beschriebenen mikroskopischen Erscheinungsbild.

Bei ca. 7 % (sechs Patienten) der Proben konnten jeweils nur eine bis zwei markierte und morphologisch intakte Zellen identifiziert und isoliert werden (Abb. 20, A-D).

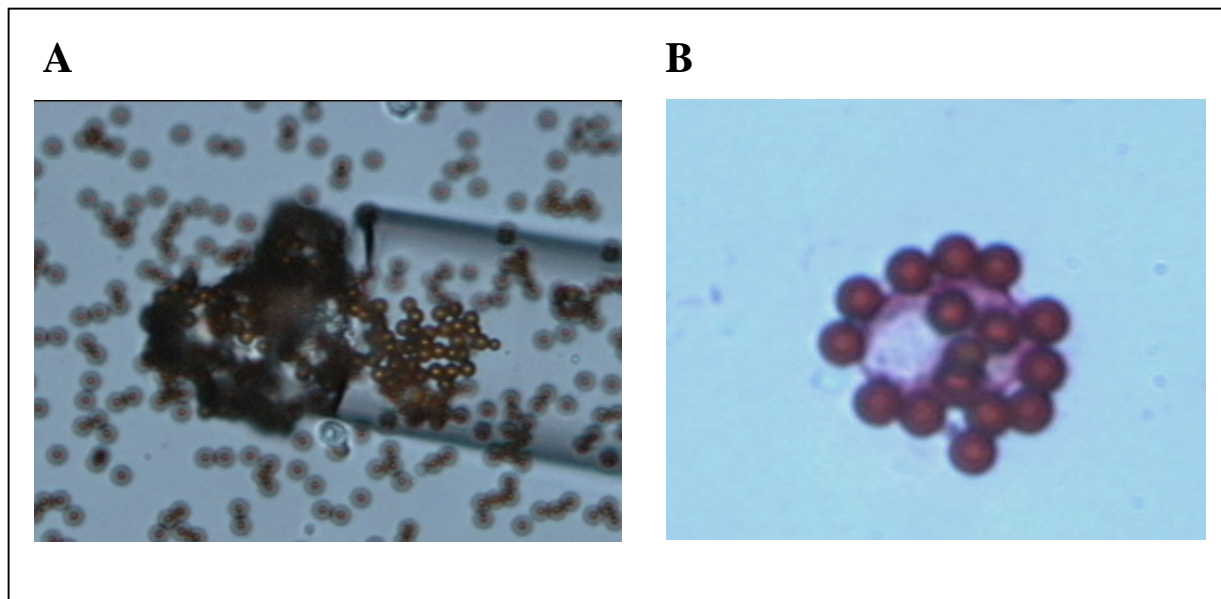
In ca. 30 % (25 Patienten) der Proben waren zwar verdächtige Zellen enthalten, diese zeigten aber morphologische Zellveränderungen (Zellschwellung, gelblich verfärbte Innenstruktur, unregelmäßige Oberfläche), siehe Abbildung 20, E - H. Trotz der beobachteten Zellschäden wurden von 20 Patienten (ca. 25 %) bis zu 48 auffällige Zellen isoliert und zum Teil für weitere nicht-quantitative Untersuchungen auf DNA- und RNA Ebene verwendet.

Bei einem einzigen Patienten wurden mehr als 100 markierte, intakte Zellen isoliert. Diese Beobachtung war gut vereinbar mit der Tatsache, daß der Patient an einem ausgedehnten, inoperablen Magenkarzinom erkrankt war und auch in einer durch die Routinehistologie untersuchten Peritonealspülung laut histologischem Gutachten „massenhaft“ Tumorzellen nachgewiesen wurden.

Im Knochenmark einer Mammakarzinom-Patientin wurde ein aus ca. zehn *bead*-markierten Zellen bestehendes Zell-Cluster beobachtet (Abb. 21, A). Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Mammakarzinome häufig Knochenmetastasen bilden und sich der Tumor nach klinischen Angaben bereits in einem metastasierenden Stadium befand, könnte das Zell-Cluster eine Mikrometastase darstellen. Bei derselben Patientin wurden auch einzelne markierte Zellen aus der Suspension entnommen, auf einem Objektträger getrocknet und anschließend immunzytochemisch gegen Zytokeratin 18 gefärbt. Die positive Färbung lieferte einen weiteren Anhaltspunkt für den epithelialen Ursprung der separierten Zellen (Abb. 21, B).



**Abb. 20:** Bildausschnitte mikroskopischer Aufnahmen von Zellen nach immunomagnetischer Anreicherung epithelialer Zellen aus Knochenmark verschiedener Patienten mittels BerEP4-gekoppelten magnetischen *beads*. [A-D] Morphologisch intakte, *bead*-markierte Zellen; [E-H] Morphologisch nicht intakte, *bead*-markierte Zellen mit deformierter Struktur (die Bilder B bis G wurden bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen, die Bilder A und H bei 400-facher Vergrößerung).



**Abb. 21:** Ausschnitte mikroskopischer Bilder. [A] Zell-Cluster aus ca. zehn *bead*-markierten Zellen nach immunomagnetischer Anreicherung epithelialer Zellen aus dem Knochenmark einer Mammakarzinom-Patientin (aufgenommen bei 100-facher Vergrößerung); [B] Immunzytochemischer Nachweis von Zytokeratin 18 (Rotfärbung des Zytoplasma in der APAAP-Färbung) in einer *bead*-markierten Zelle (aufgenommen bei 400-facher Vergrößerung).

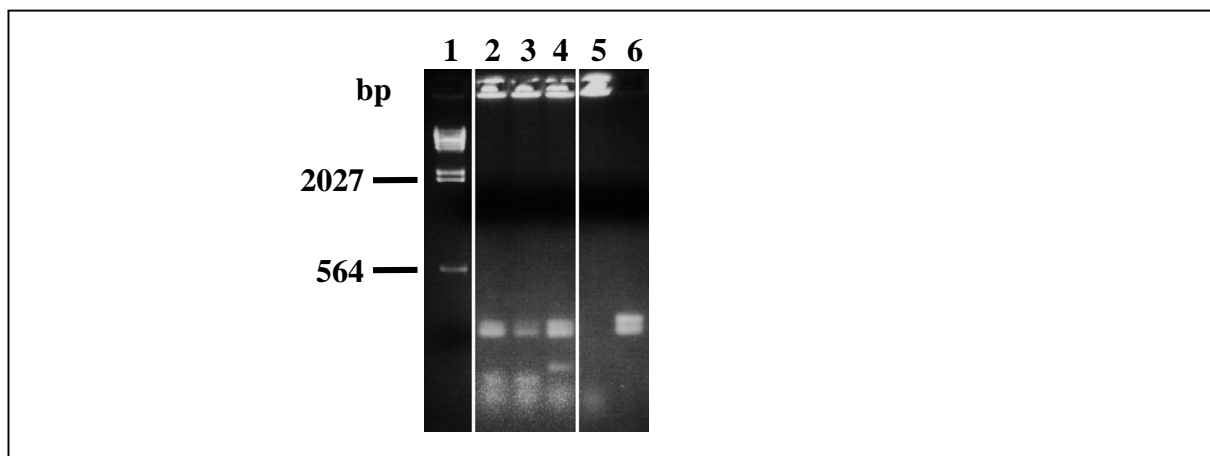
### 4.3 Molekulargenetische Untersuchung einzelner und weniger Tumorzellen

Mit dem Ziel, geringe Zahlen disseminierter Tumorzellen molekulargenetisch auf RNA- und DNA-Ebene zu untersuchen, wurden Methoden zur Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren aus einzelnen Zellen entwickelt bzw. optimiert.

#### 4.3.1 Simultane Isolierung von DNA und RNA

Um von einzelnen Zellen sowohl Untersuchungen auf DNA-, als auch auf RNA-Ebene durchführen zu können, wurde zunächst eine Methode zur simultanen Isolierung der beiden Nukleinsäuren entwickelt. Die mRNA wurde dabei mittels oligo(dT)-gekoppelten magnetischen *beads* (mRNA Direct Micro Kit, Dynal) aus Zell-Lysaten isoliert, die DNA konnte anschließend mittels einer Ethanol-fällung aus den Lysaten gewonnen werden. Nach getrennter Präamplifikation der beiden Nukleinsäuren mittels I-PEP (siehe 3.6.1), stand Material für jeweils zwölf bzw. 13 verschiedene PCR-Untersuchungen auf DNA bzw. cDNA-Ebene zur Verfügung.

Bei der Etablierung des Protokolls wurden durch Zell-Sortierung (FACStar<sup>Plus</sup>, Becton Dickinson) gewonnene Proben mit je zehn, fünf und einzelnen Zellen der Kolonkarzinom-Zelllinie SW480 verwendet.



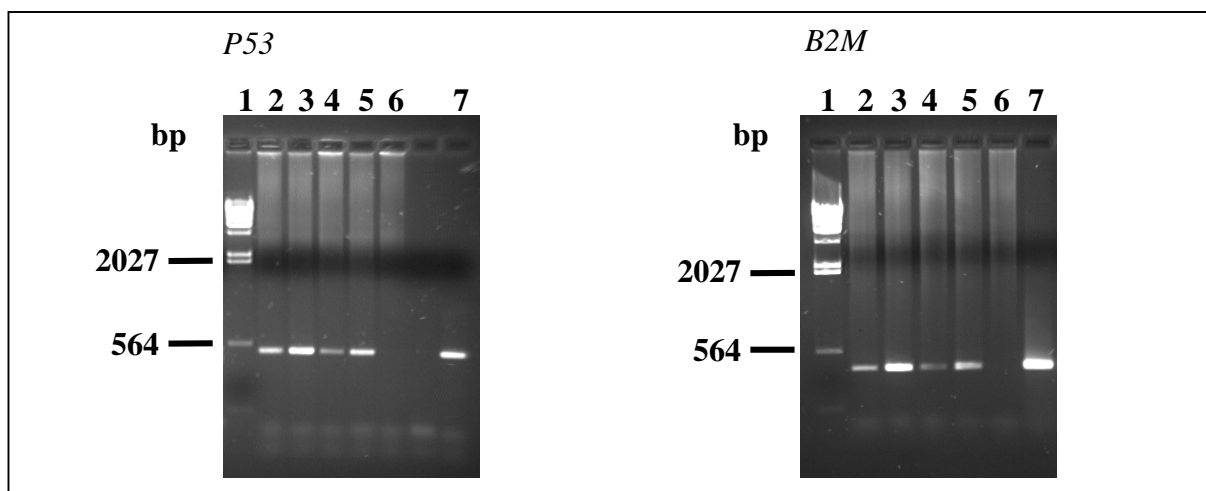
**Abb. 22:** 2 %iges Agarose-Gel mit PCR-Amplifikaten des Mikrosatelliten *D2S123*. 1:  $\lambda$ HindIII; 2 – 4: PCR nach Einsatz verschiedener Salzkonzentrationen während der Präzipitation von DNA aus zehn Zellen der Kolonkarzinom-Zelllinie SW480 (2: 0,8 M LiCl; 3: 0,5 M LiCl und 0,2 M NaCl; 4: 0,8 M LiCl und 0,2 M NaCl; angegeben sind jeweils die Endkonzentrationen im Lysat vor Zugabe von Ethanol); 5: H<sub>2</sub>O-Kontrolle; 6: Positivkontrolle (Blut-DNA).

### Optimierung der Salz-Konzentration für die DNA-Präzipitation

Nach der Isolierung der mRNA aus den Zell-Lysaten wurde der gesamte Ansatz zur Präzipitation der DNA in eine Ethanolfällung eingesetzt. Dabei wurde festgestellt, daß die Salzkonzentration während der Fällung Einfluß auf die Amplifizierungseffizienzen nachfolgender spezifischer PCR-Reaktionen hatte (Abb. 22). Von drei getesteten Salzkonzentrationen erwies sich die Präzipitation der DNA in Gegenwart von 0,8 M LiCl und 0,2 M NaCl (Spur 4) als optimal, da hier in der nachfolgenden PCR die stärkste Amplifikation erreicht wurde.

### Primer für die reverse Transkription von *bead*-gebundener mRNA

Als Primer für die reverse Transkription werden üblicherweise oligo(dT)-Primer oder *random* Hexamere (Mix zufällig ausgewählter Primer-Sequenzen aus sechs Nukleotiden) eingesetzt. Im hier verwendeten mRNA Direct Micro Kit sind oligo(dT)-Primer direkt an magnetische *beads* gekoppelt und dienen sowohl zur Isolierung der mRNA-Moleküle über die Hybridisierung mit deren poly(A)-Ende als auch für die Initiation der cDNA-Synthese. Um optimale Ergebnisse zu erreichen, wurde getestet, ob durch eine Kombination von oligo(dT)-Primern und *random* Hexameren während der cDNA-Synthese die Amplifizierungseffizienz nachfolgender PCR-Reaktionen verbessert wird. Wie in Abbildung 23 gezeigt, wurde durch den Einsatz beider Primer eine deutlich stärkere Amplifikation von cDNA-Fragmenten aus zehn bzw. 100 Zellen erreicht.

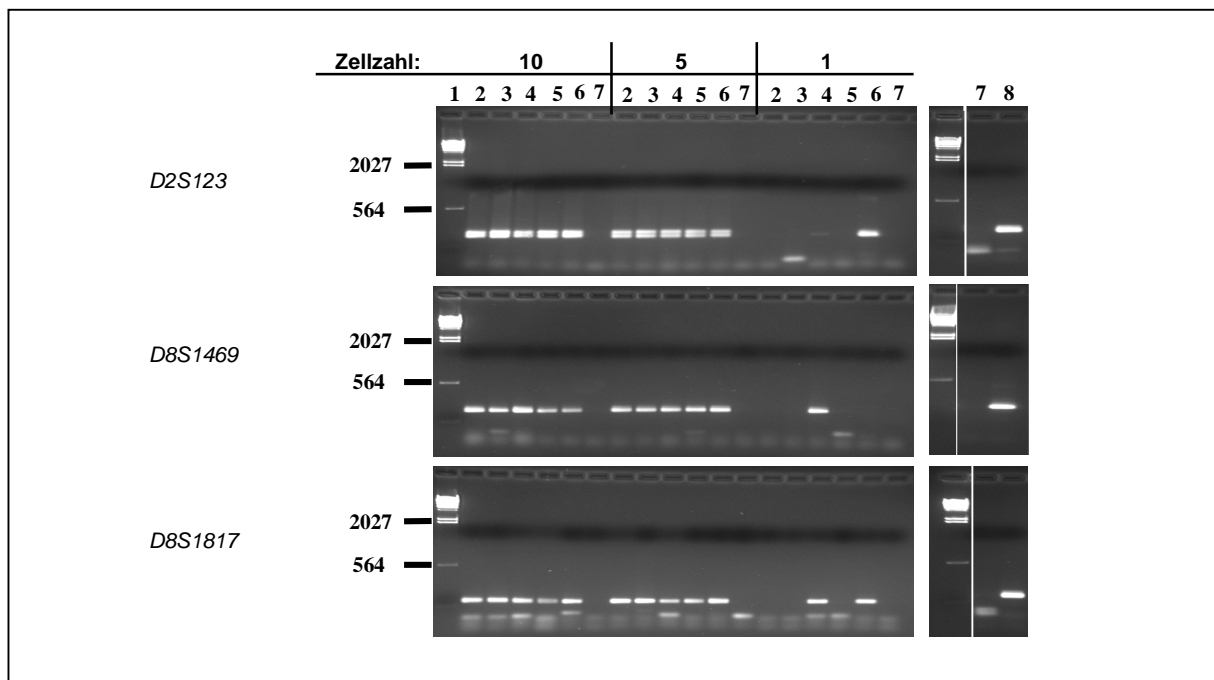


**Abb. 23:** 2 %ige Agarose-Gele mit PCR-Amplifikaten von cDNA-Fragmenten des *P53*- (Exon 5-10) und *B2M*-Gens. 1:  $\lambda$ HindIII; 2 – 5: PCR nach cDNA-Synthese mit bzw. ohne *random* Hexamere zusätzlich zu den *bead*-gebundenen oligo(dT)-Primern (2: Zehn Zellen mit *random* Hexamere; 3: 100 Zellen mit *random* Hexamere; 4: Zehn Zellen ohne *random* Hexamere; 5: 100 Zellen ohne *random* Hexamere); 6: H<sub>2</sub>O-Kontrolle; 7: Positiv-Kontrolle (cDNA Darm).

### 4.3.2 Amplifizierungseffizienzen von simultan isolierter DNA und RNA

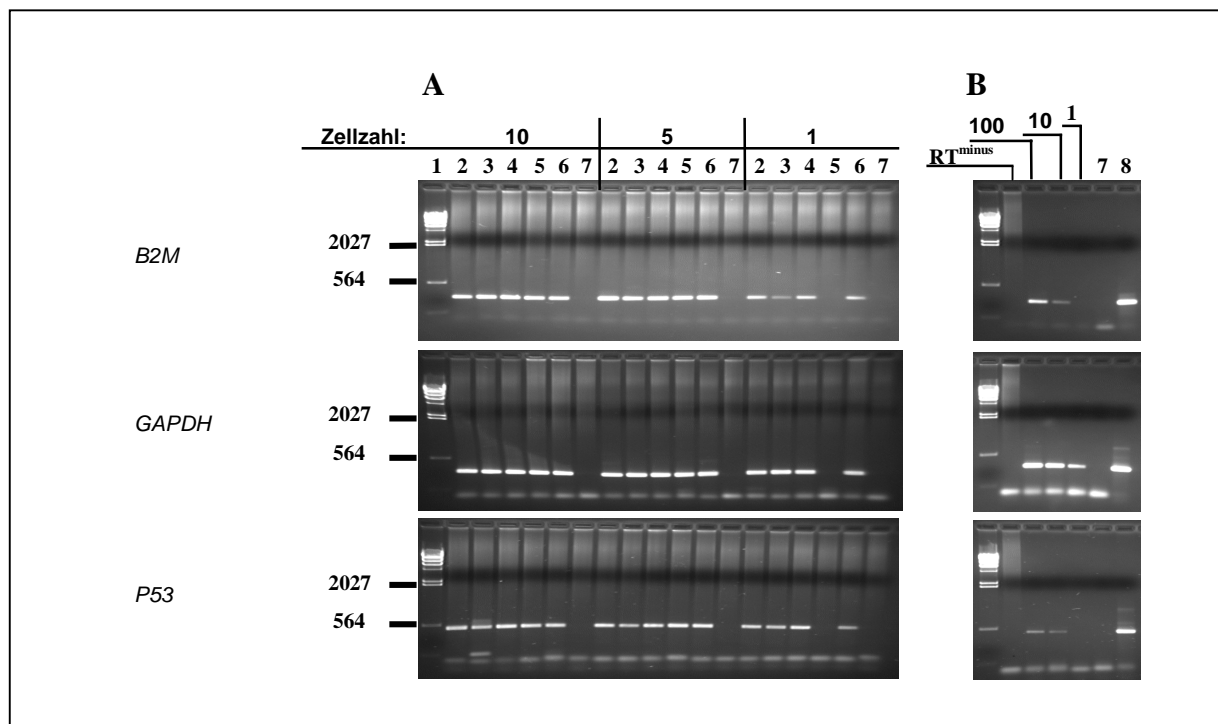
Die Zuverlässigkeit der Methode zur simultanen Isolierung von DNA und mRNA aus wenigen Zellen wurde nach Präamplifikation der DNA bzw. reverser Transkription der mRNA und Präamplifikation der cDNA in mehreren spezifischen PCR-Reaktionen überprüft (Abb. 24, 25).

Für die Amplifikation auf DNA-Ebene wurde 1 / 12 Aliquot der präamplifizierten DNA verwendet und zum Nachweis der Mikrosatelliten *D2S123*, *D8S1469* und *D8S1817* eingesetzt. Nach 50 PCR-Zyklen lieferten alle Proben mit zehn bzw. fünf Zellen in den verschiedenen PCR-Reaktionen ein Produkt, während eine Amplifikation nur in jeweils einer (*D2S123*, *D8S1469*) bis zwei (*D8S1817*) der fünf untersuchten Einzelzellen möglich war (Abb. 24).



**Abb. 24:** 2 %ige Agarose-Gele zur Darstellung der Amplifizierungseffizienz von DNA, simultan isoliert zur mRNA. Drei verschiedene Mikrosatelliten (*D2S123*, *D8S1469* und *D8S1817*) wurden durch spezifische PCR-Reaktionen überprüft. 1:  $\lambda$ HindIII; 2 – 6: Proben mit zehn, fünf und einzelnen Zellen; 7: H<sub>2</sub>O-Kontrollen; 8: Positiv-Kontrollen (Blut-DNA).

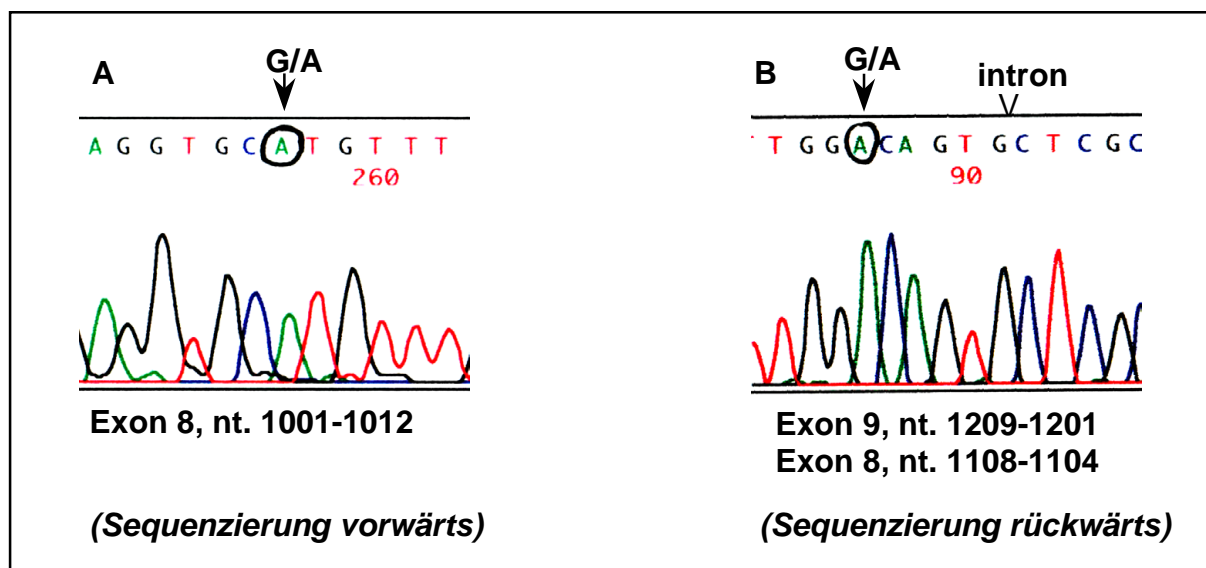
Für den cDNA-Nachweis der Gene *B2M*, *GAPDH* und *P53* wurde 1 / 13 Aliquot der präamplifizierten cDNA verwendet. Die Detektion der Transkripte war nach 50 PCR-Zyklen in allen Proben mit zehn bzw. fünf Zellen möglich, bei den Einzelzellen lieferten vier der fünf Proben ein spezifisches PCR-Produkt (Abb. 25, A). Parallel zur präamplifizierten cDNA wurde in den genannten PCR-Reaktionen auch 1 / 13 Aliquot nicht-amplifizierter cDNA untersucht, um den Einfluß der Präamplifikation auf die Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt zu überprüfen. Die Präamplifikation wirkte sich vor allem bei der Amplifikation von *B2M*- und *P53*-Transkripten aus. Nicht-amplifizierte cDNA von zehn bzw. fünf Zellen zeigte bei der Amplifikation dieser Sequenzen schwächere und bei Einzelzellen keine Signale. Für *GAPDH*-Sequenzen dagegen zeigten präamplifizierte und nicht-präamplifizierte Proben eine vergleichbare Stärke der PCR-Signale (Abb. 25, B).



**Abb. 25:** 2 %ige Agarose-Gele zur Darstellung der Amplifizierungseffizienz von mRNA, simultan isoliert zur DNA. cDNA-Sequenzen von *B2M*, *GAPDH* und *P53* wurden durch spezifische PCR-Reaktionen amplifiziert. [A] 1:  $\lambda$ HindIII; 2 – 6: Proben mit zehn, fünf und einzelnen Zellen nach Präamplifikation der cDNA; [B] Proben mit 100, zehn und einzelnen Zellen ohne Präamplifikation der cDNA; 7: H<sub>2</sub>O-Kontrollen; 8: Positiv-Kontrollen (cDNA Darm).

### 4.3.3 Sequenz-Analyse von Einzelzell-Transkripten nach cDNA-Präamplifikation

Die Eignung von präamplifizierter cDNA für die Mutationsanalyse wurde durch die Sequenzierung eines 509 bp-Fragments (Exon 5 –10) des *P53*-Gens einer einzelnen Zelle der kolorektalen Zelllinie SW480 überprüft. Die Zellen besitzen eine G → A Mutation im Codon 273 und eine C → T Mutation im Codon 309 (Rodrigues et al., 1990; Weiss et al., 1993). Beide Mutationen konnten im Produkt der spezifischen *P53*-PCR nach Präamplifikation der cDNA detektiert werden (Abb. 26)



**Abb. 26:** Elektropherogramm der Sequenzanalyse von *P53* an präamplifizierter cDNA einer einzelnen Zelle der kolorektalen Zelllinie SW480. Die nachgewiesenen Mutationen sind durch Pfeile markiert (Transition von G → A im Codon 273, Exon 8; Transition von C → T im Codon 309, Exon 9, hier dargestellt am komplementären Strang als G → A).

### 4.3.4 Array-Analysen weniger Zellen nach Präamplifikation der cDNA

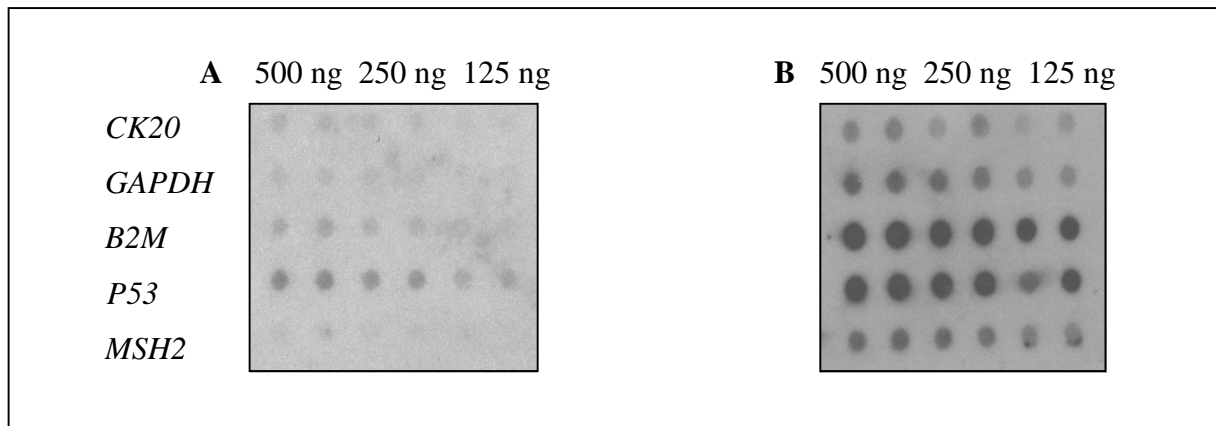
Für die Charakterisierung disseminierter Tumorzellen war vorgesehen, die Expression vieler Gene zu analysieren. Es wurde daher getestet, ob durch I-PEP-Amplifikation (siehe 3.6.1) ausreichende Mengen an cDNA in erforderlicher Qualität herstellbar sind.

#### Expressionsuntersuchungen mittels Dot Blot

Es wurden zunächst Dot Blots mit fünf verschiedenen PCR-Produkten hergestellt (*CK20* [cytokeratin 20], *GAPDH* [Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase], *B2M* [beta-2-



*microglobulin*], *P53* [*tumor protein p53*], *MSH2* [*mutS homolog 2*]). Diese wurden mit radioaktiv markierten Sonden aus amplifizierter cDNA aus 100 Zellen der Zelllinie HCT116 bzw. vergleichsweise mit 150 ng doppelsträngiger cDNA der gleichen Zellpräparation hybridisiert (Abb. 27). Die amplifizierte und nicht-amplifizierte cDNA zeigten näherungsweise ein vergleichbares Expressionsniveau für die untersuchten Gene.

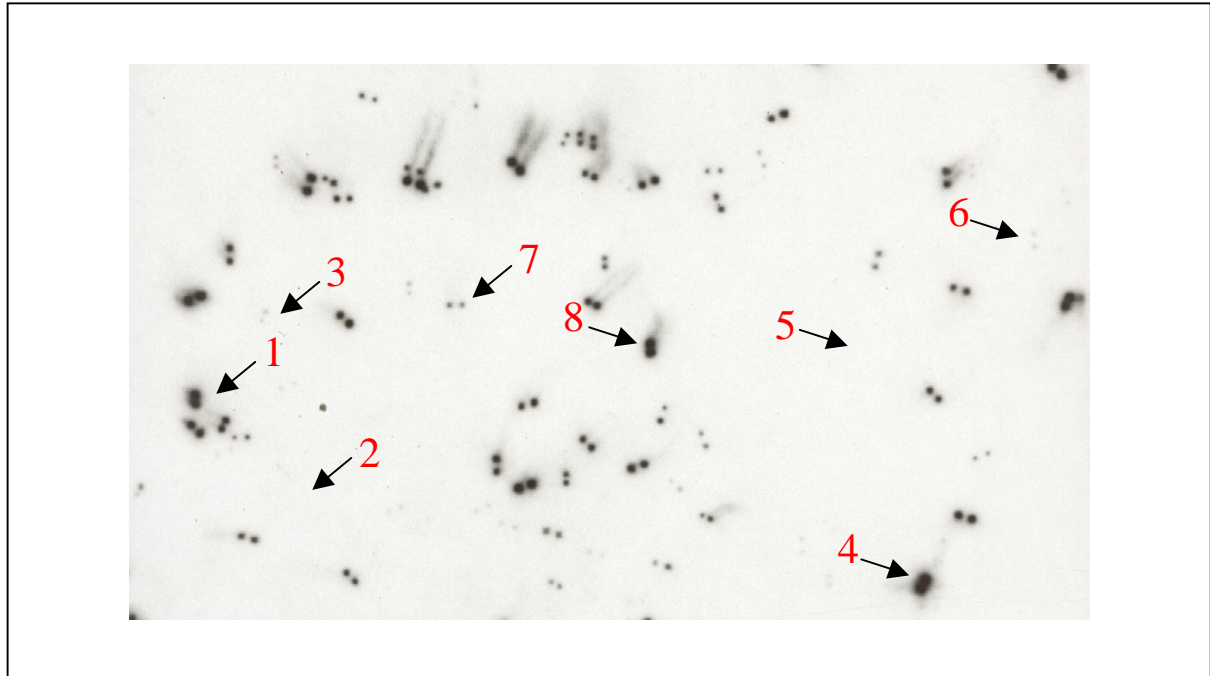


**Abb. 27:** Dot Blot-Hybridisierungen mit amplifizierter ([A] Sonde aus 100 HCT116 Zellen nach I-PEP) bzw. nicht-amplifizierter cDNA ([B] Sonde aus 150 ng doppelsträngiger cDNA der gleichen Zellfraktion). Gespottet waren jeweils Duplikate verschiedener Konzentrationen (500 ng, 250 ng, 125 ng) gereinigtes PCR-Produkt der Gene *CK20*, *GAPDH*, *B2M*, *P53* (Exon 5 – 10) und *MSH2*.

### Expressionsuntersuchungen mittels RZPD-Arrays

Aufgrund der relativ aufwendigen Herstellung der Dot Blots (Primer-Design, PCR-Etablierung, Aufreinigung und Quantifizierung der PCR-Produkte vor dem Spotten) wurden die Expressionsanalysen, v.a. auch im Hinblick auf die Untersuchung einer Vielzahl von Genen parallel, mit Arrays des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung GmbH (RZPD) fortgesetzt. Diese Arrays bestehen aus Nylon-Membranen und enthalten gewebespezifische menschliche cDNA-Bibliotheken in Form von 27648 im Duplikat aufgetragenen Bakterien-Klonen. Die cDNA-Sequenzen der Bakterienplasmide an den einzelnen Spots waren allerdings nicht bekannt, so daß für die Aufklärung der Hybridisierungssignale die entsprechenden Bakterien-Klone sequenziert wurden. Insgesamt wurden aus acht verschiedenen Klonen, die reproduzierbare Signale bei der Hybridisierung mit einer Sonde aus zehn Zellen (HCT116) nach I-PEP zeigten (Abb. 28), Sonden für nachfolgende Northern Blots hergestellt. Die Northern Blots dienen zur Überprüfung der Genexpression in nicht-amplifizierter RNA der gleichen Zell-Fraktion. Da die Expressionsraten der untersuchten Gene im Northern Blot nicht verifiziert werden konnten,

wurden die tatsächlichen Transkriptmengen durch die Amplifizierung offensichtlich verfälscht. Mittels I-PEP amplifizierte cDNA erwies sich daher für Array-Untersuchungen als nicht geeignet.



**Abb. 28:** RZPD-Filter mit Hybridisierungssignalen einer Sonde aus I-PEP-amplifizierter cDNA von 10 Zellen (HCT116). Aus den Klonen 1 - 8 wurden Sonden für folgende Expressionsanalysen (Northern Blot) in nicht-amplifizierter RNA hergestellt (Klon 2 und 5 dienten dabei als Negativ-Kontrolle).

#### 4.3.5 Molekulare Charakterisierung von isolierten Patienten-Zellen und korrespondierendem solidem Tumorgewebe

Die isolierten Zellen aus dem Knochenmark von sieben repräsentativ ausgewählten Patienten sollten anhand von Mutationen molekulargenetisch auf ihre Abstammung vom soliden Tumorgewebe untersucht werden. Da aufgrund der geringen Zellzahlen (zwischen 13 und 48) nur begrenztes Untersuchungsmaterial auf DNA- und RNA-Ebene zur Verfügung stand, wurden zunächst Mutationen in den entsprechenden Tumorgeweben bestimmt, die dann gezielt in den einzelnen Zellen überprüft werden konnten. Eine komplexe Genexpressionsanalyse mittels Array-Technik war nach den Ergebnissen aus 4.3.4 aufgrund der geringen Zellzahl nicht möglich.

Nach Mikrodissektion des Tumorgewebes (Tumorzellanteil > 80 %) wurden die Exons 5 – 9 von *P53* und die häufig betroffene „Mutation Cluster Region“ des *APC* Gens sequenziert

bzw. das Codon 12 des *K-RAS*-Gens mit einer *enrichment*-PCR untersucht. Sechs der sieben Patienten wiesen tumorspezifische Mutationen im *P53*-Gen auf, bei einem Patienten war das *APC*-Gen mutiert, und bei zwei Patienten konnte eine Mutation im Codon 12 des *K-RAS*-Gens nachgewiesen werden (Tab. 7).

Patient	Tumor	Mutation	Gen	Codon	AS-Austausch
Pat. A	Magenkarzinom	CGC ⇒ TGC	<i>P53</i> Exon 5	158	Arginin ⇒ Cystein
Pat. B	Rektumkarzinom	CGT ⇒ TGT	<i>P53</i> Exon 8	273	Arginin ⇒ Cystein
Pat. C	Metastase Mammakarzinom	Insertion / Deletion	<i>P53</i> Exon 7	230	
Pat. D	Lebermetastase Kolonkarzinom	CGG ⇒ TGG	<i>P53</i> Exon 7	248	Arginin ⇒ Tryptophan
		CGG ⇒ TGG	<i>P53</i> Exon 8	282	Arginin ⇒ Tryptophan
		GGT ⇒ <sup>x</sup>	<i>K-RAS</i>	12	
		Insertion / Deletion	<i>APC</i>	1320	
Pat. E	Kolonkarzinom	TGT ⇒ TTT	<i>P53</i> Exon 8	275	Cystein ⇒ Phenylalanin
		GGT ⇒ <sup>x</sup>	<i>K-RAS</i>	12	
Pat. F	Kolonkarzinom	CGG ⇒ TGG	<i>P53</i> Exon 8	282	Arginin ⇒ Tryptophan

**Tab. 7:** Mutationen, die in Tumorgeweben von sieben Patienten bei der Überprüfung häufig mutierter Regionen von *P53*, *APC* und *K-RAS* detektiert wurden (<sup>x</sup> bei *K-RAS* ist keine Aussage über den Nukleotidaustausch möglich, da die Mutation indirekt über den Verlust einer Restriktionsenzymststelle nachgewiesen wurde).

Aus Knochenmarksaspiraten isolierte Zellen (Patient A: 28; Patient B: 23; Patient C: 48; Patient D: 20; Patient E: 20; Patient F: 26; Patient G: 13 Zellen) wurden für die Extraktion von DNA und RNA verwendet (siehe 3.4.3). Die Qualität der Nukleinsäuren erwies sich dabei ausreichend für nachfolgende PCR-Reaktionen, da alle Zielsequenzen erfolgreich amplifiziert werden konnten.

Die Region um Codon 12 von *K-RAS*, sowie die Exons 4 bis 10 des *P53*-Gens wurden in allen Patientenzellen auf cDNA-Ebene sequenziert. Besonders bei *P53* bot sich die Sequenzierung der cDNA an, da hier Exon 4 bis 10 mit zwei PCR-Reaktionen amplifiziert werden konnten, während die Sequenzierung auf DNA-Ebene Exon-weise erfolgen muß. Bei Patient 04 wurde zusätzlich eine Sequenzierung des *APC*-Gens auf DNA-Ebene durchgeführt.

Die Mutationen, die bei den Patienten in den soliden Tumorgeweben vorhanden waren, konnten in den *bead*-markierten Zellen aus dem Knochenmark nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten die *bead*-markierten Zellen auch keine weiteren Mutationen in den untersuchten Regionen von *K-RAS* oder *P53*.

## **5 Diskussion**

Bei der Tumorprogression und Metastasierung treten in den Tumorzellen komplexe phänotypische Veränderungen als Folge einer Akkumulation genetischer Veränderungen auf. Fehlregulationen auf transkriptioneller Ebene, die zu einem Überangebot an Onkoproteinen und dem Verlust regulatorischer Tumorsuppressoren führen, sind für die speziellen Eigenschaften und Fähigkeiten der Tumorzellen mit verantwortlich.

Eine veränderte Genexpression gegenüber dem Normalgewebe ist auch charakteristisch für kolorektale Karzinome (Zhang et al., 1997). Mehrere bekannte Mutationen in den Tumorzellen betreffen z.B. Gene, deren entsprechende Proteinprodukte in regulatorischen Signaltransduktionswegen involviert sind und demnach, ebenso wie die genomische Instabilität und ein verändertes Methylierungsmuster, das Transkriptom der malignen Zellen beeinflussen. Die Bestimmung von abnormal exprimierten Genen in kolorektalen Tumoren ist daher ein vielversprechender Ansatz zur weiteren molekularen Charakterisierung dieser Gewebe und ermöglicht die Identifizierung von Proteinen, die bei der malignen Progression und Metastasierung beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurde die Genexpression kolorektaler Karzinome und Lebermetastasen im Vergleich zu normaler Darmschleimhaut untersucht, um progressions- bzw. metastasierungsrelevante, transkriptionelle Veränderungen in den neoplastischen Geweben zu identifizieren.

Zusätzlich wurden Methoden zur Isolierung und Charakterisierung einzelner disseminierter Tumorzellen entwickelt, um eine Grundlage für weitere molekularbiologische Analysen dieser Zellen im Hinblick auf die Metastasierung kolorektaler Karzinome zu schaffen.

### **5.1 Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Arrays**

#### **5.1.1 cDNA-Arrays**

Die Array-Technik ermöglicht ohne großen Zeitaufwand die Bestimmung der Expression einer Vielzahl von Genen simultan. In dieser Arbeit wurden vor allem die cDNA-Arrays Atlas Human Cancer 1.2 (Clontech) verwendet, auf denen neben neun „Haushaltsgenen“ insgesamt 1176 Zielgene enthalten sind. Diese Gene sind entweder als tumorrelevant bekannt oder

wurden im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen beschrieben. Die Arrays ermöglichen daher keine Identifizierung bisher unbekannter Gene. Alternativ wurden deshalb zu Beginn des Projekts Arrays des RZPD (RessourcenZentrum / PrimärDatenbank im Deutschen Humangenomprojekt) verwendet, auf denen gewebespezifische menschliche cDNA-Bibliotheken in Form von 27.648 im Duplikat aufgetragenen Bakterien-Klonen enthalten sind. Abgesehen davon, daß die RZPD-Arrays oftmals eine ungenügende Qualität hatten, waren sie aus folgenden Gründen nicht für weitere Experimente geeignet:

- die cDNA-Fragmente in den Bakterien waren nicht bekannt und mußten einzeln nach Anzüchtung der entsprechenden Klone und Plasmid-Isolierung durch Sequenzierung charakterisiert werden (aufgrund des Arbeitsaufwandes nicht für ein Expressionsprofiling geeignet)
- es bestand eine hohe Redundanz der Klone auf den Arrays
- es gab Hinweise auf mögliche Mischpopulationen an den einzelnen Spots
- keine ausreichende Verfügbarkeit (von Herstellerseite)

Die kommerziell erhältlichen Atlas Human Cancer 1.2 Arrays waren dagegen qualitativ hochwertig und ermöglichten die zuverlässige Expressionsanalyse einer Vielzahl definierter Gene parallel. Da die Gene zwar von der Sequenz bekannt sind, aber in vielen Fällen noch nicht im Zusammenhang mit der Progression kolorektaler Karzinome beschrieben wurden bzw. noch weitgehend uncharakterisiert sind, boten auch diese Arrays die Möglichkeit zur Identifizierung interessanter Genexpressionsveränderungen.

### **5.1.2 Patientenmaterial**

Insgesamt wurden 25 kolorektale Tumoren, normales Darmepithel derselben Patienten und 14 Lebermetastasen für die Erstellung von Genexpressionsprofilen mittels Array-Technik verwendet. Bei der Auswahl der Tumorproben wurde bevorzugt auf Patienten geachtet, von denen sowohl ein Primärtumor als auch eine Metastase zur Verfügung standen. Desweiteren wurden Tumoren mit unterschiedlich invasivem Stadium (pT1 - pT4) und Lymphknotenstatus (N0 - N2) in die Untersuchungen eingeschlossen. Die Selektion der Patientenproben erfolgte mit dem Ziel, Veränderungen der Genexpression während der Progression und Metastasierung kolorektaler Tumoren zu erfassen.

Auch andere Arbeitsgruppen haben mittlerweile über Array-Expressionsanalysen von kolorektalen Tumorgeweben und Metastasen berichtet (Tab. 7). Allerdings wurde hier keine systematische Untersuchung der verschiedenen Tumorstadien (pT1 - pT4) im Vergleich zu korrespondierenden Lebermetastasen durchgeführt.

**Tab. 7**

<b>Material</b>	<b>Array (Ziel-Sequenzen)</b>	<b>Auswertung</b>	<b>Autor, Jahr</b>
Zelllinien: 3 x aus nicht-neoplastischer Kolonschleimhaut 3 x mit muzinösem Phänotyp 3 x mit nicht-muzinösem Phänotyp	Atlas-Array, Clontech (588)	Paarweiser Vergleich der Gewebegruppen	Backert et al., 1999
40 Karzinome (darunter eine Metastase eines der Tumoren) 22 normale Kolongewebe Zelllinien EB und EB1	Affymetrix Hum6000 (3.200 Gene, 3.400 ESTs)	Clusteranalyse (2.000 Gene)	Alon et al., 1999
Zelllinien: KM12C (nicht-metastasierend) KML4A (metastasierende Variante von KM12C) KM20 1 x normale Darmschleimhaut, Primärtumor und Metastase eines Patienten	Atlas Human 1.2 cDNA Expression Array, Clontech (ca. 1.200)	Paarweiser Vergleich	Hernandez et al., 2000
4 Adenome und korrespondierende normale Darmschleimhaut	Human 6500 GeneChip (6.000 Gene und ESTs)	Clusteranalyse (1.096 Gene) inkl. 18 Tumor- und Normalgeweben aus Alon et al., 1999  Paarweiser Vergleich der Gewebegruppen	Notterman et al., 2001
2 x Karzinom und korrespondierende normale Darmschleimhaut	Atlas human cDNA expression array (588 Gene)	Paarweiser Vergleich	Tsunoda et al., 2001
8 x Karzinom und korrespondierende normale Darmschleimhaut	Eigene Herstellung aus 9.216 Genen und ESTs	Paarweiser Vergleich	Kitahara et al., 2001
Zelllinien: KM12C KM12L4A (metastasierende Variante von KM12C) KM12SM (metastasierende Variante von KM12C) SW480 (aus einem Primärtumor) SW620 (aus einer LK-Metastase des gleichen Patienten wie SW480)	Eigene Herstellung aus 19.200 Genen und ESTs	Paarweiser Vergleich	Hegde et al., 2001

## Fortsetzung Tab. 7

Material	Array (Ziel-Sequenzen)	Auswertung	Autor, Jahr
10 Primärtumoren 10 korrespondierende Lebermetastasen	Eigene Herstellung aus 9.121 Genen und ESTs	Paarweiser Vergleich	Yanagawa et al., 2001
Zelllinien: KM12C KM12L4A KM12SM	Affymetrix HuGene FL array (5.600)	Paarweiser Vergleich	De Lange et al., 2001
Pool aus 9 Primärtumoren Pool aus 3 Primärtumoren Pool aus korrespondierenden Normalgeweben	GDA 1.2, 1.3 ; Incyle- Genomics, Inc. (18.376)	Paarweiser Vergleich	Pinheiro et al., 2001
12 fortgeschrittene Primärtumoren Pool aus 12 x normaler Schleimhaut	Colonochip, eigene Herstellung (4.608)	Paarweiser Vergleich	Takemasa et al., 2001
Zelllinien SW480 SW620	Eigene Herstellung (2.280)	Paarweiser Vergleich	Otsuka et al., 2001
15 Lebermetastasen 8 Zelllinien aus Lebermetastasen- Biopsien 9 Normalgewebe vom Kolon	Custom Expression Monitoring DNA Microarray; Affymetrix GeneChip technology (ca. 55.000)	Korrelation von 2.146 Transkripten mit amplifizierten Regionen 7p, 8q, 13 q, 20 q (CGH)	Platzer et al., 2002

**Tab. 7:** Veröffentlichungen über Genexpressionsanalysen bei kolorektalen Karzinomen, Lebermetastasen bzw. kolorektalen Zelllinien mittels cDNA-Array-Technik.

Für die Erstellung der Expressionsprofile wurden in dieser Arbeit manuell mikrodisezierte Tumorareale verwendet, in denen durch einen Pathologen ein Anteil von mindestens 70 % Tumorzellen bestätigt worden war. Eine Laser-assistierte Mikrodisektion wurde aus den folgenden zwei Gründen nicht durchgeführt:

- Aufgrund des geringen Ausgangsmaterials wäre eine Amplifikation der isolierten RNA erforderlich gewesen, da eine Mindestmenge von 2 µg RNA für die Array-Hybridisierungen benötigt wurde.
- An der malignen Progression epithelialer Tumoren sind nicht nur die Tumorzellen, sondern auch das mesenchymale Tumorstroma aktiv beteiligt (Liotta et al., 2001). Genexpressionsveränderungen in den Stromazellen sollten daher ebenfalls berücksichtigt werden.

In jedem Fall müssen abnormal exprimierte Gene zur genauen Lokalisation der Expression, auch nach Mikrodisektion, in Tumor- und Stromazellen untersucht werden. In mikrodiseziertem Tumormaterial überexprimierte Gene, wie z. B. das *BIGH3*-Gen (Kitahara, et al., 2001; siehe Tab. 7), können in den Stromazellen des Tumors eine weitaus höhere

abnormale Expression zeigen (Buckhaults et al., 2001). Das Tumorstroma wird deshalb heutzutage sogar als Angriffspunkt neuer Krebstherapien diskutiert (Liotta et al., 2001 [2]). Möglicherweise sind auch Proteine, die vom Tumorstroma produziert werden, als diagnostische Marker geeignet (Buckhaults et al., 2001).

Auch zur Klassifizierung von Tumoren mittels Clusteranalyse scheint eine Mikrodissektion nicht erforderlich bzw. nicht vorteilhaft zu sein. In aktuellen Arbeiten, in denen nach Genexpressionsanalysen eine Subgruppierung von Tumorgewebe bei verschiedenen soliden Tumoren wie Lungen- und Mammakarzinomen oder Melanomen gelang, wurde nur „grob disseziertes“ Patientenmaterial verwendet (Garber et al., 2001, Bhattacharjee et al., 2001, Sorlie et al., 2001, Bittner et al., 2000).

### **5.1.3 Expressionsanalysen**

Die Ergebnisse von Array-Expressionsanalysen haben einen sehr umfangreichen Informationsgehalt, aus dem überschaubare Daten selektiert werden müssen. Ein paarweiser Vergleich von Daten ist möglich, wenn einzelne bzw. gepoolte Gewebe oder Zell-Linien untersucht werden (siehe Tab. 7; Hernandez et al., 2000; Pinheiro et al., 2001; Tsunoda et al., 2001; Hegde et al., 2001; De Lange et al., 2001; Otsuka et al., 2001) bzw. wenn die Expressionsdaten gewebespezifisch zusammengefaßt werden (Backert et al., 1999; Notterman et al., 2001). Bei der Untersuchung mehrerer Proben kann auch eine paarweise Analyse korrespondierender Gewebe erfolgen und die Anzahl der Fälle bestimmt werden, die von einer bestimmten Genexpressionsänderung betroffen sind (Kitahara et al., 2001; Yanagawa et al., 2001; Takemasa et al., 2001).

Clusteranalysen wurden bisher zur Auswertung von Genexpressionsdaten kolorektaler Tumorgewebe nur von Alon und Notterman durchgeführt (Alon et al., 1999; Notterman et al., 2001). Alon fand eine relativ deutliche Trennung der Tumorgewebe von den korrespondierenden Normalgeweben, eine Subgruppierung der Tumorgewebe blieb allerdings unkommentiert. Auch Notterman, der mit einer Clusteranalyse die Expressionsdaten von vier Adenomen sowie 18 Tumor- und Normalgeweben aus der Arbeit von Alon untersuchte, konzentrierte sich auf die Separation der Adenome, Tumorproben und Normalgewebe und korrelierte die Subgruppierung der Tumorgewebe nicht mit klinischen Informationen.



In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze zur Auswertung der Expressionsdaten gewählt:

- paarweiser Vergleich der Genexpression von Tumor- und Normalgeweben
- Clusteranalyse zur Organisation aller Expressionsprofile
- statistische Auswertung zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene

#### **5.1.3.1 Paarweiser Vergleich von Tumor- und Normalgeweben**

Ein paarweiser Vergleich der 25 Tumor- und entsprechenden Normalgewebe diente zur Identifizierung von Genen, die in kolorektalen Karzinomen eine veränderte Genexpression aufweisen. Um deutliche Unterschiede zwischen neoplastischen und nicht-neoplastischen Geweben darzustellen, wurden daher definierte Kriterien zur Selektion differentiell exprimierter Gene verwendet. In Tabelle 2 wurden nur Gene aufgelistet, die in mehr als 25 % der untersuchten Fälle eine mehr als vierfache differentielle Genexpression zeigten. Bei der Interpretation der Tabelle müssen daher folgende Tatsachen berücksichtigt werden. Einige Gene waren generell in Tumorgeweben differentiell exprimiert, allerdings lag die Größe der differentiellen Expression teilweise unter der definierten Auswahlgrenze (Faktor 4). Z.B. *BIGH3*, *MIC1*, *MYC*, *CKS2*, *ERBB3* und *MMP11* zeigten in den meisten bzw. allen Tumorgeweben eine Überexpression und besitzen daher offensichtlich eine besondere Bedeutung für kolorektale Karzinome. Andererseits war die Anzahl der dysregulierten Gene in den Tumoren weit höher als in der Tabelle genannt. Viele der Gene zeigten jedoch ein sehr heterogenes Expressionsmuster zwischen den Geweben und fielen daher bei weniger als 25 % der Patienten auf. Diese Gene kennzeichnen deutlich die Individualität der verschiedenen Tumoren, auf der wiederum z.B. ein unterschiedlicher Verlauf der Erkrankung basieren könnte.

#### **5.1.3.2 Clusteranalyse**

Zur Identifizierung von Tumor-Subgruppen und gruppenspezifischen Expressionsmustern wurde mit den Expressionsdaten der 25 Tumor- bzw. Normalgewebe und 14 Lebermetastasen eine Clusteranalyse (Software Cluster und TreeView; Eisen et al., 1998) durchgeführt.

#### **Vergleich von Tumor- und Normalgewebe**

Tumor- und Normalgewebe wurden bei der Clusteranalyse voneinander getrennt und an den zwei Hauptästen eines Dendrogrammes angeordnet (Abb. 15). Die großen Abstände zwischen den verschiedenen Gewebetypen im Dendrogramm sind ein Hinweis auf deutliche Unterschiede im Expressionsprofil.

Ein Tumorgewebe befand sich in der Gruppe der Normalgewebe. Durch die histologische Begutachtung des Tumors wurde allerdings ausgeschlossen, daß der Tumorzellanteil in diesem Gewebe unter der definierten Mindestgrenze von 70 % lag. Darüberhinaus ließ das Expressionsprofil des Tumors auf dem Array typische tumorspezifische Veränderungen erkennen. Der Grund für die Gruppierung konnte daher nicht nachvollzogen werden und beruhte offenbar auf subtilen Expressionsdaten, die es der Software nicht ermöglichten, den Tumor zu den anderen neoplastischen Geweben zu gruppieren.

Zur Kontrolle wurde ein Array von normalem Leberparenchym eines Patienten hergestellt (Patient 11) und in die Clusteranalyse miteinbezogen. Das Expressionsprofil der Leber war den normalen Darmgeweben offensichtlich ähnlicher als den Tumorgeweben und wurde daher, allerdings als separater Ast, innerhalb der Gruppe der Normalgewebe eingeordnet. Der Abstand zwischen Leber- und Darmgeweben im Dendrogramm weist dabei aber auf deutliche Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Gewebetypen hin.

Sieben der untersuchten Primärtumoren wurden im Rahmen der Routinehistologie auf eine Mikrosatelliteninstabilität getestet, wobei vier Tumoren (Patienten 3, 5, 28, 30) als Mikrosatelliten-stabil (MSS) und drei Tumoren (Patienten 13, 16, 27) als -instabil (MSI) bewertet wurden. In der Clusteranalyse zeigte sich jedoch keine Trennung der MSS- von den MSI-Tumoren, da die Expression der untersuchten Gene offenbar zu wenig variierte.

Trotz deutlicher Unterschiede im Karzinogenese-Mechanismus zwischen MSS- und MSI-Tumoren („Tumorsuppressor-Pathway“ bzw. „Mutator-Pathway“, Übersicht siehe in Rüschhoff et al., 1998) ist eine ähnliche Genexpression der Tumoren durchaus vorstellbar, da wichtige biochemische Signalwege in beiden Tumortypen von Mutationen betroffen sind. Zum Beispiel treten *APC*-, *K-RAS*- und *P53*-Mutationen sowie variable Inaktivierungsmechanismen im TGFB (*transforming growth factor beta*)-Signaltransduktionsweg sowohl in MSS- als auch in MSI-Tumoren auf (Huang et al., 1996; Ionov et al., 1993; Aaltonen et al., 1993; Lazar et al., 1994; Grady et al., 1999). Diese Mutationen beeinflussen letztendlich auch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und somit die Expression vieler Gene. Allerdings muß auch berücksichtigt werden, daß die Zahl der untersuchten MSI-Tumoren möglicherweise zu gering war, um in der Clusteranalyse eine separate Gruppierung dieser Gewebe zu erreichen.

### Vergleich der verschiedenen Tumorgewebe

Die Tumorgewebe wurden von der Software in zwei verschiedene Subgruppen klassifiziert, die mit der histopathologischen Einteilung der verschiedenen Tumoren korrelierte. Die Gruppen wurden daher nach eigener Definition als „*low stage*“ und „*high stage*“ bezeichnet. Ersichtlich aus der Länge der Dendrogramm-Äste ist, daß sich die *low stage*- und die *high stage*-Gruppe in der Genexpression weniger deutlich voneinander unterschieden als die Normalgewebe von den Tumorproben.

- Die Subgruppe 1 (*low stage*) enthält alle untersuchten pT1-, pT2-, und pT3-Tumoren, die entweder nicht metastasiert waren oder eine relativ geringe lymphogene Metastasierungsrate aufwiesen (maximal fünf Metastasen in 25 untersuchten Lymphknoten). Nur zwei der pT3-Tumoren waren hämatogen metastasiert. Die Lebermetastasen dieser Tumoren wurden ebenfalls in diese Subgruppe klassifiziert.
- Die Subgruppe 2 (*high stage*) enthält alle übrigen Lebermetastasen (elf von 14), alle pT4-Tumoren und zwei fortgeschrittene pT3-Tumoren. Einer dieser pT3-Tumoren war bereits in alle 21 untersuchten Lymphknoten metastasiert, der andere Tumor war sowohl lymphogen als auch hämatogen metastasiert.

Um die Robustheit der Klassifizierung zu überprüfen, wurde eine weitere Clusteranalyse durchgeführt, in die nur die Expressionsprofile der Tumorgewebe eingesetzt wurden (Abb. 17). Die Gruppierung der Gewebeproben zeigte sich unverändert bis auf die erwähnten pT3-Tumoren der *high stage*-Gruppe, die nun der *low stage*-Gruppe zugeordnet wurden, allerdings mit deutlichem Abstand zu den übrigen Geweben. Die Zusammensetzung der *low stage*- und *high stage*-Gruppe sowie die Tatsache, daß die fortgeschrittenen pT3-Tumoren nicht eindeutig einer der beiden Subgruppen zugeordnet werden konnten, läßt vermuten, daß die Bildung der Gruppen bei den Clusteranalysen auf Genexpressionsdifferenzen basierte, die zwischen pT1/ pT2 / pT3-Tumoren und pT4-Tumoren bestehen.

Die zwei hämatogen metastasierten pT3-Tumoren, die einschließlich der korrespondierenden Lebermetastasen in der *low stage*-Gruppe enthalten waren, zeigten klinische Auffälligkeiten. Ein pT3-Tumor stammte von einem 27-jährigen Patienten, bei dem zusätzlich zum Karzinom 20 Adenome entfernt werden mußten und daher der Verdacht auf eine attenuierte Form einer FAP (*familial adenomatous polyposis*) besteht. Der zweite pT3-Tumor, der bei einem 61-jährigen Patienten entfernt wurde, war zum Zeitpunkt der Operation nicht lymphogen aber bereits hämatogen metastasiert und zeigte einen fulminanten klinischen Verlauf. 4 Monate bzw. 12 Monate nach der Operation des Primärtumors wurden trotz Chemotherapie eine

weitere Lebermetastase entfernt und eine Knochenmarkskarzinose diagnostiziert. Der Patient verstarb 21,5 Monaten nach der Operation des Primärtumors. In beiden Fällen ist denkbar, daß bisher nicht identifizierte, biologische Faktoren für eine hämatogene Metastasierung in den Tumoren vorhanden waren, die sich allerdings nicht im allgemeinen Expressionsmuster zeigten bzw. zu gering waren, um eine Abtrennung von den übrigen Tumoren durch die Cluster-Software zu erreichen.

### **Vergleich von Primärtumoren und korrespondierenden Lebermetastasen**

Von sechs Patienten konnten zusätzlich zum Primärtumor insgesamt sieben korrespondierende Lebermetastasen untersucht werden. Die verschiedenen Gewebe derselben Patienten wurden durch die Clusteranalyse in den gleichen Subgruppen angeordnet, in vier Fällen sogar an den gleichen Endverzweigungen des Dendrogrammes. Interessant war, daß zwei Metastasen im Dendrogramm direkt benachbart zum Tumor gruppiert wurden, obwohl sie eineinhalb bzw. vier Monate nach dem Primärtumor reseziert worden waren und ein Patient zwischenzeitlich eine Chemotherapie erhalten hatte. Offensichtlich ist zwischen den Expressionsprofilen korrespondierender Tumorgewebe der Patienten eine große Ähnlichkeit vorhanden, die selbst über Monate relativ stabil in den neoplastischen Geweben bestehen kann. Die geringen Genexpressionsveränderungen, die in der Metastase eines Patienten trotz Chemotherapie nachgewiesen wurden, deuten auf die Resistenz des neoplastischen Gewebes gegenüber der medikamentösen Behandlung hin. Diese Vermutung korreliert mit der Tatsache, daß ein großer Anteil vitales Tumorgewebe innerhalb der Metastase vorhanden war. Eine enge Gruppierung von Gewebeproben desselben Patienten in der Clusteranalyse wurde auch von Perou und Garber bei Expressionsanalysen an Mamma- und Lungenkarzinomen beobachtet (Perou et al., 2000; Garber et al., 2001). Das Untersuchungsmaterial von Perou enthielt Gewebeproben von 20 Mammakarzinomen vor und nach Chemotherapie bzw. zwei Primärtumoren und korrespondierende Lymphknotenmetastasen. In der Clusteranalyse wurden 19 der 22 Gewebepaare an den gleichen Endverzweigungen des Dendrogrammes angeordnet. Auch bei Garber sind alle Gewebepaare gleicher Patienten direkt benachbart im Dendrogramm zu finden.

Die molekulare Multistep-Karzinogenese ist bei kolorektalen Tumoren mit Genexpressionsänderungen assoziiert, was sich in einer Trennung der Normalgewebe von den Karzinomen bzw. Adenomen in der Clusteranalyse zeigt (eigene Arbeit; Notterman et al., 2001). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit können aber metastasierte Karzinome und Metastasen durch Clusteranalysen nicht deutlich von den weniger fortgeschrittenen

Tumorstadien abgegrenzt werden, da offenbar keine einheitlichen Genexpressionsänderungen vorhanden sind. In diesem Zusammenhang ist besonders ein kürzlich veröffentlichtes Modell zur Metastasierung von Tumoren interessant (Brabletz et al., 2001). Den Autoren zufolge ist für die Metastasierung gut differenzierter Tumoren nicht eine deutliche Akkumulation metastasierungsspezifischer genetischer Veränderungen oder stabiler Expressionsunterschiede in den Tumorzellen verantwortlich. Vielmehr induziert die unmittelbare Tumorzell-Umgebung an der Invasionsfront eine transiente Dedifferenzierung der Tumorzellen zu einem mesenchymalen Phänotyp, wodurch die Migrations- und Disseminationsfähigkeit dieser Zellen gefördert wird. Bei der Bildung einer Metastase im Sekundärorgan erfolgt die Redifferenzierung der Tumorzellen zum epithelialen Phänotyp, assoziiert mit dem Expressionsverhalten des Primärtumors. Wenig differenzierte Primärtumoren dagegen zeigen bereits einen großen Verlust epithelialer Eigenschaften, so daß der Metastasierungsprozeß ohne eine zusätzliche transiente Transdifferenzierung erfolgen kann (Brabletz et al., 2001). Auch dieser Fall setzt keine spezifischen Genexpressionsdifferenzen zwischen Primärtumor und Metastase voraus.

Die enge Gruppierung in der Clusteranalyse besagt, daß die Expressionsprofile zwischen Primärtumor und Metastase in vielen Fällen offenbar größere Ähnlichkeiten zueinander zeigen als zu den übrigen Gewebeproben. Trotzdem können zwischen den verschiedenen neoplastischen Geweben eines Patienten geringe aber möglicherweise wesentliche Expressionsdifferenzen vorhanden sein, die bei einer Clusteranalyse methodisch bedingt nicht erkennbar sind. Paarweise Vergleiche der Expressionsprofile von Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen wurden deshalb ebenfalls durchgeführt und werden unter 5.1.3.4 diskutiert.

### **5.1.3.3 Statistische Auswertung zur Ermittlung differentiell exprimierter Gene**

Eine statistische Auswertung (Mann-Witney-U-Test) wurde durchgeführt, um Gene zu identifizieren, deren Expression sich zwischen Tumor- (einschließlich Metastasen) und Normalgeweben bzw. der *low stage*- und *high stage*-Gruppe unterscheidet.

### **Differentiell exprimierte Gene zwischen Tumor- und Normalgewebe**

Eine Überexpression im neoplastischen Gewebe zeigten die Gene mehrerer Transkriptionsfaktoren, Proteine des Zellzyklus, der Proliferation und Signaltransduktion sowie Zytoskelettelemente und mit der extrazellulären Matrix (ECM) assoziierte Moleküle (Tab. 5).

Einige dieser Gene sind bereits im Zusammenhang mit der Progression kolorektaler Karzinome bekannt, was die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt. Bis auf wenige Ausnahmen fielen die Gene, die mit Hilfe der Statistik als differentiell exprimiert identifiziert wurden, auch beim paarweisen Vergleich der einzelnen Tumor- und Normalgewebepaare auf (siehe Tab. 2).

Unter den überexprimierten Transkriptionsfaktoren befinden sich bekannte Onkoproteine wie MYC, aber auch E1A-F (*adenovirus E1A enhancer-binding protein*) und AP-4 (*activating enhancer-binding protein 4*), die bisher nicht bei kolorektalen Tumoren untersucht wurden, sowie FRA1 (*FOS-like antigen 1*).

*E1A-F* ist ein Mitglied der *ETS (E26 transformation specific)*-Onkogen-Familie. Der Transkriptionsfaktor spielt offensichtlich über die Aktivierung der Expression von Metalloproteinasen eine wichtige Rolle bei der Tumorzell-Invasion (Higashino et al., 1995; Kaya et al., 1996; Hiroumi et al., 2001). *E1A-F* ist besonders interessant, da die Expression in dieser Arbeit weitgehend tumorspezifisch war und Transkripte in den meisten Normalgeweben nicht nachgewiesen werden konnten. Darüberhinaus wurde beim paarweisen Vergleich von Tumor- und Normalgewebe festgestellt, daß der Transkriptionsfaktor in 80 % der Tumoren deutlich überexprimiert war und demnach zu den „allgemein“ differentiell exprimierten Genen gehört. Beide Befunde weisen auf eine besonderer Bedeutung von *E1A-F* in kolorektalen Karzinomen hin. Die Ursache der erhöhten Transkription von *E1A-F* beruht möglicherweise auf einer Induktion des Gens durch HGF (*hepatocyte growth factor*; Hanzawa et al., 2000). HGF ist ein Wachstumsfaktor, der bekanntermaßen in kolorektalen Karzinomen überexprimiert ist (Wielenga et al., 2000) und dessen Rezeptor (MET) in dieser Arbeit ebenfalls eine deutlich erhöhte Expression in den neoplastischen Geweben aufwies.

Der Transkriptionsfaktor AP-4 ist ein *helix-loop-helix* Protein, dessen Gen in der untersuchten normalen Darmschleimhaut gering transkribiert war und deswegen im Tumorgewebe trotz relativ schwacher Transkriptionsrate eine deutliche Überexpression zeigte. Möglicherweise aufgrund der geringen Transkription gibt es in der Literatur keine direkten Hinweise auf eine Beteiligung von AP-4 bei der Entstehung maligner Erkrankungen. Allerdings ist eine Bindestelle für AP-4 im Promotor von *IGFBP2 (insulin-like growth factor binding protein 2)* bekannt (Badinga et al., 1998), das bei vielen malignen Erkrankungen überexprimiert wird (Hoeflich et al., 2001).

*FRA-1* wurde kürzlich als Zielgen des  $\beta$ -catenin-Tcf / Lef (*T cell-factor / lymphoid-enhancer-factor*)-Komplexes identifiziert (Mann et al., 1999), einem Transkriptionsfaktor, der als Folge eines aktivierten WNT-Signaltransduktionsweges die Transkription vieler progressions-

relevanter Gene stimuliert. Die Überexpression von *FRA-1* könnte durch die Tatsache erklärt werden, daß der WNT-Signaltransduktionsweg in den meisten kolorektalen Tumoren durch Mutationen im *APC*-Gen betroffen ist und dadurch eine konstitutive Aktivierung aufweist.

Eine Bedeutung für die Transkription besitzt auch das HMGI (*high mobility group protein I*), ein Mitglied der HMG Nicht-Histon-Chromatinprotein Familie, das spezifisch mit einer Reihe von Transkriptionsfaktoren interagiert und deren Bindung an induzierbare Gene stimuliert. HMGI wurde bereits bei einer Vielzahl verschiedener Tumoren als Tumormarker beschrieben und ist auch bei kolorektalen Karzinomen als potentieller diagnostischer Marker bekannt (Abe et al., 1999).

Es wurde weiterhin beobachtet, daß die Gene mehrerer Zellzyklus-Proteine in den neoplastischen Geweben abnormal exprimiert waren, was auf eine Dysregulation des Zellzyklus in den malignen Zellen hindeutet. Unter den Genen, die in den Tumorgeweben überexprimiert waren, befanden sich die Gene für die Serin-Threonin-Proteinkinasen PLK1 (*polo-like kinase*) und WEE1, Cyclin A, PA2G4 (*proliferation-associated 2G4, 38kD, ein p38-2G4 homolog*), CDC25B (*cell division cycle 25B*), sowie CKS1 und CKS2 (*cyclin-dependent kinase regulatory subunit 1 und 2*). CDKN2B (*cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B*) war in vielen Tumoren geringer exprimiert als im Normalgewebe.

PLK 1 und Cyclin A sind bekanntermaßen in kolorektalen Tumoren überexprimiert (Macmillan et al., 2001; Handa et al., 1999). PLK1 ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase, die in verschiedenen Stadien der Mitose aktiv ist und u.a. an der Aktivierung von Zellzyklus-Kinasen und der Bildung des Spindelapparates beteiligt ist (Smits et al., 2000). Eine Überexpression des Gens besitzt bei mehreren soliden Tumorerkrankungen prognostische Relevanz (Tokumitsu et al., 1999; Knecht et al., 1999). Cyclin A, das für eine gesteigerte katalytische Aktivität der CDK2 in der S- und G2-Phase verantwortlich ist, wurde auch bei kolorektalen Karzinomen mit einer ungünstigen Prognose assoziiert.

PA2G4 ist identisch mit dem ERBB3-bindenden Protein EBP1 und wird auch als Mitglied im ERBB3-regulierten Signaltransduktionsweg diskutiert (Yoo et al., 2000). Die Expression von *PA2G4* wurde bisher nicht in menschlichen Geweben untersucht. Im Zusammenhang mit der kolorektalen Karzinogenese wurde das *PA2G4*-Gen allerdings kürzlich bei MSI-Tumoren unter den häufigsten bis dato nicht beschriebenen mutierten Regionen identifiziert (Mori et al., 2001). Experimente mit Zelllinien ergaben Hinweise auf eine antiproliferative Wirkung des Proteins durch Assoziation mit dem Produkt des Retinoblastom-Gens *RB* (Xia et al.,

2001). Der regulatorische Signaltransduktionsweg, der diese Wechselwirkung kontrolliert, ist aber bisher nicht aufgeklärt.

Das Gen von *WEE1*, einem Protein mit antiproliferativer Wirkung, zeigte sich in den Tumorgeweben ebenfalls überexprimiert. Eine verstärkte Expression von *WEE1* in der G1- und der S-Phase wurde kürzlich durch Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 im Promoter von *WEE1* erklärt und soll wahrscheinlich einen vorzeitigen Eintritt in die Mitose verhindern (Kawasaki et al., 2001). Ob diese Funktion im Tumorgewebe vorhanden ist, scheint allerdings aus mehreren Gründen fraglich. Einerseits wird die inhibitorische Phosphorylierung, die *WEE1* am Tyrosin 15 der CDK1 (*cyclin dependent kinase 1*) vornimmt, anscheinend durch das Protein *CABLES* (*CDK5 and ABL enzyme substrate*) vermittelt, welches in den meisten kolorektalen Karzinomen aufgrund eines LOH am Chromosom 18 q nicht vorhanden ist (Wu et al., 2001). Andererseits ist die Phosphatase *CDC25B*, die als Gegenspieler von *WEE1* CDK1 durch Dephosphorylierung wieder aktiviert, ebenfalls in den meisten untersuchten Tumorgeweben überexprimiert (Tab. 2). Eine abnormal hohe Expression von *CDC25B* in Tumorgeweben wurde kürzlich auch als Marker für eine signifikant schlechtere Prognose bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen beschrieben (Takemasa et al., 2000).

Bisher relativ unerforscht bei der Progression maligner Tumoren sind die CDK-regulatorischen Untereinheiten *CKS1* und *CKS2*. Über die Funktion von *CKS2* in humanen Geweben gibt es bisher keine Informationen. *CKS1* ist u. a. durch seine Funktion bei der Ubiquitinylierung von *P27*, einem CDK-Inhibitor, am Übertritt der Zellen in die S-Phase beteiligt (Ganoth et al., 2001; Spruck et al., 2001) und wird auf Transkriptionsebene durch TGF $\beta$  reprimiert (Simon et al., 1995). Die gesteigerte Expression von *CKS1*, die in dieser Arbeit in den neoplastischen Geweben gefunden wurde, kann möglicherweise durch die Tatsache erklärt werden, daß der reguläre TGF $\beta$ -Signaltransduktionsweg in vielen kolorektalen Karzinomen inaktiviert ist (Grady et al., 1999). In diesen Zusammenhang paßt auch die verminderte Expression von *CDKN2B*. Die Transkription dieses Gens wird normalerweise durch TGF $\beta$  aktiviert und ist an der Hemmung von Cyclin-abhängigen Kinasen beim TGF $\beta$ -vermittelten Zellzyklus-Arrest beteiligt (Hannon et al., 1994). Neuerdings wird auch eine direkte Interaktion von *MYC* mit den Komponenten des TGF $\beta$ -Signaltransduktionsweges *SMAD2* und *3* bei der Inhibition der Transkription von *CDKN2B* vermutet (Feng et al., 2002).

Ein weiteres Gen, das in den untersuchten Tumoren eine deutlich höhere Expression zeigte als in den Normalgeweben, ist *BIGH3*. Dieses Gen wurde 1992 aus einer humanen Lungen-



Adenokarzinom-Zelllinie nach Behandlung mit TGFB isoliert (Skonier, et al., 1994) und wird daher auch als *TGFBI* (*transforming growth factor, beta-induced, 68kD*) bezeichnet. Eine klinische Bedeutung besitzt *BIGH3* bisher vor allem bei mehreren Formen von vererbter Hornhautdystrophie. Bei betroffenen Personen ist *BIGH3* mutiert, das Gen-Produkt Kerato-Epithelin verursacht deshalb Ablagerungen in der Hornhaut, die zur Erblindung führen können (Munier et al., 1997). Mittlerweile ist bekannt, daß Kerato-Epithelin vor allem in der extrazellulären Matrix lokalisiert ist und ein Motiv besitzt, das als Ligand für die Bindung an mehrere Integrine Zell-Adhäsion vermitteln kann. Denkbar ist daher, daß *BIGH3* über die Integrin-Bindung auch an der Migration von Tumorzellen beteiligt ist.

*MIC1* (*macrophage inhibitory cytokine 1*; alternativ *PLAB placental BMP*) ist ein Mitglied der TGFB-Superfamilie, das normalerweise vor allem in der Plazenta stark exprimiert wird und auch im Serum schwangerer Frauen nachweisbar ist. Da *MIC1* die Proliferation von Granulozyten und Makrophagen inhibieren kann (Hromas et al., 1997), wird vermutet, daß *MIC1* das Wachstum eines Feten unterstützt, indem es die Produktion proinflammatorischer Zytokine im maternalen Gewebe unterdrückt (Moore et al., 2000). Eine Aufgabe von *MIC1* bei der Progression von Tumoren könnte demnach darin bestehen, körpereigene Immunzellen zu reprimieren und die Tumorzellen dadurch vor einem Angriff des Immunsystems zu schützen.

Eine deutlich erhöhte Expression von *BIGH3* und *MIC1* wurde kürzlich auch mittels SAGE-Analyse in kolorektalen Karzinomen und Adenomen festgestellt (Buckhaults et al., 2001). Im Hinblick auf eine potentielle klinische Anwendung, z.B. für serologische Tests zur Früherkennung einer kolorektalen Tumorerkrankung, wurde die Expression der beiden Gene in den Tumorgeweben näher charakterisiert. Dabei wurde nachgewiesen, daß die Transkripte von *BIGH3* und *MIC1* sowohl aus den Tumorzellen als auch aus den mesenchymalen Zellen des lokalen Tumorstromas stammen. Sollten die Produkte der genannten Gene tatsächlich eine Bedeutung bei der Tumorprogression besitzen, ist der Befund ein weiteres Beispiel für die aktive Beteiligung des nicht-neoplastischen Stromas an der Progression von Tumoren.

Unter den Genen, die in dieser Arbeit eine deutlich verminderte Expression in mehreren kolorektalen Karzinomen zeigten, befand sich das Gen für das *BENE*-Protein. *BENE* zeigte auch bei Notterman, Kitahara und Takemasa (siehe Tab. 7) eine reduzierte Transkription in den untersuchten Tumoren. Da Kitahara relativ reine Tumorzell-Populationen im Vergleich zu normalen Epithelzellen untersuchte (Laser-Mikrodissektion), stammen die detektierten Expressionsdifferenzen (zumindest anteilig oder sogar vollständig) aus den malignen

epithelialen Zellen. Bisher wurde BENE nur in einer Arbeit näher charakterisiert. De Marco untersuchte die Lokalisation des Proteins in einer endothelialen Zelllinie und fand eine Akkumulation des BENE-Proteins in GEM (*glycolipid- and cholesterol-enriched membrane*)-„Rafts“ (de Marco et al., 2001). Aufgrund der Tatsache, daß „Rafts“ seit einigen Jahren als Anker- und Transportvesikel für Proteine diskutiert werden und vermutlich auch im Hinblick auf die intrazelluläre Signaltransduktion von Bedeutung sind (Simons and Ikonen, 1997), könnte BENE ein interessantes Molekül für weitere Untersuchungen darstellen.

Eine sehr deutliche Reduktion der Transkriptionsrate zeigte auch *UGT2B15* (*microsomal UDP-glucuronosyltransferase 2B15*). Während das Gen in den meisten Normalgeweben eine sehr hohe Expression aufwies, war es in den Tumoren und Metastasen kaum bzw. gar nicht nachweisbar. Die UGT2B15 gehört zu einer Familie von Enzymen, die eine Kopplung von Glucuronsäure an zahlreiche endogene und xenobiotische Substanzen katalysieren und dadurch deren Inaktivierung, Detoxifizierung und Ausscheidung ermöglichen. Da die Enzyme auch für die Glucuronisierung von Steroidhormonen und karzinogenen Komponenten verantwortlich sind (Green et al., 1994; Strassburg et al., 1999), ist eine Beteiligung an der Tumorgenese durchaus vorstellbar und sollte weiter untersucht werden.

### **Differentiell exprimierte Gene zwischen der *low stage*- und der *high stage*-Tumorgruppe**

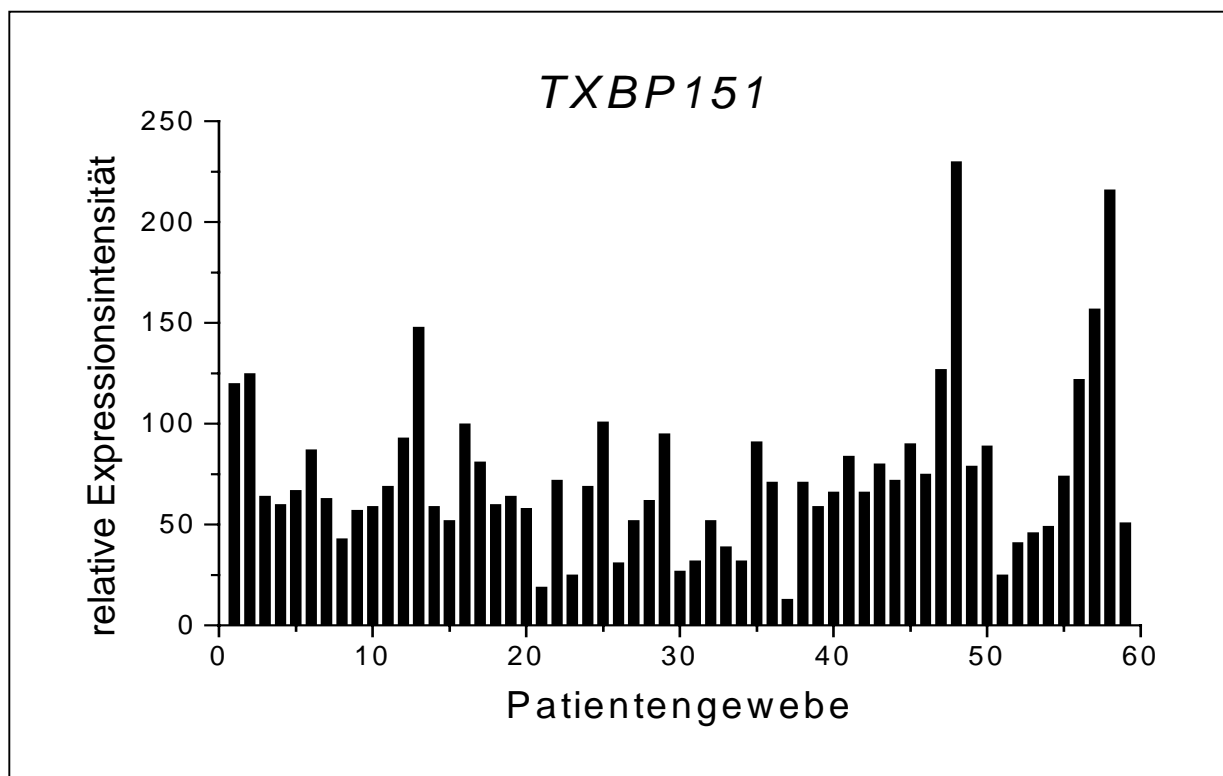
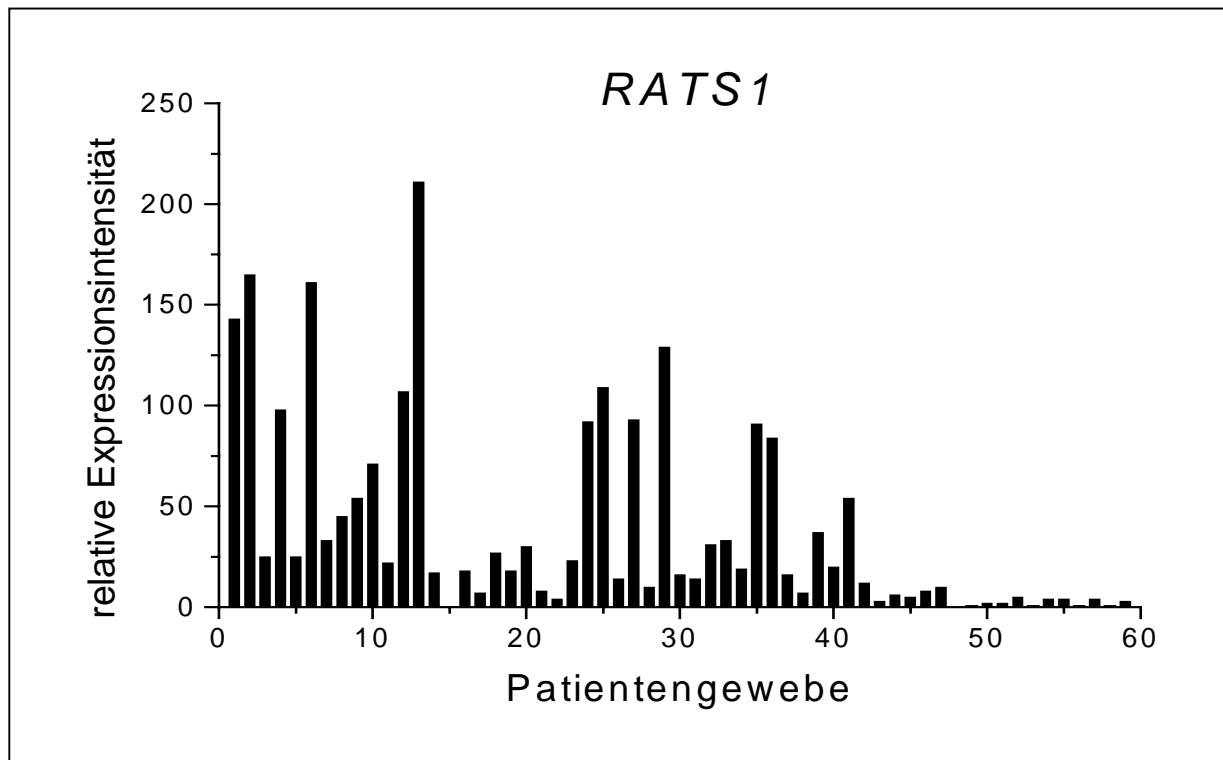
Bei der Untersuchung von unterschiedlich weit fortgeschrittenen Tumoren und Metastasen wurden nur geringe Unterschiede in der Genexpression festgestellt. Eine statistische Auswertung ergab, daß die meisten Gene entweder nur mäßig differentiell exprimiert waren oder keine hohe Signifikanz im Hinblick auf eine differentielle Expression besaßen. Unterschiede in den Expressionsmustern, die sich durch die Bildung der Subgruppen bei der Clusteranalyse andeuten, sind demnach offensichtlich eher subtil bzw. uneinheitlich. Auch bei den Genen, die zwischen den Gruppen mit statistischer Signifikanz differentiell exprimiert waren, muß berücksichtigt werden, daß zumindest teilweise mathematische Kriterien für die Auswahl mitverantwortlich waren. Da Gruppen betrachtet wurden, handelt es sich bei den gefundenen Differenzen um gruppenspezifische Phänomene, die durch deutliche Expressionswerte weniger Gewebeproben beeinflusst werden können.

Weiterhin wurde beobachtet, daß sich für einige Gene Expressionsunterschiede zwischen der *low stage*- und *high stage*-Gruppe schon zwischen den entsprechenden Normalgeweben andeuten. Eine (im Median) mehr als dreifach erhöhte Expression zeigte sich in den korrespondierenden Normalgeweben der *high stage*-Gruppe, z.B. für *CDC37* (*cell division cycle 37 homolog*), *ELF4* (*E74-like factor 4; myeloid ELF1-like factor*), *RHOB* (*ras homolog*

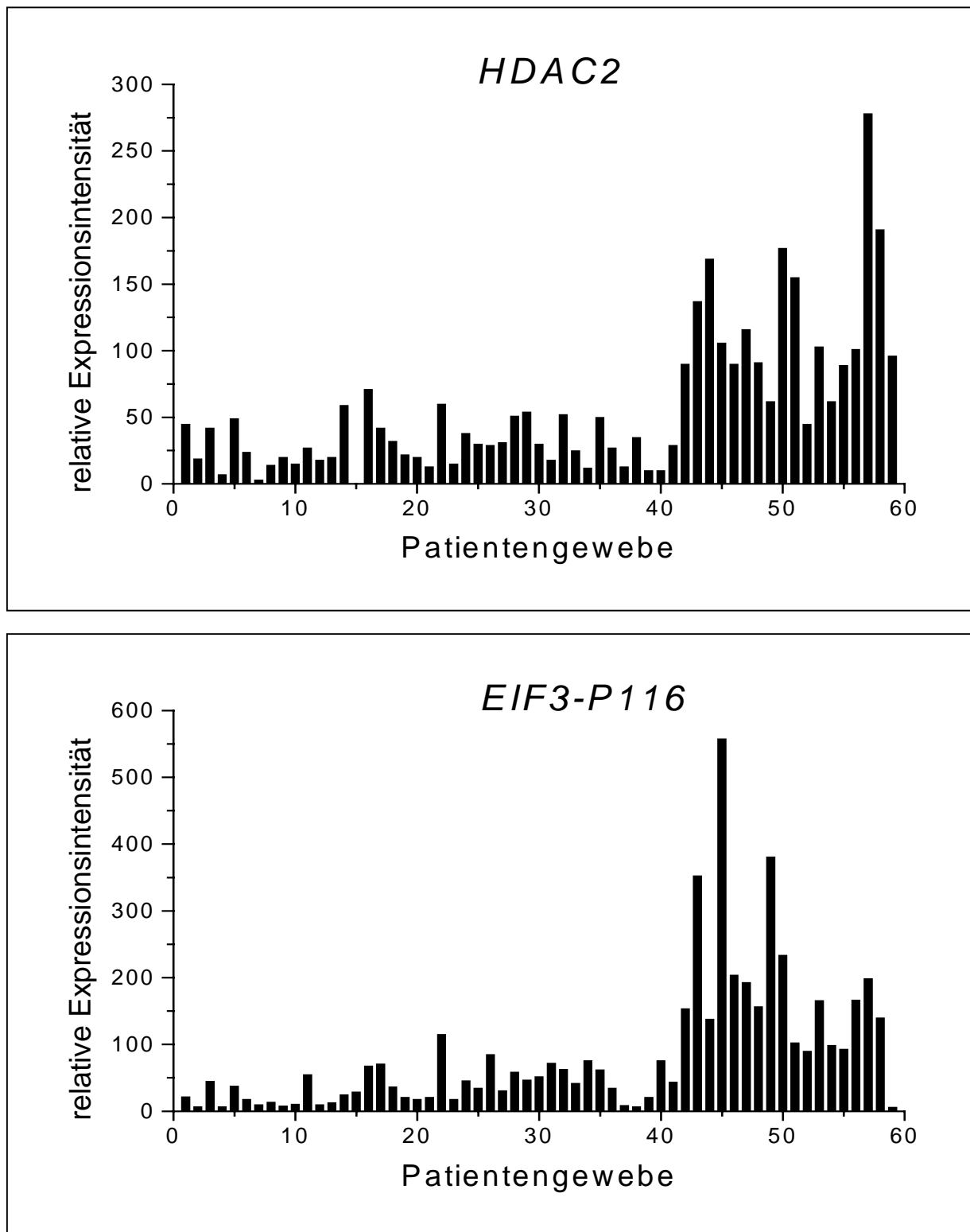
*gene family, member B*) und *BAP* (*B-cell receptor-associated protein*). Dagegen waren *DCK* (*deoxycytidine kinase*), *PDGFB* (*platelet-derived growth factor beta*), *RATS1* (Abb. 29) und *DSC3* (*desmocollin 3*) in den korrespondierenden Normalgeweben der *high stage*-Tumoren geringer exprimiert als in den korrespondierenden Normalgeweben der *low stage*-Tumoren. Daß es sich hierbei um ein methodisches Artefakt handelt, ist unwahrscheinlich, da dieser Trend nur bei wenigen Genen auftrat und beim Haushaltsgen *TXBP151* (*Tax 1 binding protein 151*) nicht beobachtet wurde (Verhältnis des Medians der zur *low stage*- und *high stage*-Gruppe korrespondierenden Normalgewebe ist genau 1; Abb. 29). Ob und inwieweit die Gene, die schon in der Normalschleimhaut zwischen Patienten differentiell exprimiert sind, als Tumorpromotoren zur malignen Progression beitragen können, ist ein interessantes Thema für weitere Arbeiten.

Zu den Genen, die in der *high stage*-Gruppe geringer exprimiert waren als in der *low stage*-Gruppe, aber schon in den Normalgeweben der *high stage*-Tumorpatienten eine verminderte Expression aufwiesen, gehört z.B. *RATS1*. Das Gen (Synonym *RA538*) wurde aus einer Ösophaguskarzinom-Zelllinie nach Retinsäurebehandlung isoliert. Es wurde bereits gezeigt, daß *RATS1* Differenzierung und Apoptose induzieren kann und die Expression von *MYC* reduziert (Chen et al., 2000). Da mit Ausnahme einer Arbeit die wenigen Informationen über *RATS1* in chinesischen Fachzeitschriften veröffentlicht wurden, ist das Gen bisher noch weitgehend unbekannt und dementsprechend interessant für weitere Untersuchungen.

Eine deutlich erhöhte Expression in den *high stage*-Tumoren gegenüber den *low stage*-Tumoren zeigten z.B. die Gene *HDAC2* (*histone deacetylase 2*) und *EIF3-P116* (*eukaryotic translation initiation factor 3 beta subunit*; Abb. 30). Die Histon Deacetylasen scheinen bei Vertebraten im Komplex mit *MeCP2* (*methyl-CpG binding protein 2*) bei der Methylierungs-abhängigen Repression von Genen beteiligt zu sein (Nan et al., 1998; Jones 1998). *MeCP2* bindet dabei selektiv an methylierte DNA-Sequenzen. Durch die folgende Deacetylierung wird entweder eine Kondensation des Chromatins verursacht oder durch die stärkere Assoziation deacetylierter Histone an die DNA eine Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert (Bestor, 1998). *EIF3-P116* gehört zum Translationsinitiationsfaktor 3, einem aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzten Proteinkomplex. Verschiedene Untereinheiten aus diesem Komplex sind bereits im Zusammenhang mit malignen Tumoren beschrieben worden. Während z.B. bei verschiedenen Arten von Lungenkrebs das Gen für die Untereinheit P170 überexprimiert ist (Pincheira et al., 2001), zeigt *P40* bei Brust- und Prostatakrebs eine Amplifikation und Überexpression (Nupponen et al., 1999).



**Abb. 29:** Übersicht über die Expression von *RATS1* und *TXBP151* in Normalgeweben und Tumoren bzw. Metastasen der *low stage*- und *high stage*-Gruppe, relativ zu einem Referenz-Array (siehe 3.12.3). 1 bis 15: Normalgewebe korrespondierend zu den Tumoren der *low stage*-Gruppe (14 und 15 gehören zu den metastasierten pT3-Tumoren von Patient 6 und 8); 16 bis 23: Normalgewebe korrespondierend zu den Tumoren der *high stage*-Gruppe; 24 bis 41: Tumoren bzw. Metastasen der *low stage*-Gruppe; 42 bis 59: Tumoren bzw. Metastasen der *high stage*-Gruppe.



**Abb. 30:** Übersicht über die Expression von *HDAC2* und *EIF3-P116* in Normalgeweben und Tumoren bzw. Metastasen der *low stage*- und *high stage*-Gruppe, relativ zu einem Referenz-Array (siehe 3.12.3). 1 bis 23: Normalgewebe; 24 bis 41: Tumoren bzw. Metastasen der *low stage*-Gruppe; 42 bis 59: Tumoren bzw. Metastasen der *high stage*-Gruppe.

Drei Gene zeigten sowohl zwischen Normal- und Tumorgeweben, als auch zwischen der *low stage*- und der *high stage*-Gruppe eine statistisch signifikant differentielle Expression. *EIF3-P116* und *WEE1* (siehe oben) waren in den Normalgeweben gering exprimiert und zeigten mit zunehmender Progression eine deutlich erhöhte Expression. *PDGFB* (siehe 5.1.3.4) dagegen war in den Normalgeweben hoch exprimiert, zeigte in den Tumoren der *low stage*-Gruppe eine geringere Expression und war in den Tumoren und Metastasen der *high stage*-Gruppe kaum mehr nachweisbar. Da eine kontinuierliche Zunahme oder Abnahme der Expression von Genen während der Tumorprogression auf einer klonalen Selektion von Tumorzellen beruhen kann, die durch die abnormale Genexpression einen Wachstumsvorteil gegenüber den benachbarten Zellen erlangen, sind *EIF3-P116*, *WEE1* und *PDGFB* interessante Gene und sollten durch weitere Untersuchungen näher charakterisiert werden.

#### **5.1.3.4 Paarweiser Vergleich von Primärtumoren und korrespondierenden Lebermetastasen**

Unter den Geweben, die in dieser Arbeit untersucht wurden, befanden sich sechs Primärtumoren und korrespondierende Lebermetastasen derselben Patienten. Da die einzelnen Gewebe-Paare eine sehr ähnliche Genexpression aufwiesen, konnten bei der Suche nach allgemeingültigen Expressionsdifferenzen nur zwölf Gene identifiziert werden, die in mehr als drei der sechs Metastasen gegenüber den entsprechenden Primärtumoren mindestens um den Faktor zwei differentiell exprimiert waren (Tab. 4).

Zu den Genen, die in den untersuchten Metastasen eine höhere Expression zeigten als in den entsprechenden Primärtumoren, gehört *DAP12* (*DNAX activation protein 12*), dessen Proteinprodukt bisher v.a. im Zusammenhang mit der Signaltransduktion in „natürlichen Killer Zellen“ (NK)-Zellen beschrieben wurde (Lanier et al., 1998). Dagegen sind FN (*fibronectin*) und VTN (*vitronectin*), die als Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) ebenso wie das in der ECM lokalisierte Glykoprotein SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine precursor*) an der Migration, Adhäsion und Signaltransduktion von Zellen beteiligt sind, bekanntermaßen in kolorektalen Tumoren überexprimiert (Inufusa et al., 1995; Tomasini-Johansson et al., 1994; Porte et al., 1995). Auch VEGF (*vascular endothelial growth factor precursor*), ein wichtiger Regulator der Tumorangio-genese, und MMP9 (*matrix metalloproteinase 9*) wurden bereits im Zusammenhang mit der kolorektalen Tumorprogression beschrieben (Lee et al., 2000; Roeb et al., 2001).

Bisher nicht mit kolorektalen Tumoren assoziiert wurden CPBP (*core promoter element binding protein*) und TIS11B (*tetradecanoyl phorbol acetate [TPA]-inducible sequence 11*). Es wurde allerdings festgestellt, daß eine erhöhte Expression von CPBP nur in Metastasen

von Patienten auftrat, bei denen die Expression des Gens im Primärtumor gegenüber dem Normalgewebe vermindert war. *TIS11B* ist im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen bisher nur als prognostisch ungünstiger Faktor bestimmter Leukämieformen beschrieben (Shimada et al., 2000). Bei kolorektalen Tumorzellen wurde festgestellt, daß die Transkription des Gens durch die Fettsäure Butyrat reprimiert wird (Maclean et al., 1998). Butyrat ist ein Fermentationsprodukt der Darmbakterien und wird von kolorektalen Epithelzellen aufgenommen und verstoffwechselt. Die erhöhte Transkription von *TISB11* in den Lebermetastasen könnte demnach auf einer geringeren Butyrat-Konzentration in der Leber beruhen.

Unter den Genen, die in den Metastasen der Patienten eine geringere Expression zeigten als in den Primärtumoren, befinden sich die Gene für die Rezeptor-Tyrosinkinase *TIE1* (*tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF factor homology*) und *PDGFB* (*platelet-derived growth factor B subunit precursor*), einer Untereinheit des Rezeptor-Tyrosinkinase-Liganden *PDGF* (*platelet-derived growth factor*). Eine Überexpression von *TIE1* ist z.B. für Magen- und Mammakarzinome beschrieben (Lin et al., 1999; Tseng et al., 2001). Im Gegensatz dazu wurde bei kolorektalen Karzinomen und Metastasen eine reduzierte Transkription des Gens beobachtet (Chen et al., 1999). In dieser Arbeit war die Expression von *TIE1* nur in Metastasen erniedrigt, deren korrespondierende Primärtumoren eine Überexpression gegenüber dem Normalgewebe zeigten. Die Expression von *PDGFB* dagegen war im Normalgewebe hoch, zeigte dann eine kontinuierliche Abnahme zwischen der *low stage*- und *high stage*-Gruppe, und wurde nur noch geringfügig in den Metastasen nachgewiesen. Diese Tatsache steht in einem gewissen Widerspruch zu dem Befund, daß *PDGFB* offenbar eine mitogene Wirkung auf *PDGF*-Rezeptor-tragende mesenchymale Zellen ausübt und im Zusammenhang mit Angiogenese bzw. Proliferation von Tumorstroma diskutiert wird (Mendelsohn et al., 2001). Demnach wäre eine erhöhte Expression des Gens in neoplastischen Geweben zu erwarten. Die Bedeutung von *PDGFB* in kolorektalen Karzinomen sollte daher weiter abgeklärt werden, entsprechende Untersuchungen sind bisher nicht bekannt.

Ein weiteres Gen mit verminderter Expression in den Metastasen ist das Gen für *DCK* (*deoxycytidine kinase*), einem Enzym, das an der Herstellung von Desoxynukleosidphosphaten beteiligt ist. *DCK* ist essentiell für die Aktivierung bestimmter Nukleosid-analoger Chemotherapeutika, die v.a. bei malignen hämatologischen Erkrankungen eingesetzt werden (Ruiz van Haperen et al., 1994 [1]; Kakihara et al., 1998). Dementsprechend wird eine Inaktivierung des Enzyms als möglicher Resistenzmechanismus

gegenüber den entsprechenden Medikamenten diskutiert (Veuger et al., 2000; Ruiz van Haperen et al., 1994 [2]). In dieser Arbeit zeigte *DCK* auch in mehreren Primärtumoren eine reduzierte Expression gegenüber den entsprechenden Normalgeweben (Tab. 2).

*NGAL* (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) ist ein 25 kDa Protein, das ursprünglich aus neutrophilen Granulozyten isoliert wurde, immunhistochemisch aber mittlerweile auch in epithelialen Zellen verschiedener normaler und neoplastischer Gewebe nachgewiesen wurde (Stoesz et al., 1998; Friedl et al., 1999). Die Funktion des Proteins ist nicht vollständig geklärt, allerdings ist bekannt, daß *NGAL* an die Metalloproteinase *MMP9* (s.o.) bindet und diese vermutlich stabilisieren kann (Yan et al., 2001). Über diese Funktion könnte *NGAL* eine Funktion bei der Tumorprogression besitzen, da die *MMP9* an der Tumorinvasion, der Angiogenese und der Aktivierung von *TGF $\beta$*  beteiligt ist (Yu and Stamenkovic, 2000). *NGAL* war in fünf der sechs Primärtumoren gegenüber dem Normalgewebe deutlich überexprimiert, zeigte allerdings in drei der sechs untersuchten Metastasen gegenüber dem Primärtumor eine stark verminderte Expression. Ein ähnliches Expressionsmuster von *NGAL* wurde auch von Nielsen beschrieben, der in Lymphknotenmetastasen *NGAL*-positiver kolorektaler Karzinome keine Expression dieses Gens nachweisen konnte (Nielsen et al., 1996).

Bei der Auswertung wurde daher für drei verschiedene Gene, *CPBP*, *TIE* und *NGAL*, beobachtet, daß Expressionsveränderungen, die sich im Tumor gegenüber dem Normalgewebe zeigten, in den korrespondierenden Metastasen nicht vorhanden waren. Dieser Befund beruht vermutlich darauf, daß innerhalb eines Tumors stets eine gewisse Heterogenität der Tumorzellen besteht und nicht alle Tumorzellen identische Expressionsmuster aufweisen. Die Absiedelung einzelner neoplastischer Zellen ohne die entsprechende Transkription führt dazu, daß tumortypische Expressionseigenschaften in den Metastasen nicht nachgewiesen werden können. Alternativ ist auch denkbar, daß die metastasierenden Tumorzellen den Primärtumor verlassen haben, bevor sich Tumorzell-Klone mit einer veränderten Genexpression im Primärtumor durchsetzten. Weiterhin wäre möglich, daß die Expressionsunterschiede auf Differenzen in der Mikroumwelt der verschiedenen neoplastischen Gewebe beruhen, die Einfluß auf die Transkription der genannten Gene nehmen.

Insgesamt muß allerdings festgestellt werden, daß die oben beschriebenen Gene nicht spezifisch für metastasierende Tumorzellen sind. Einerseits basieren mehrere der beobachteten Expressionsdifferenzen vermutlich auf einer veränderten Genexpression im



Tumorstroma (z.B. *DAP12*, *FN* und *VTN*). Andererseits sind die meisten Gene, die in Metastasen eine abnormale Expression zeigen, schon während der Progression von Primärtumoren auffällig exprimiert (z.B. *FN*, *SPARC*, *TIE1*, *PDGFB*, *DCK* und *NGAL*). Trotzdem verweisen die Gene auf genetische Eigenschaften von Lebermetastasen kolorektaler Karzinome und sollten daher grundsätzlich auf eine kausale Bedeutung bei der Metastasierung überprüft werden.

### **Vergleich eigener Expressionsdaten zur Metastasierung mit Ergebnissen anderer Arbeiten**

Auch mehrere andere Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren mit der Identifizierung von metastasierungsrelevanten Genen bei kolorektalen Karzinomen mittels cDNA Array-Technik begonnen. Bei vier in Tabelle 7 genannten Arbeiten wurden dabei Zelllinien mit unterschiedlichem Potential zur Bildung von Metastasen verwendet (Hernandez et al., 2000; Otsuka et al., 2001; De Lange et al., 2001; Hegde et al., 2001). Der Hintergrund dieses experimentellen Ansatzes beruht auf der Annahme, daß Zelllinien mit geringem Potential zur Metastasierung und deren stark metastasierende Varianten bzw. Zelllinien aus Primärtumor und Metastase desselben Patienten aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaft eine ähnliche Expression der meisten Gene zeigen und sich vor allem in metastasierungsrelevanten Genen unterscheiden. Während Hernandez und Otsuka nur wenige deutliche Genexpressionsunterschiede fanden, veröffentlichten De Lange und Hegde jeweils Listen mit vielen abnormal exprimierten Genen. Bei Zellkultur-Modellen ist allerdings eine weitere Überprüfung dieser Gene notwendig, um auszuschließen, daß eine differentielle Genexpression durch verschiedene experimentelle Techniken und Selektionskriterien bei der Etablierung der Zelllinien sowie durch die herrschenden Kulturbedingungen bedingt ist.

Expressionsanalysen an Patientenmaterial wurden von Yanagawa und Hernandez durchgeführt (Hernandez et al., 2000; Yanagawa et al., 2001; siehe auch Tab. 7). Während Yanagawa die Genexpression von Lebermetastasen im Vergleich zum korrespondierenden kolorektalen Primärtumor bei zehn Patienten untersuchte, beschränkte sich Hernandez auf einen Fall, allerdings zusätzlich im Vergleich zur normalen Darmschleimhaut. In letztgenannter Studie konnten keine Gene identifiziert werden, die zwischen Primärtumor und Lebermetastase differentiell exprimiert waren. Yanagawa dagegen berichtet von 40 bzw. sieben der insgesamt 9121 untersuchten Gene (0,5 %), die in mehr als 50 % der Lebermetastasen im Vergleich zum entsprechenden Primärtumor überexprimiert bzw. unterrepräsentiert waren.

Der Befund, daß mittels Array-Technik in diesen Arbeiten sowie bei den eigenen Expressionsanalysen nur wenige Expressionsunterschiede zwischen Tumoren und korrespondierenden Metastasen identifiziert werden konnten, korreliert auch mit Daten einer kürzlich veröffentlichten Arbeit zur differentiellen Genexpression zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Kolonkarzinomzellen mittels SAGE-Analyse (Saha et al., 2001). Nach dem Vergleich von über 20.000 verschiedenen Gentranskripten wurde nur ein Gen mit homogener Überexpression in den metastasierten Zellen identifiziert. Ob das entsprechende Protein, die Tyrosinphosphatase PRL3 tatsächlich eine kausale Bedeutung beim Metastasierungsprozeß hat, ist allerdings noch nicht bekannt.

Es ist allerdings vorstellbar, daß in dieser Arbeit keine deutlichen Expressionsdifferenzen zwischen Primärtumoren und Metastasen bestanden, weil in den fortgeschrittenen Tumoren möglicherweise schon große Anteile metastasierungsfähiger Tumorzellpopulationen enthalten waren. Aus diesem Grund wurde mittels statistischer Auswertung auch nach differentiell exprimierten Genen zwischen metastasierten und nicht metastasierten Primärtumoren gesucht, wobei allerdings keine deutlichen Kandidatengene identifiziert werden konnten. Denkbar bleibt aber trotzdem, daß neben bestimmten Grundvoraussetzungen zur Metastasierung, die bereits während der Tumorgenese erworben werden, Zellen verschiedener Tumoren durch einzelne, eher individuelle biologische Eigenschaften, zur Metastasierung befähigt werden. Gruppenspezifische, statistische Auswertungen erfassen solche Veränderungen nicht. Außerdem konnte mit den Arrays nur eine Auswahl an Genen untersucht werden, so daß nicht alle potentiell metastasierungsrelevanten Gene berücksichtigt werden konnten.

#### **5.1.4 Bestätigung der differentiellen Genexpression mittels *real-time* PCR**

Da die Array-Hybridisierungen vor allem eine „Screening“-Analyse zur Identifizierung auffällig exprimierter Gene darstellen, muß die Expression zumindest einzelner Gene repräsentativ mit einer unabhängigen Methode überprüft werden. Eine für diese Anwendung weitaus elegantere Möglichkeit als der Northern Blot bietet die quantitative RT-PCR am LightCycler (siehe 3.6.5). Das Prinzip der relativen Quantifizierung der Genexpression zwischen Normal- und Tumorgewebe beruht darauf, in beiden Gewebetypen mit Hilfe von PCR-Amplifikationen die Expression interessanter Gene (Zielgene) relativ zu einem stabil exprimierten Gen (Haushaltsgen) zu bestimmen. Eine differentielle Genexpression liegt vor,

wenn das Verhältnis der Expression von Zielgenen und Haushaltsgenen im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe verändert ist. Spezielle Software, die für den LightCycler erhältlich ist (Relative Quantification Software), ermöglicht auch die exakte Quantifizierung der Expression von Genen, bei denen die PCR-Reaktionen verschiedene Amplifizierungseffizienzen besitzen.

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Haushaltsgene auf ihre Eignung als Referenzgen überprüft (4.1.3.2). Das *TXBP151* (*Tax 1 binding protein 151*) und die *HD1* (*histone deacetylase 1*) kamen in Betracht, weil sie offensichtlich in vielen adulten Geweben stabil exprimiert werden (Warrington et al., 2000). Die *PBGD* (*Porphobilinogendeaminase*) ist ein bekanntes Haushaltsgen, und die PCR für *B2M* (*beta-2-microglobulin*) war bereits im Labor etabliert. *TXBP151* wurde schließlich als Referenzgen für die Quantifizierungsanalysen am LightCycler ausgewählt, weil die Expression des Gens zwischen den untersuchten Tumor- und Normalgeweben am wenigsten variierte (siehe auch Abb. 29, B). Konventionelle Haushaltsgene wie z.B. *ACTB* (*actin, beta*) und *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) kamen als Referenzgene nicht in Betracht, da sie in dieser und anderen Arbeiten zwischen normalem und neoplastischem Gewebe differentiell exprimiert waren (z.B. Eickhoff et al., 1999; Kitahara et al., 2001).

Als Zielgene für die Verifizierung einer differentiellen Expression wurden *MIC1*, *CKS2*, *BIGH3*, *MYC*, *UGT2B15*, *NGAL* und *IFITM1* ausgewählt (4.1.3.1). Die Entscheidung für diese Gene basierte auf mehreren Überlegungen. Zunächst sollten Exon- und Intron-Sequenzen in den Genen bekannt sein, damit Primer gezielt über Exon-Exon-Grenzen gelegt werden konnten. Diese Maßnahme diente dazu, die Amplifizierung von genomischen Sequenzen zu vermeiden und eine höhere Spezifität der entsprechenden PCR zu erreichen. Angaben zur Lage von Introns und Exons in Genen wurden dabei v.a. in der Datenbank des *Human Genome Working Draft* der *UCSC* (*University of California, Santa Cruz*; <http://genome.ucsc.edu>) gefunden, während sich die Genbank des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oft als nicht informativ erwies.

Weiterhin wurde bei der Auswahl der Gene darauf geachtet, daß neben bekannten Onkogenen wie *MYC* im Hinblick auf weitere Untersuchungen auch die Expression von Genen analysiert wurde, deren genaue Funktion nicht geklärt ist, bzw. die bisher nicht näher bei kolorektalen Karzinomen untersucht wurden.

In der LightCycler-Analyse zeigte sich eine hohe Spezifität bei der Amplifizierung der Transkripte von Haushaltsgen und Zielgenen (Abb. 13). Neben den sorgfältig ausgewählten Primersequenzen wurde dies auch durch eine *hot start*-PCR unterstützt. Aufgrund der hohen

Spezifität konnten alle PCR-Reaktionen für die Quantifizierung der Genexpression verwendet werden.

Bei den durchgeführten Arbeiten wurde die Expression der genannten Gene im Normal- und Tumorgewebe von insgesamt sieben verschiedenen Patienten untersucht (Tab. 3). Bei vier Patienten erfolgte daraufhin ein Vergleich zu entsprechenden Ergebnissen aus Array-Experimenten. Dabei wurde festgestellt, daß die Tendenz und meistens auch die Größenordnung der differentiellen Expression mit dem LightCycler verifiziert werden konnte. Die Gewebe der anderen Patienten, von denen keine Expressionsdaten bekannt waren, wurden verwendet, um die allgemeine Gültigkeit der Expressionsdifferenzen zu untersuchen. Auch in diesen Geweben wurde eine differentielle Expression der untersuchten Gene festgestellt, wodurch die Ergebnisse der Array-Versuche zusätzlich abgesichert wurden.

### 5.1.5 Vergleich der eigenen Expressionsdaten mit Array-Analysen anderer Arbeitsgruppen

Eine Meta-Analyse der bisher veröffentlichten Genexpressionsanalysen ist ohne spezielle Software-Programme nicht durchführbar, da in den verschiedenen Arbeiten unterschiedliche Arrays benutzt wurden und die untersuchten Gene häufig unter verschiedenen Namen und *Accession*-Nummern aufgeführt sind. Es wurde allerdings überprüft, ob Gene, die in dieser Arbeit eine deutliche differentielle Expression zeigten (Tab. 2 und 5, Normal- versus Tumorgewebe; Tab. 4, Primärtumoren versus Metastasen; Tab. 6, *low stage*- versus *high stage*-Gruppe) auch in den Originalveröffentlichungen anderer Arbeiten (Tab. 7) als auffällig differentiell exprimiert beschrieben sind. Diese Gene wurden in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Notterman et al., 2001:	<i>CDC25B</i> ↑, <i>CKS2</i> ↑, <i>UGT2B15</i> ↓, <i>BENE</i> ↓
Kitahara et al., 2001:	<i>CDC25B</i> ↑, <i>EIF3-P116</i> ↑, <i>HMG1</i> ↑, <i>IFITM1</i> ↑, <i>BIGH3</i> ↑, <i>BENE</i> ↓
Takemasa et al., 2001:	<i>VEGF</i> ↑, <i>SPARC</i> ↑, <i>BENE</i> ↓
Tsunoda et al., 2001:	<i>Cyclin A</i> ↑, <i>SPARC</i> ↑, <i>BIGH3</i> ↑, <i>FN</i> ↑, <i>MMP11</i> ↑, <i>VEGF</i> ↑, <i>MYC</i> ↑, <i>RHOB</i> ↑, <i>RATS</i> ↓

**Tab. 8:** Gene, die sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Array-Expressionsanalysen (Tab. 7) bei kolorektalen Karzinomen Expressionsveränderungen zeigten (↑: überexprimierte Gene; ↓: unterrepräsentierte Gene). *RHOB* war in dieser Arbeit in der *high stage*-Gruppe höher exprimiert als in der *low stage*-Gruppe, *VEGF* zeigte beim Vergleich der Primärtumoren versus Metastasen eine erhöhte Expression in den Metastasen. Alle übrigen Gene stammen aus dem Vergleich von Normal- und Tumorgewebe.

Insgesamt kann festgestellt werden, daß zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen ein hohe Varianz unter den jeweils genannten differentiell exprimierten Genen bestand. Die unterschiedlichen Ergebnisse beruhen dabei zum Teil auf der verschiedenen Auswahl an Genen, die in den Array-Hybridisierungen untersucht wurden, zum Teil vermutlich aber auch auf der experimentellen Durchführung, wie z.B. der unterschiedlichen Probenvorbereitung (Dissektion der Patientengewebe).

Gene, die von verschiedenen Arbeitsgruppen in kolorektalen Karzinomen und Lebermetastasen als differentiell exprimiert identifiziert wurden, deuten auf allgemeingültige, stabile Expressionsdifferenzen in diesen Tumorgeweben hin und sind besonders interessant für weitere Untersuchungen.

## **5.2 Methode zur simultanen Isolierung von RNA und DNA aus einzelnen / wenigen Zellen für multiple molekulare Analysen**

Zur Zeit übliche Methoden und kommerziell erhältliche Kits für die Isolierung von DNA bzw. RNA konzentrieren sich in der Regel auf die Extraktion einer der beiden Nukleinsäuren.

Für bestimmte Fragestellungen bzw. wenn nur begrenztes Untersuchungsmaterial zur Verfügung steht, ist allerdings eine simultane Isolierung von RNA und DNA aus denselben Proben vorteilhaft. Die beschriebenen Methoden, einschließlich dem Reagenz TRIZOL (Life Technologies), sind üblicherweise Modifikationen einer Phenol / Chloroform-Extraktion (Chomczynski and Sacchi, 1987), die sich nur zum Teil für die Analyse kleinerer Gewebeprobe und geringer Zellzahlen eignen (z.B. Chou et al., 1996; Döbbling et al., 1997; Evans et al., 1998; Daniel et al., 1999).

Mit dem Ziel, einzelne Tumorzellen auf DNA- und RNA-Ebene zu untersuchen, wurde deshalb in dieser Arbeit eine Methode zur simultanen Isolierung der beiden Nukleinsäuren entwickelt (3.4.3), die sich bei einer systematischen Überprüfung als hoch zuverlässig erwies. So konnten z.B. mit fünf Zellen in allen durchgeführten DNA- und cDNA-PCR-Amplifikationen positive Signale erhalten werden (Abb. 24, 25). Mutationen waren auf RNA-Ebene auch in Transkripten von Einzelzellen nachweisbar (Abb. 26). Es wurde außerdem gezeigt, daß Transkripte hoch exprimierter Gene wie *GAPDH* mit 1 / 13 Aliquot der cDNA aus Einzelzellen durchaus ohne Präamplifikation (I-PEP) amplifizierbar sind (Abb. 25). Die entwickelte Methode ist somit prinzipiell für die Nukleinsäureisolierung und damit der molekularbiologischen Charakterisierung einzelner Zellen, wie z.B. disseminierter Tumorzellen geeignet.

Überprüft wurde auch, ob sich mittels I-PEP (Dietmaier et al., 1999) amplifizierte cDNA für quantitative Analysen in Array-Experimenten eignet. Expressionsdifferenzen, die zwischen präamplifizierten cDNA-Molekülen festgestellt worden waren, ließen sich aber in der ursprünglichen mRNA-Population nicht verifizieren, so daß von einer relativ starken Verschiebung der Transkriptmenge bei der Amplifikation ausgegangen werden mußte (4.3.4). Daß die Expressionsmuster in vergleichenden Analysen Aussagen über Expressionsdifferenzen zulassen, ist allerdings vorstellbar. Ebenso könnte weiter untersucht werden, ob und wie weit am Beginn der Präamplifikation eine lineare Transkriptvermehrung stattfindet. In diesem Zusammenhang wurde auch die SMART-PCR getestet, die eine lineare Präamplifikation von cDNA-Transkripten verspricht und daher für quantitative Genexpressionsanalysen geeignet erscheint (3.6.2). Das herkömmliche Protokoll wurde dabei so modifiziert, daß bei einzelnen spezifischen PCR-Amplifikationen mit zehn Zellen positive Signale erhalten wurden (Daten nicht gezeigt). Da diese Mindestmenge im Hinblick auf die erwartete Zahl disseminierter Tumorzellen jedoch zu hoch erschien, wurde der Ansatz nicht weiter verfolgt. Allerdings stellt das entwickelte Protokoll möglicherweise für andere Fragestellungen eine ausreichend sensitive Methode dar.

### **5.3 Isolierung und molekulare Charakterisierung disseminierter Tumorzellen aus dem Knochenmark**

Untersuchungen zur molekularen Charakterisierung disseminierter Tumorzellen wurden bisher v.a. an immunzytochemisch gefärbten Zellen sowie an Zelllinien, die aus lebenden disseminierten Zellen etabliert worden waren, durchgeführt (Pantel et al., 1991; Offner et al., 1999; Putz et al., 1999). Um einzelne vitale Zellen für molekulare Analysen zu gewinnen, sollte in dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden, disseminierte Tumorzellen lebend aus Knochenmarksaspiraten von Patienten mit gastrointestinalen, epithelialen Tumoren zu isolieren. Die Voraussetzung hierfür ist die Unterscheidung der Tumorzellen von den normalen Knochenmarkszellen, durch eine Markierung der Tumorzellen mit tumor- oder epithelspezifischen Oberflächenmarkern. Die Identifizierung der Tumorzellen erfolgte in dieser Arbeit mit dem Antikörper BerEP4, der als hoch-spezifisch für zwei epitheliale Glykoproteine beschrieben ist (Latza et al., 1990). Da die Antikörper an magnetische *beads* gekoppelt waren, konnten die *bead*-markierten Tumorzellen mit Hilfe eines Magneten angereichert und unter mikroskopischer Kontrolle mit einem Mikromanipulator einzeln aus der Suspension entfernt werden.

Von 82 Patienten konnten allerdings nur in wenigen Fällen einzelne vitale, markierte Zellen in Knochenmarksaspiraten identifiziert werden (Abb. 20 A - D). Die meisten detektierten *bead*-gebundenen Zellen waren morphologisch nicht mehr intakt (bis zu 48 Zellen bei 30 % der Patienten), siehe Abbildung 20, E – H.

Um einen molekularbiologischen Beweis zu erbringen, daß es sich bei den markierten Zellen tatsächlich um Tumorzellen handelt, wurde versucht, tumorspezifische Mutationen in den Zellen nachzuweisen. Mit diesem Ziel wurde bei sechs Patienten, von denen jeweils mehrere auffällige Zellen isoliert worden waren, zunächst nach Mutationen im Primärtumor gesucht. Dabei konnten insgesamt sieben *P53*-Mutationen (Sequenzierung Exon 5-9), zwei *K-RAS*-Mutationen (*Enrichment*-PCR Codon 12; modifiziert nach Trümper et al., 1994) und eine *APC*-Mutation (Sequenzierung der *mutation cluster region*; Yashima et al., 1994) im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Auffällig war, daß fünf Punktmutationen des *P53*-Gens auf dem Austausch von Cytosin gegen Thymin in einer CG-Sequenz beruhten und damit typisch für einen bekannten Mutationsmechanismus sind, bei dem durch Desaminierung eines methylierten Cytosins die Base Thymin entsteht.

Keine der Mutationen konnte allerdings in den isolierten Zellen identifiziert werden, so daß sich die Abstammung vom Tumorgewebe nicht beweisen ließ. Die Tatsache, daß keine *P53*-Mutationen identifizierbar waren, steht im Einklang mit einer anderen Arbeit, in der ebenfalls keine Mutationen des *P53*-Gens bei disseminierten Zellen nachgewiesen werden konnten (Offner et al., 1999), obwohl *P53*-Defekte häufig bei invasiven, kolorektalen Tumoren beschrieben wurden (Fearon and Vogelstein, 1990). *K-RAS*-Mutationen wurden bisher nur bei zwei Patienten exemplarisch in definierten Zytokeratin-gefärbten Zellen identifiziert (Dietmaier et al., 1999).

Bei der hier durchgeführten Mutationsanalyse muß berücksichtigt werden, daß die Sequenzierung von *P53* und *K-RAS* auf RNA-Ebene erfolgte. Besonders bei *P53* bot sich diese Möglichkeit an (siehe auch Offner et al., 1999), da auf cDNA-Ebene die Amplifizierung der Exons 5 bis 10 durch zwei PCR-Reaktionen erfolgen konnte, für die Erfassung der entsprechenden DNA-Sequenzen dagegen fünf verschiedene PCR-Reaktionen notwendig sind. Denkbar wäre deshalb, daß in den disseminierten Zellen *K-RAS*- und *P53*-Mutationen zwar auf genomischer Ebene vorhanden waren, die entsprechenden Allele aber nicht transkribiert wurden oder evtl. vorhandene Transkripte instabil und damit nicht nachweisbar waren. Dagegen spricht, daß *K-RAS* und *P53* trotz Mutationen in vielen Tumoren auf Protein-Ebene vorhanden sind.

Obwohl in den isolierten Patientenzellen keine Mutationen nachgewiesen werden konnten, legten mehrere Beobachtungen nahe, daß es sich bei den *bead*-markierten Zellen dennoch um disseminierte Tumorzellen handelte:

- In Vorversuchen, bei denen eine definierte Anzahl Tumorzellen (aus Zellkultur) in Blut gegeben wurden, konnten nach der immunomagnetischen Anreicherung 70 % dieser Zellen anhand der Markierung mit *beads* eindeutig unter dem Mikroskop identifiziert werden (Abb. 19, A – C). In der Negativ-Kontrolle (normales Blut ohne Tumorzellen) waren dagegen keine markierten Zellen vorhanden (Abb. 19, F). Das Erscheinungsbild der Zellkultur-Tumorzellen entsprach den morphologisch intakten, *bead*-markierten Zellen in den Patientenproben (Abb. 20, A – D).
- Bei einer Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom wurde ein Aggregat aus mehreren markierten Zellen gefunden (Abb. 21, A). Da Mammakarzinome häufig Knochenmetastasen bilden und das Karzinom der Patientin nach klinischen Angaben bereits metastasiert hatte, könnte das Zell-Aggregat eine echte Mikrometastase darstellen. Bei der Patientin konnten außerdem markierte Zellen immunzytochemisch gegen Zytokeratin 18 gefärbt werden, was einen weiteren Hinweis auf ihren epithelialen Ursprung ergab (Abb. 21, B).
- Ein Patient wies eine Vielzahl *bead*-markierter Zellen im Knochenmarksaspirat auf (> 100). Bei der parallel durchgeführten immunzytochemischen Zytokeratinfärbung (im Rahmen einer mehrjährigen Studie der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg) an Knochenmarkszellen desselben Patienten, wurde ebenfalls eine ungewöhnlich hohe Anzahl (47) positiver Zellen detektiert. Bei dem Patienten, der an einem ausgedehnten, inoperablen Magenkarzinom erkrankt war, wurden auch in einer Peritonealspülung laut histologischem Befund massenhaft Tumorzellen gefunden. Da alle zytologischen und klinischen Befunde auf eine ausgeprägte generalisierte Tumorzellverbreitung wiesen, ist vorstellbar, daß die vielen markierten Zellen im Knochenmark tatsächlich Tumorzellen waren.
- Ebenfalls erwähnt werden muß auch, daß es sich bei den *bead*-gebundenen Zellen vermutlich nicht um markierte normale Knochenmarkszellen handelte, da diese Zellen nicht bei allen Tumorpatienten unspezifisch detektiert wurden.



Die Tatsache, daß die meisten markierten Zellen morphologisch nicht intakt erschienen, läßt darauf schließen, daß sie in der *in vivo* Situation des Knochenmarks ebenfalls nicht lange überlebt hätten bzw. kein Potential zur Bildung von Metastasen besaßen. Diese Vermutung wird von Befunden einer aktuellen, prospektiven Studie der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg gestützt, in der Zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark bei 64 % der Patienten mit kolorektalem pT1-Tumor nachweisbar waren. Diese Zellen hatten jedoch keinerlei prognostische Wertigkeit hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit oder dem rezidivfreien Überleben (H. Spatz, persönliche Mitteilung).

## 5.4 Ausblick

Die speziellen biologischen Eigenschaften von Tumorzellen werden zum großen Teil durch Fehlregulationen auf transkriptioneller Ebene bestimmt. Expressionsanalysen haben sich daher als wertvolle Methode erwiesen, die genetischen Grundlagen der malignen Progression von Tumoren zu charakterisieren. Auch in dieser Arbeit wurde eine Vielzahl fehlregulierter Gene in kolorektalen Karzinomen und Lebermetastasen mittels Array-Technik identifiziert. Inwieweit diese Gene zur malignen Progression beitragen, muß in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden.

- Ein wichtiger Aspekt ist die Identifizierung der Zellpopulationen, die für die differentielle Genexpression in den Tumoren verantwortlich sind. Für diese Fragestellung können Tumorareale bzw. lokales Tumorstroma mit Hilfe eines Laser-Mikrodissektionsgerätes selektiv aus dem Gewebeverband isoliert werden, um die Expression interessanter Gene zu quantifizieren. Alternativ können mRNA in situ-Hybridisierungen durchgeführt werden, die zwar nur semi-quantitative Aussagen zur Genexpression zulassen, aber einen direkten Vergleich der Expressionsintensität in den verschiedenen Zellpopulationen ermöglichen.
- Weiterhin muß durch immunhistochemische Methoden untersucht werden, inwieweit die Expression interessanter Gene auf RNA-Ebene dem tatsächlichen Proteingehalt in den neoplastischen Zellen entspricht.
- Eine funktionelle Charakterisierung der differentiell exprimierten Gene durch zellbiologische und tierexperimentelle Untersuchungen soll klären, ob die veränderte Expression lediglich ein Epiphänomen darstellt oder ob ein kausaler Zusammenhang zur Tumorprogression besteht (z.B. Hemmung der Synthese ausgewählter Proteine durch

Antisense-Technik bzw. in vitro Transfektionsexperimente, folgende Bestimmung des Invasionspotentials von Zellen durch Matrigel-Invasion-Assays, Herstellung von transgenen bzw. „Knock-out“-Mäusen).

- Gene, die nur in einzelnen Tumoren eine differentielle Expression zeigen, eignen sich möglicherweise für differentialdiagnostische und prognostische Aussagen. Zur Abklärung dieser Frage müssen Studien durchgeführt werden, in denen die Expressionsmuster mit klinischen Parametern (Therapierespons, Krankheitsverlauf, Überlebenszeit) korreliert werden. Besonders interessant sind hier retrospektive Studien mit Tumorgeweben aus den Archiven von Pathologien.
- Gene, die in vielen neoplastischen Geweben differentiell exprimiert werden stellen potentielle Zielgene für diagnostische Fragestellungen dar. Es muß untersucht werden, ob anhand der Genexpression zwischen verschiedenen Stadien der Tumorerkrankung (Adenom – Karzinom) differenziert werden kann bzw. ob sich Produkte überexprimierter Gene als Tumormarker (bei Krebserkrankungen im Blut oder in anderen Körperflüssigkeiten nachweisbar) zur Frühdiagnose bzw. Behandlungs- und Verlaufskontrolle eignen.
- Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur immunomagnetischen Isolierung disseminierter Tumorzellen aus dem Knochenmark erwies sich zwar in *spiking*-Experimenten als sehr zuverlässig, war am Patientenmaterial aber nicht routinemäßig durchführbar. Es sollte deshalb weiter untersucht werden, ob disseminierte Tumorzellen unter Verwendung spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper identifiziert und isoliert werden können (Laser-Pinzette, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung).
- Die entwickelte Methode zur simultanen Isolierung von DNA und RNA und die gezeigten nachfolgenden Analysen wie Sequenzanalyse und RT-PCR an Einzelzellen ermöglicht weitergehende molekulargenetische Untersuchungen einzelner Tumorzellen wie z.B. echten Mikrometastasen bzw. an Tumorzellen der Invasionsfront von Karzinomen.

## 6 Zusammenfassung

Kolorektale Adenokarzinome entwickeln sich aus epithelialen Zellen der Darmschleimhaut, in denen aufgrund genetischer Veränderungen Störungen der Wachstumskontrolle und Differenzierung aufgetreten sind. Im Verlauf der malignen Progression kommt es durch die klonale Selektion spezialisierter Subpopulationen von Tumorzellen zu einer Akkumulation weiterer biologischer Abnormalitäten im Tumor, die eine Invasion und schließlich die Metastasierung der entarteten Zellen ermöglichen. Da die Progression maligner Tumoren mit komplexen Veränderungen der Genexpression in den beteiligten Tumorzellen assoziiert ist, sollten im ersten Teil dieser Arbeit Expressionsprofile von normaler Darmschleimhaut, Primärtumoren und Metastasen erstellt werden, um die Grundlage für weitere molekulare Untersuchungen abnormal regulierter, potentiell progressions- und metastasierungsrelevanter Gene zu schaffen.

Mittels cDNA-Array-Technik (Atlas Human Cancer 1.2 Array, Clontech) wurde die Expression von 1176 krebsrelevanten Genen in verschieden stark fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen (zwei pT1-, vier pT2-, elf pT3-, acht pT4-Tumoren), korrespondierender normaler Darmschleimhaut derselben Patienten und 14 Lebermetastasen untersucht. Durch verschiedene Ansätze zur Auswertung wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- (1) Durch einen paarweisen Vergleich der Expressionsprofile von 25 Tumor- und korrespondierenden Normalgeweben konnten 50 Gene identifiziert werden, die in mindestens 25 % der Tumoren eine mehr als vierfache differentielle Expression zeigten. 34 dieser Gene waren in den Tumorgeweben überexprimiert, 16 Gene zeigten eine verminderte Expression (Tab. 2). Neben Genen wie *MYC*, *PCNA*, *Cyclin A*, *HMGI*, die bekanntermaßen in malignen kolorektalen Tumoren eine differentielle Expression zeigen, wurden interessante Gene identifiziert, deren Bedeutung in kolorektalen Karzinomen bisher weitgehend unbekannt ist, z.B. *BENE*, *UGT2B15*, *E1A-F*, *CKS2*, *BIGH3*, *MIC1*, *EIF3-P116*.
- (2) Zur Verifizierung der Array-Ergebnisse mit einer unabhängigen Methode, wurde die Expression von sieben Zielgenen (*CKS2*, *MYC*, *MIC1*, *BIGH3*, *IFITM*, *NGAL* und *UGT2B151*) relativ zum stabil exprimierten Referenzgen *TXBP151* am LightCycler quantifiziert. Die auf den Arrays detektierte Tendenz und Größenordnung der differentiellen Genexpression wurde in allen Fällen durch die Ergebnisse der LightCycler-Experimente bestätigt (Tab. 3).

- (3) Mit Hilfe der Software Cluster und TreeView (Eisen et al., 1998) wurden Clusteranalysen durchgeführt, bei denen unter definierten mathematischen Kriterien die Expressionsprofile aller Gewebeproben miteinander verglichen wurden. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte anhand eines Dendrogrammes (Abb. 14), in dem die Gewebe nach der Ähnlichkeit ihrer Expression gruppiert waren.
- a) Es wurde eine getrennte Anordnung der neoplastischen (Tumoren / Metastasen) und normalen Geweben an den Hauptästen des Dendrogrammes beobachtet, was auf deutliche Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Gewebetypen hinwies.
  - b) Die neoplastischen Gewebe wurden weiterhin von der Software in zwei verschiedene Subgruppen unterteilt, die mit dem histologisch definierten Stadium korrelierten. Eine Subgruppe (*high stage*) enthielt zwei fortgeschrittene pT3- sowie alle pT4-Tumoren bzw. elf der 14 untersuchten Lebermetastasen. Dagegen umfaßte die andere Subgruppe (*low stage*) alle pT1-, pT2- und die meisten pT3-Tumoren, die entweder nicht metastasiert waren, oder eine relativ geringe Metastasierungsrate aufwiesen. Nur zwei pT3-Tumoren dieser Gruppe waren hämatogen metastasiert.
- (4) Mit Hilfe statistischer Berechnungen erfolgte die Identifizierung von Genen, die zwischen Tumor- und Normalgeweben bzw. zwischen *low stage*- und *high stage*-Gruppe statistisch hoch signifikant differentiell exprimiert waren ( $P < 0.001$ ). 40 Gene zeigten unter diesen Kriterien zwischen Tumor- und Normalgeweben eine mehr als vierfache differentielle Expression. Deutlich weniger Gene variierten zwischen der *low stage*- und *high stage*-Gruppe. Hier wurden 23 Gene identifiziert, die mindestens um den Faktor drei differentiell exprimiert waren.
- (5) Eine separate Clusteranalyse mit diesen insgesamt 60 verschiedenen Genen (drei Gene waren sowohl zwischen Tumor- und Normalgewebe, als auch zwischen *low stage*- und der *high stage*-Gruppe statistisch signifikant differentiell exprimiert) zeigte eine Einteilung der Gewebeproben die weitgehend identisch war mit dem Ergebnis der Clusteranalyse unter Verwendung von 1011 Genen. Damit wurde bestätigt, daß die 60 Gene eine wesentliche Bedeutung für die molekulare Klassifizierung der untersuchten kolorektalen Tumor- und Normalgewebe hatten und daher potentielle molekulardiagnostische Marker darstellen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten einzelne disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark von Tumorpatienten isoliert und auf Einzelzell-Ebene charakterisiert werden. Wissenschaftliches Interesse auf diesem Gebiet besteht, weil sich bereits früh während der Tumorprogression Tumorzellen aus der soliden Tumormasse ablösen, in den Körperkreislauf gelangen und möglicherweise einen prognostisch ungünstigen Verlauf der Tumorerkrankung bedingen. Das individuelle Potential isolierter disseminierter Tumorzellen für die Bildung von Metastasen ist allerdings bisher weitgehend unerforscht. Folgende Untersuchungen wurden zu diesem Thema durchgeführt:

- (1) Anhand von *spiking*-Experimenten wurde eine Methode etabliert, mit der vitale, epitheliale Tumorzellen immunomagnetisch aus einer Überzahl normaler Blutzellen angereichert und unter mikroskopischer Kontrolle einzeln isoliert werden können. Die Ausbeute betrug 70 % (70 von 100 Tumorzellen wurden aus 18 Mio mononukleären Blutzellen isoliert).
- (2) Im Knochenmark von 82 Patienten wurden nur in wenigen Fällen einzelne, morphologisch intakte, potentielle Tumorzellen detektiert. Bei ca. 30 % der Patienten wurden auffällige Zellen isoliert, die aber aufgrund von Zelldeformationen nicht vital erschienen. Obwohl zahlreiche Beobachtungen (Morphologie, klinischer Hintergrund) nahelegten, daß es sich bei diesen Zellen um Tumorzellen handelte, konnten in den Zellen keine tumorspezifischen Mutationen nachgewiesen werden.
- (3) Die Voraussetzung für die molekulare Analyse der isolierten Zellen, war die Etablierung von Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren aus geringen Zellzahlen. Standardmethoden wurden dabei so kombiniert und optimiert, daß schließlich eine simultane Isolierung von DNA und RNA zuverlässig aus einem Ausgangsmaterial von fünf Zellen durchgeführt werden konnte. Nach Präamplifikation stand genetisches Material für zwölf (DNA) bzw. 13 (cDNA) verschiedene PCR-Analysen zur Verfügung, wobei hoch exprimierte Transkripte aus Einzelzellen auch ohne Präamplifikation in einer einzelnen 50-Zyklen PCR detektiert werden konnten. RNA aus Einzelzellen war nach Präamplifikation auch zum Nachweis von Mutationen durch Sequenzanalyse geeignet.

## 7 Literaturverzeichnis

**A**altonen, L. A., Peltomaki, P., Leach, F. S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., Powell, S. M., Jen, J., Hamilton, S. R. and et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer, *Science*. 260: 812-6., 1993.

Aaltonen, L. A., Peltomaki, P., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., Jass, J. R., Green, J. S., Lynch, H. T., Watson, P., Tallqvist, G., Juhola, M. and et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients, *Cancer Res*. 54: 1645-8., 1994.

Abe, N., Watanabe, T., Sugiyama, M., Uchimura, H., Chiappetta, G., Fusco, A. and Atomi, Y. Determination of high mobility group I(Y) expression level in colorectal neoplasias: a potential diagnostic marker, *Cancer Res*. 59: 1169-74., 1999.

Ahuja, N., Mohan, A. L., Li, Q., Stolker, J. M., Herman, J. G., Hamilton, S. R., Baylin, S. B. and Issa, J. P. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer, *Cancer Res*. 57: 3370-4., 1997.

Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore, T., Hudson, J., Jr., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W. C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Armitage, J. O., Warnke, R., Staudt, L. M. and et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling, *Nature*. 403: 503-11., 2000.

Alon, U., Barkai, N., Notterman, D. A., Gish, K., Ybarra, S., Mack, D. and Levine, A. J. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 6745-50., 1999.

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends, 3. Ausgabe, Saarbrücken 2002.

**B**ackert, S., Gelos, M., Kobalz, U., Hanski, M. L., Bohm, C., Mann, B., Lovin, N., Gratchev, A., Mansmann, U., Moyer, M. P., Riecken, E. O. and Hanski, C. Differential gene expression in colon carcinoma cells and tissues detected with a cDNA array, *Int J Cancer*. 82: 868-74., 1999.

Badinga, L., Song, S., Simmen, R. C. and Simmen, F. A. A distal regulatory region of the insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) gene interacts with the basic helix-loop-helix transcription factor, AP-4, *Endocrine*. 8: 281-9., 1998.

Baylin, S. B., Herman, J. G., Graff, J. R., Vertino, P. M. and Issa, J. P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia, *Adv Cancer Res*. 72: 141-96, 1998.

Bestor, T. H. Gene silencing. Methylation meets acetylation, *Nature*. 393: 311-2., 1998.

Bhattacharjee, A., Richards, W. G., Staunton, J., Li, C., Monti, S., Vasa, P., Ladd, C., Beheshti, J., Bueno, R., Gillette, M., Loda, M., Weber, G., Mark, E. J., Lander, E. S., Wong, W., Johnson, B. E., Golub, T. R., Sugarbaker, D. J. and Meyerson, M. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 13790-5., 2001.

Bischoff, J. R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C. S., Novotny, M., Slamon, D. J. and Plowman, G. D. A homologue of *Drosophila aurora* kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers, *Embo J.* 17: 3052-65., 1998.

Bisgaard, M. L., Fenger, K., Bulow, S., Niebuhr, E. and Mohr, J. Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate, *Hum Mutat.* 3: 121-5, 1994.

Bittner, M., Meltzer, P., Chen, Y., Jiang, Y., Seftor, E., Hendrix, M., Radmacher, M., Simon, R., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Sampas, N., Dougherty, E., Wang, E., Marincola, F., Gooden, C., Lueders, J., Glatfelter, A., Pollock, P., Carpten, J., Gillanders, E., Leja, D., Dietrich, K., Beaudry, C., Berens, M., Alberts, D. and Sondak, V. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling, *Nature.* 406: 536-40., 2000.

Boardman, L. A., Schmidt, S., Lindor, N. M., Burgart, L. J., Cunningham, J. M., Price-Troska, T., Snow, K., Ahlquist, D. A. and Thibodeau, S. N. A search for germline APC mutations in early onset colorectal cancer or familial colorectal cancer with normal DNA mismatch repair, *Genes Chromosomes Cancer.* 30: 181-6., 2001

Boland, C. R., *The Genetic Basis of Human Cancer*, Vogelstein B., Kinzler K.; The McGraw-Hill Companies, Inc., 1998.

Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L. A., Knuechel, R. and Kirchner, T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 10356-61., 2001.

Brattain, M. G., Fine, W. D., Khaled, F. M., Thompson, J. and Brattain, D. E. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma, *Cancer Res.* 41: 1751-6., 1981.

Brooksbank, C. From microarray to mechanism, *Nature Reviews Cancer* 2, No 1, 2002.

Buckhaults, P., Rago, C., St Croix, B., Romans, K. E., Saha, S., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors, *Cancer Res.* 61: 6996-7001., 2001.

**C**ahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers, *Nature.* 392: 300-3., 1998.

Chen, W. S., Kung, H. J., Yang, W. K. and Lin, W. Comparative tyrosine-kinase profiles in colorectal cancers: enhanced arg expression in carcinoma as compared with adenoma and normal mucosa, *Int J Cancer.* 83: 579-84., 1999.

Chen, J. P., Lin, C., Xu, C. P., Zhang, X. Y. and Wu, M. The therapeutic effects of recombinant adenovirus RA538 on human gastric carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol.* 6(6): 855-60., 2000.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem.* 162(1):156-9., 1987.

Chou, C. F. and Tai, J. H. Simultaneous extraction of DNA and RNA from nuclease-rich pathogenic protozoan *Trichomonas vaginalis*, *Biotechniques.* 20: 790-1., 1996.

Coleman, R. E. and Rubens, R. D. The clinical course of bone metastases from breast cancer, *Br J Cancer.* 55: 61-6., 1987.

Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N. and Golub, T. R. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 3260-5., 2000.

Cunningham, J. M., Kim, C. Y., Christensen, E. R., Tester, D. J., Parc, Y., Burgart, L. J., Halling, K. C., McDonnell, S. K., Schaid, D. J., Walsh Vockley, C., Kubly, V., Nelson, H., Michels, V. V. and Thibodeau, S. N. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas, *Am J Hum Genet.* 69: 780-90., 2001.

**D**aniel, P. T., Sturm, I., Ritschel, S., Friedrich, K., Dorken, B., Bendzko, P. and Hillebrand, T. Detection of genomic DNA fragmentation during apoptosis (DNA ladder) and the simultaneous isolation of RNA from low cell numbers, *Anal Biochem.* 266: 110-5., 1999.

Davis, R. E., Brown, K. D., Siebenlist, U. and Staudt, L. M. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells, *J Exp Med.* 194: 1861-74., 2001.

Dearnaley, D. P., Sloane, J. P., Ormerod, M. G., Steele, K., Coombes, R. C., Clink, H. M., Powles, T. J., Ford, H. T., Gazet, J. C. and Neville, A. M. Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen, *Br J Cancer.* 44: 85-90., 1981.

De Lange, R., Burtscher, H., Jarsch, M. and Weidle, U. H. Identification of metastasis-associated genes by transcriptional profiling of metastatic versus non-metastatic colon cancer cell lines, *Anticancer Res.* 21: 2329-39., 2001.

DeRisi, J. L., Iyer, V. R. and Brown, P. O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale, *Science.* 278: 680-6., 1997.

Dietmaier, W., Hartmann, A., Wallinger, S., Heinmoller, E., Kerner, T., Endl, E., Jauch, K. W., Hofstadter, F. and Ruschoff, J. Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification, *Am J Pathol.* 154: 83-95., 1999.

Döbbeling, U., Boni, R., Haffner, A., Dummer, R. and Burg, G. Method for simultaneous RNA and DNA isolation from biopsy material, culture cells, plants and bacteria, *Biotechniques.* 22: 88-90., 1997.



**E**isen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. and Botstein, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 14863-8., 1998.

Eickhoff, B., Korn, B., Schick, M., Poustka, A. and van der Bosch, J. Normalization of array hybridization experiments in differential gene expression analysis, *Nucleic Acids Res.* 27: e33., 1999.

Esteller, M. and Herman, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours, *J Pathol.* 196: 1-7., 2002.

Evans, J. K., Troilo, P. and Ledwith, B. J. Simultaneous purification of RNA and DNA from liver using sodium acetate precipitation, *Biotechniques.* 24: 416-8., 1998.

**F**earon, E. R. and Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis, *Cell.* 61: 759-67., 1990.

Fearon, E. and Gruber, S. *The molecular basis of cancer*, Mendelsohn, J.; W. B. Saunders Company, 2001

Feng, X. H., Liang, Y. Y., Liang, M., Zhai, W. and Lin, X. Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta- mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B), *Mol Cell.* 9: 133-43., 2002.

Fenoglio-Preiser C., *Gastrointestinal Pathology*, Chapter 20; Lippincott-RavenPublishers, 1999

Fidler, I., *Clinical Oncology*, Abeloff, M., Chapter 3; Churchill Livingstone, 2000.

Fishel, R. The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis, *Cancer Res.* 61: 7369-74., 2001.

Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J. H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R. H. and Clevers, H. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability, *Nat Cell Biol.* 3: 433-8., 2001.

Friedl, A., Stoesz, S. P., Buckley, P. and Gould, M. N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression, *Histochem J.* 31: 433-41., 1999.

Frisch, S. M. and Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis, *J Cell Biol.* 124: 619-26., 1994.

**G**anoth, D., Bornstein, G., Ko, T. K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M. and Hershko, A. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)- mediated ubiquitinylation of p27, *Nat Cell Biol.* 3: 321-4., 2001.

Garber, M. E., Troyanskaya, O. G., Schluens, K., Petersen, S., Thaesler, Z., Pacyna-Gengelbach, M., van de Rijn, M., Rosen, G. D., Perou, C. M., Whyte, R. I., Altman, R. B., Brown, P. O., Botstein, D. and Petersen, I. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 13784-9., 2001.

Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D. and Lander, E. S. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring, *Science*. 286: 531-7., 1999.

Grady, W. M., Myeroff, L. L., Swinler, S. E., Rajput, A., Thiagalingam, S., Lutterbaugh, J. D., Neumann, A., Brattain, M. G., Chang, J., Kim, S. J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Willson, J. K. and Markowitz, S. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers, *Cancer Res*. 59: 320-4., 1999.

Green, M. D., Oturu, E. M. and Tephly, T. R. Stable expression of a human liver UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B15) with activity toward steroid and xenobiotic substrates, *Drug Metab Dispos*. 22: 799-805., 1994.

Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M. and et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene, *Cell*. 66: 589-600., 1991.

**H**anda, K., Yamakawa, M., Takeda, H., Kimura, S. and Takahashi, T. Expression of cell cycle markers in colorectal carcinoma: superiority of cyclin A as an indicator of poor prognosis, *Int J Cancer*. 84: 225-33., 1999.

Hannon, G. J. and Beach, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest, *Nature*. 371: 257-61., 1994.

Hanzawa, M., Shindoh, M., Higashino, F., Yasuda, M., Inoue, N., Hida, K., Ono, M., Kohgo, T., Nakamura, M., Notani, K., Fukuda, H., Totsuka, Y., Yoshida, K. and Fujinaga, K. Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes, *Carcinogenesis*. 21: 1079-85., 2000.

Hegde, P., Qi, R., Gaspard, R., Abernathy, K., Dharap, S., Earle-Hughes, J., Gay, C., Nwokekeh, N. U., Chen, T., Saeed, A. I., Sharov, V., Lee, N. H., Yeatman, T. J. and Quackenbush, J. Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray, *Cancer Res*. 61: 7792-7., 2001.

Heiss, M. M., Allgayer, H., Gruetzner, K. U., Funke, I., Babic, R., Jauch, K. W. and Schildberg, F. W. Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer, *Nat Med*. 1: 1035-9., 1995.

Hernandez, A., Smith, F., Wang, Q., Wang, X. and Evers, B. M. Assessment of differential gene expression patterns in human colon cancers, *Ann Surg*. 232: 576-85., 2000.

Higashino, F., Yoshida, K., Noumi, T., Seiki, M. and Fujinaga, K. Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters, *Oncogene*. 10: 1461-3., 1995.

Hiroumi, H., Dosaka-Akita, H., Yoshida, K., Shindoh, M., Ohbuchi, T., Fujinaga, K. and Nishimura, M. Expression of E1AF/PEA3, an Ets-related transcription factor in human non-small-cell lung cancers: its relevance in cell motility and invasion, *Int J Cancer*. 93: 786-91., 2001.

Hoeflich, A., Reisinger, R., Lahm, H., Kiess, W., Blum, W. F., Kolb, H. J., Weber, M. M. and Wolf, E. Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter?, *Cancer Res.* *61*: 8601-10., 2001.

Hromas, R., Hufford, M., Sutton, J., Xu, D., Li, Y. and Lu, L. PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochim. Biophys. Acta* *1354*: 40-4., 1997.

Huang, J., Papadopoulos, N., McKinley, A. J., Farrington, S. M., Curtis, L. J., Wyllie, A. H., Zheng, S., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Morin, P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Dunlop, M. G. APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *93*: 9049-54., 1996

Hubank, M. and Schatz, D. G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA, *Nucleic Acids Res.* *22*: 5640-8., 1994.

Hughes, T. R., Marton, M. J., Jones, A. R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Armour, C. D., Bennett, H. A., Coffey, E., Dai, H., He, Y. D., Kidd, M. J., King, A. M., Meyer, M. R., Slade, D., Lum, P. Y., Stepaniants, S. B., Shoemaker, D. D., Gachotte, D., Chakraburttty, K., Simon, J., Bard, M. and Friend, S. H. Functional discovery via a compendium of expression profiles, *Cell.* *102*: 109-26., 2000.

**I**nufusa, H., Nakamura, M., Adachi, T., Nakatani, Y., Shindo, K., Yasutomi, M. and Matsuura, H. Localization of oncofetal and normal fibronectin in colorectal cancer. Correlation with histologic grade, liver metastasis, and prognosis, *Cancer.* *75*: 2802-8., 1995.

Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D. and Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis, *Nature.* *363*: 558-61., 1993.

Ish-Horowicz, D. and Burke, J. F. Rapid and efficient cosmid cloning, *Nucleic Acids Res.* *9*: 2989-98., 1981.

**J**ones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A. P. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription, *Nat Genet.* *19*: 187-91., 1998.

Jubb, A. M., Bell, S. M. and Quirke, P. Methylation and colorectal cancer, *J Pathol.* *195*: 111-34., 2001.

**K**akahara, T., Fukuda, T., Tanaka, A., Emura, I., Kishi, K., Asami, K. and Uchiyama, M. Expression of deoxycytidine kinase (dCK) gene in leukemic cells in childhood: decreased expression of dCK gene in relapsed leukemia, *Leuk Lymphoma.* *31*: 405-9., 1998.

Kaplan, K. B., Burds, A. A., Swedlow, J. R., Bekir, S. S., Sorger, P. K. and Nathke, I. S. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation, *Nat Cell Biol.* *3*: 429-32., 2001.

Kawasaki, H., Komai, K., Ouyang, Z., Murata, M., Hikasa, M., Ohgiri, M. and Shiozawa, S. c-Fos/activator protein-1 transactivates wee1 kinase at G(1)/S to inhibit premature mitosis in antigen-specific Th1 cells, *Embo J.* *20*: 4618-27., 2001.

Kaya, M., Yoshida, K., Higashino, F., Mitaka, T., Ishii, S. and Fujinaga, K. A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells, *Oncogene*. *12*: 221-7., 1996.

Kitahara, O., Furukawa, Y., Tanaka, T., Kihara, C., Ono, K., Yanagawa, R., Nita, M. E., Takagi, T., Nakamura, Y. and Tsunoda, T. Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia, *Cancer Res*. *61*: 3544-9., 2001.

Klein, C. A., Schmidt-Kittler, O., Schardt, J. A., Pantel, K., Speicher, M. R. and Riethmuller, G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *96*: 4494-9., 1999.

Knecht, R., Elez, R., Oechler, M., Solbach, C., von Ilberg, C. and Strebhardt, K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck, *Cancer Res*. *59*: 2794-7., 1999.

Knudson, A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *68*(4): 820-3., 1971.

**L**amlum, H., Papadopoulou, A., Ilyas, M., Rowan, A., Gillet, C., Hanby, A., Talbot, I., Bodmer, W. and Tomlinson, I. APC mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *97*: 2225-8., 2000.

Lanier, L. L., Corliss, B. C., Wu, J., Leong, C. and Phillips, J. H. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells, *Nature*. *391*: 703-7., 1998.

Latza, U., Niedobitek, G., Schwarting, R., Nekarda, H. and Stein, H. Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial, *J Clin Pathol*. *43*: 213-9., 1990.

Lazar, V., Grandjouan, S., Bognel, C., Couturier, D., Rougier, P., Bellet, D. and Bressac-de Paillerets, B. Accumulation of multiple mutations in tumour suppressor genes during colorectal tumorigenesis in HNPCC patients, *Hum Mol Genet*. *3*: 2257-60., 1994.

Lee, J. C., Chow, N. H., Wang, S. T. and Huang, S. M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients, *Eur J Cancer*. *36*: 748-53., 2000.

Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., 3rd, McCoy, C. E., Mazur, K. C. and Mabry, N. D. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines, *Cancer Res*. *36*: 4562-9., 1976.

Leinung, S. Cytokeratin-positive cells in bone marrow in comparison with other prognostic factors in colon carcinoma, *Langenbecks Arch Surg* *385*(5): 337-43., 2000.

Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers, *Nature*. *396*: 643-9., 1998.

- Li, M. and Schweizer, H. P. Resolution of common DNA sequencing ambiguities of GC-rich DNA templates by terminal deoxynucleotidyl transferase without dGTP analogues, *FOCUS 14/15*: 19-20, 1993.
- Liang, P. and Pardee, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science*. *257*: 967-71., 1992.
- Lin, W. C., Li, A. F., Chi, C. W., Chung, W. W., Huang, C. L., Lui, W. Y., Kung, H. J. and Wu, C. W. tie-1 protein tyrosine kinase: a novel independent prognostic marker for gastric cancer, *Clin Cancer Res*. *5*: 1745-51., 1999.
- Lindemann, F., Schlimok, G., Dirschedl, P., Witte, J. and Riethmuller, G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients, *Lancet*. *340*: 685-9., 1992.
- Liotta, L., *Cancer Medicine*, Holland, J., Chapter 9; Williams & Wilkins, 1997.
- Liotta, L. A. An attractive force in metastasis, *Nature*. *410*: 24-5., 2001. [1]
- Liotta, L. A. and Kohn, E. C. The microenvironment of the tumour-host interface, *Nature*. *411*: 375-9., 2001. [2]
- Liotta, L., *The Cancer Handbook*, Alison, M., Chapter 16.; Naure publishing group, 2002.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R. and Lockhart, D. J. High density synthetic oligonucleotide arrays, *Nat Genet*. *21*: 20-4., 1999.
- Liu, B., Parsons, R., Papadopoulos, N., Nicolaides, N. C., Lynch, H. T., Watson, P., Jass, J. R., Dunlop, M., Wyllie, A., Peltomaki, P., de la Chapelle, A., Hamilton, S. R., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients, *Nat Med*. *2*: 169-74., 1996.
- M**acleane, K. N., McKay, I. A. and Bustin, S. A. Differential effects of sodium butyrate on the transcription of the human TIS11 family of early-response genes in colorectal cancer cells, *Br J Biomed Sci*. *55*: 184-91., 1998.
- Macmillan, J. C., Hudson, J. W., Bull, S., Dennis, J. W. and Swallow, C. J. Comparative expression of the mitotic regulators SAK and PLK in colorectal cancer, *Ann Surg Oncol*. *8*: 729-40., 2001.
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M. L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W. F., Moyer, M. P., Riecken, E. O., Buhr, H. J. and Hanski, C. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *96*: 1603-8., 1999.
- de Marco, M. C., Kremer, L., Albar, J. P., Martinez-Menarguez, J. A., Ballesta, J., Garcia-Lopez, M. A., Marazuela, M., Puertollano, R. and Alonso, M. A. BENE, a novel raft-associated protein of the MAL proteolipid family, interacts with caveolin-1 in human endothelial-like ECV304 cells, *J Biol Chem*. *276*: 23009-17., 2001.
- Mareel, M., *Encyclopedia of Cancer*, Bertino J., 1072 - 1038; Academic press, 1996.

- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W. Vogelstein, B., and et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability, *Science*. 268: 1336-8., 1995.
- Medelsohn, J, The molecular basis of cancer, Mendelsohn, J.; W. B. Saunders Company, 2001.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. and Krepler, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells, *Cell*. 31: 11-24., 1982.
- Moore, A. G., Brown, D. A., Fairlie, W. D., Bauskin, A. R., Brown, P. K., Munier, M. L. C., Russell, P. K., Salamonsen, L. A., Wallace, E. M. and Breit, S. N. The transforming growth factor-beta superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *J. Clin. Endocr. Metab.* 85: 4781-8., 2000.
- Mori, Y., Yin, J., Rashid, A., Leggett, B. A., Young, J., Simms, L., Kuehl, P. M., Langenberg, P., Meltzer, S. J. and Stine, O. C. Instabilotyping: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability, *Cancer Res*. 61: 6046-9., 2001.
- Muller, P. and Schlimok, G. Bone marrow "micrometastases" of epithelial tumors: detection and clinical relevance, *J Cancer Res Clin Oncol*. 126: 607-18., 2000.
- Munier, F. L., Korvatska, E., Djemai, A., Le Paslier, D., Zografos, L., Pescia, G. and Schorderet, D. F. Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nature Genet*. 15: 247-51., 1997.
- Murray, V. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction, *Nucleic Acids Res*. 17: 8889., 1989.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N. and Bird, A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex, *Nature*. 393: 386-9., 1998.
- Nielsen, B. S., Borregaard, N., Bundgaard, J. R., Timshel, S., Sehested, M. and Kjeldsen, L. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases, *Gut*. 38: 414-20., 1996.
- Notterman, D. A., Alon, U., Sierk, A. J. and Levine, A. J. Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays, *Cancer Res*. 61: 3124-30., 2001.
- Nupponen, N. N., Porkka, K., Kakkola, L., Tanner, M., Persson, K., Borg, A., Isola, J. and Visakorpi, T. Amplification and overexpression of p40 subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in breast and prostate cancer, *Am J Pathol*. 154(6):1777-83., 1999.
- Nuwaysir, E. F., Bittner, M., Trent, J., Barrett, J. C. and Afshari, C. A. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics, *Mol Carcinog*. 24: 153-9., 1999.

**O**ffner, S., Schmaus, W., Witter, K., Baretton, G. B., Schlimok, G., Passlick, B., Riethmuller, G. and Pantel, K. p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 6942-6., 1999.

Otsuka, M., Kato, M., Yoshikawa, T., Chen, H., Brown, E. J., Masuho, Y., Omata, M. and Seki, N. Differential expression of the L-plastin gene in human colorectal cancer progression and metastasis, *Biochem Biophys Res Commun.* 289: 876-81., 2001.

**P**aget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889, *Cancer Metastasis Rev.* 8: 98-101., 1989.

Pantel, K., Schlimok, G., Kutter, D., Schaller, G., Genz, T., Wiebecke, B., Backmann, R., Funke, I. and Riethmuller, G. Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells, *Cancer Res.* 51: 4712-5., 1991.

Pantel, K., Izbicki, J. R., Angstwurm, M., Braun, S., Passlick, B., Karg, O., Thetter, O. and Riethmuller, G. Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer, *Cancer Res.* 53: 1027-31., 1993. [1]

Pantel, K., Schlimok, G., Braun, S., Kutter, D., Lindemann, F., Schaller, G., Funke, I., Izbicki, J. R. and Riethmuller, G. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells, *J Natl Cancer Inst.* 85: 1419-24., 1993. [2]

Pantel, K., Schlimok, G., Angstwurm, M., Weckermann, D., Schmaus, W., Gath, H., Passlick, B., Izbicki, J. R. and Riethmuller, G. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow, *J Hematother.* 3: 165-73., 1994.

Pantel, K., Izbicki, J., Passlick, B., Angstwurm, M., Haussinger, K., Thetter, O. and Riethmuller, G. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases, *Lancet.* 347: 649-53., 1996.

Pantel, K., Cote, R. J. and Fodstad, O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease, *J Natl Cancer Inst.* 91: 1113-24., 1999.

Pantel, K. and von Knebel Doeberitz, M. Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells, *Curr Opin Oncol.* 12: 95-101., 2000.

Pardoll, D. T cells and tumours, *Nature.* 411: 1010-2., 2001.

Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O. and Botstein, D. Molecular portraits of human breast tumours, *Nature.* 406: 747-52., 2000.

Phimister B. et al., *Nature Genetics.* 21:1-60., 1999.

- Pincheira, R., Chen, Q. and Zhang, J. T. Identification of a 170-kDa protein over-expressed in lung cancers, *Br J Cancer*. 84(11):1520-7., 2001.
- Pinheiro, N. A., Caballero, O. L., Soares, F., Reis, L. F. and Simpson, A. J. Significant overexpression of oligophrenin-1 in colorectal tumors detected by cDNA microarray analysis, *Cancer Lett*. 172: 67-73., 2001.
- Platzer, P., Upender, M. B., Wilson, K., Willis, J., Lutterbaugh, J., Nosrati, A., Willson, J. K., Mack, D., Ried, T. and Markowitz, S. Silence of chromosomal amplifications in colon cancer, *Cancer Res*. 62: 1134-8., 2002.
- Porte, H., Chastre, E., Prevot, S., Nordlinger, B., Empereur, S., Basset, P., Chambon, P. and Gspach, C. Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes, *Int J Cancer*. 64: 70-5., 1995.
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis, *Nature*. 359: 235-7., 1992.
- Putz, E., Witter, K., Offner, S., Stosiek, P., Zippelius, A., Johnson, J., Zahn, R., Riethmuller, G. and Pantel, K. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases, *Cancer Res*. 59: 241-8., 1999.
- R**ampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C. and Perucho, M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype, *Science*. 275: 967-9., 1997.
- Rodrigues, N. R., Rowan, A., Smith, M. E., Kerr, I. B., Bodmer, W. F., Gannon, J. V. and Lane, D. P. p53 mutations in colorectal cancer, *Proc Natl Acad Sci*. 87(19): 7555-9., 1990.
- Roeb, E., Dietrich, C. G., Winograd, R., Arndt, M., Breuer, B., Fass, J., Schumpelick, V. and Matern, S. Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9, *Cancer*. 92: 2680-91., 2001.
- Ruiz van Haperen, V. W. and Peters, G. J. New targets for pyrimidine antimetabolites for the treatment of solid tumours. 2: Deoxycytidine kinase, *Pharm World Sci*. 16: 104-12., 1994. [1]
- Ruiz van Haperen, V. W., Veerman, G., Eriksson, S., Boven, E., Stegmann, A. P., Hermsen, M., Vermorcken, J. B., Pinedo, H. M. and Peters, G. J. Development and molecular characterization of a 2',2'-difluorodeoxycytidine-resistant variant of the human ovarian carcinoma cell line A2780, *Cancer Res*. 54(15): 4138-43., 1994. [2]
- Ruschoff, J., Dietmaier, W., Bocker, T., Wallinger, S., Kullmann, F., Beham, A. and Hofstadter, F. Molecular cancer disposition diagnosis exemplified by colorectal carcinoma. What is the contribution of pathology? *Pathologie* 19(4):269-78, 1998.
- S**aha, S., Bardelli, A., Buckhaults, P., Velculescu, V. E., Rago, C., St Croix, B., Romans, K. E., Choti, M. A., Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer, *Science*. 294: 1343-6., 2001.



- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*. 230: 1350-4., 1985.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74: 5463-7., 1977.
- Scherl-Mostageer, M., Sommergruber, W., Abseher, R., Hauptmann, R., Ambros, P. and Schweifer, N. Identification of a novel gene, CDCP1, overexpressed in human colorectal cancer, *Oncogene*. 20: 4402-8., 2001.
- Schlimok, G., Funke, I., Holzmann, B., Gottlinger, G., Schmidt, G., Hauser, H., Swierkot, S., Warnecke, H. H., Schneider, B., Koprowski, H. and et al. Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84: 8672-6., 1987.
- Schlimok, G., Funke, I., Bock, B., Schweiberer, B., Witte, J. and Riethmuller, G. Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance, *J Clin Oncol*. 8: 831-7., 1990.
- Schmoll H.-J., CD-ROM Kompendium Internistische Onkologie; Springer Verlag, 1999.
- Schweinfest, C. W., Henderson, K. W., Gu, J. R., Kottaridis, S. D., Besbeas, S., Panotopoulou, E. and Papas, T. S. Subtraction hybridization cDNA libraries from colon carcinoma and hepatic cancer, *Genet Anal Tech Appl*. 7: 64-70., 1990.
- Shimada, H., Ichikawa, H., Nakamura, S., Katsu, R., Iwasa, M., Kitabayashi, I. and Ohki, M. Analysis of genes under the downstream control of the t(8;21) fusion protein AML1-MTG8: overexpression of the TIS11b (ERF-1, cMG1) gene induces myeloid cell proliferation in response to G-CSF, *Blood*. 96: 655-63., 2000.
- Shichiri, M., Yoshinaga, K., Hisatomi, H., Sugihara, K. and Hirata, Y. Genetic and epigenetic inactivation of mitotic checkpoint genes hBUB1 and hBUBR1 and their relationship to survival, *Cancer Res*. 1: 13-7., 2002.
- Simon, K. E., Cha, H. H. and Firestone, G. L. Transforming growth factor beta down-regulation of CKShs1 transcripts in growth-inhibited epithelial cells, *Cell Growth Differ*. 6(10):1261-9., 1995.
- Simons, K. and Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633):569-72., 1997.
- Skonier, J., Neubauer, M., Madisen, L., Bennett, K., Plowman, G. D. and Purchio, A. F. cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol*. 11: 511-22., 1992.
- Sloane, J. P., Ormerod, M. G. and Neville, A. M. Potential pathological application of immunocytochemical methods to the detection of micrometastases, *Cancer Res*. 40: 3079-82., 1980.

Smits, V. A., Klompmaker, R., Arnaud, L., Rijksen, G., Nigg, E. A. and Medema, R. H. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint, *Nat Cell Biol.* 2: 672-6., 2000.

Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Eystein Lonning, P. and Borresen-Dale, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 10869-74., 2001.

Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J Mol Biol.* 98: 503-17., 1975.

Souza, R. F., Appel, R., Yin, J., Wang, S., Smolinski, K. N., Abraham, J. M., Zou, T. T., Shi, Y. Q., Lei, J., Cottrell, J., Cymes, K., Biden, K., Simms, L., Leggett, B., Lynch, P. M., Frazier, M., Powell, S. M., Harpaz, N., Sugimura, H., Young, J. and Meltzer, S. J. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours, *Nat Genet.* 14: 255-7., 1996.

Spruck, C., Strohmaier, H., Watson, M., Smith, A. P., Ryan, A., Krek, T. W. and Reed, S. I. A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1, *Mol Cell.* 7: 639-50., 2001.

Stoesz, S. P., Friedl, A., Haag, J. D., Lindstrom, M. J., Clark, G. M. and Gould, M. N. Heterogeneous expression of the lipocalin NGAL in primary breast cancers, *Int J Cancer.* 79: 565-72., 1998.

Strassburg, C. P., Strassburg, A., Nguyen, N., Li, Q., Manns, M. P. and Tukey, R. H. Regulation and function of family 1 and family 2 UDP- glucuronosyltransferase genes (UGT1A, UGT2B) in human oesophagus, *Biochem J.* 338: 489-98., 1999.

**T**akemasa, I., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Ohue, M., Noura, S., Miyake, Y., Matsumoto, T., Aihara, T., Tomita, N., Tamaki, Y., Sakita, I., Kikkawa, N., Matsuura, N., Shiozaki, H. and Monden, M. Overexpression of CDC25B phosphatase as a novel marker of poor prognosis of human colorectal carcinoma, *Cancer Res.* 60: 3043-50., 2000.

Takemasa, I., Higuchi, H., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Tomita, N., Nakamori, S., Matoba, R., Monden, M. and Matsubara, K. Construction of preferential cDNA microarray specialized for human colorectal carcinoma: molecular sketch of colorectal cancer, *Biochem Biophys Res Commun.* 285: 1244-9., 2001.

Tokumitsu, Y., Mori, M., Tanaka, S., Akazawa, K., Nakano, S. and Niho, Y. Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma, *Int J Oncol.* 15: 687-92., 1999.

Tomasini-Johansson, B. R., Sundberg, C., Lindmark, G., Gailit, J. O. and Rubin, K. Vitronectin in colorectal adenocarcinoma--synthesis by stromal cells in culture, *Exp Cell Res.* 214: 303-12., 1994.

Tortola, S., Capella, G., Marcuello, E., Gunther, K., Aiza, G., Masramon, L., Reymond, M. A. and Peinado, M. A. Analysis of differential gene expression in human colorectal tumor tissues by RNA arbitrarily primed-PCR: a technical assessment, *Lab Invest.* 78: 309-17., 1998.

Tortola, S., Marcuello, E., Risques, R. A., Gonzalez, S., Aiza, G., Capella, G. and Peinado, M. A. Overall deregulation in gene expression as a novel indicator of tumor aggressiveness in colorectal cancer, *Oncogene*. *18*: 4383-7., 1999.

Tseng, L. M., Hsu, C. Y., Wang, H. C., Liu, J. M., Chang, H. M., Lo, S. S., Wu, C. W., Lui, W. Y. and Chi, C. W. Tie-1 tyrosine kinase is an independent prognostic indicator for invasive breast cancer, *Anticancer Res*. *21*: 2163-70., 2001.

Trümper, L. H., Burger, B., von Bonin, F., Hintze, A., von Blohn, G., Pfreundschuh, M. and Daus, H. Diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by polymerase chain reaction from pancreatic secretions, *Br J Cancer*. *70*: 278-84., 1994.

Tsunoda, T., Nakamura, T., Ishimoto, K., Yamaue, H., Tanimura, H., Saijo, N. and Nishio, K. Upregulated expression of angiogenesis genes and down regulation of cell cycle genes in human colorectal cancer tissue determined by cDNA macroarray, *Anticancer Res*. *21*: 137-43., 2001.

**V**an't Veer, L. J. and De Jong, D. The microarray way to tailored cancer treatment, *Nat Med*. *8*: 13-4., 2002.

Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. Serial analysis of gene expression, *Science*. *270*: 484-7., 1995.

Veuger, M. J., Honders, M. W., Landegent, J. E., Willemze, R. and Barge, R. M. High incidence of alternatively spliced forms of deoxycytidine kinase in patients with resistant acute myeloid leukemia, *Blood*. *96*(4):1517-24., 2000.

**W**arrington, J. A., Nair, A., Mahadevappa, M. and Tsyganskaya, M. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes, *Physiol Genomics*. *2*: 143-7., 2000.

Warthin A. S. Hereditary with reference to carcinoma, *Arch Intern Med*. *12*: 546, 1913.

Weiss, J., Schwechheimer, K., Cavenee, W. K., Herlyn, M., Arden, K. C. Mutation and expression of the p53 gene in malignant melanoma cell lines, *Int J Cancer*. *54*(4): 693-9., 1993.

Welsh, J., Chada, K., Dalal, S. S., Cheng, R., Ralph, D. and McClelland, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA, *Nucleic Acids Res*. *20*: 4965-70., 1992.

Wielenga, V. J., van der Voort, R., Taher, T. E., Smit, L., Beuling, E. A. van Krimpen, C., Spaargaren, M., and Pals, S. T. Expression of c-Met and heparan-sulfate proteoglycan forms of CD44 in colorectal cancer, *Am J Pathol*. *157*: 1563-73., 2000.

World Health Organization. The World Health Report 2000.

Wu, C. L., Kirley, S. D., Xiao, H., Chuang, Y., Chung, D. C. and Zukerberg, L. R. Cables enhances cdk2 tyrosine 15 phosphorylation by Wee1, inhibits cell growth, and is lost in many human colon and squamous cancers, *Cancer Res*. *61*: 7325-32., 2001.

**X**ia, X., Cheng, A., Lessor, T., Zhang, Y. and Hamburger, A. W. Ebp1, an ErbB-3 binding protein, interacts with Rb and affects Rb transcriptional regulation, *J Cell Physiol.* 187: 209-17., 2001.

**Y**an, L., Borregaard, N., Kjeldsen, L. and Moses, M. A. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL, *J Biol Chem.* 276: 37258-65., 2001.

Yanagawa, R., Furukawa, Y., Tsunoda, T., Kitahara, O., Kameyama, M., Murata, K., Ishikawa, O. and Nakamura, Y. Genome-wide screening of genes showing altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray, *Neoplasia.* 3: 395-401., 2001.

Yashima, K., Nakamori, S., Murakami, Y., Yamaguchi, A., Hayashi, K., Ishikawa, O., Konishi, Y. and Sekiya, T. Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in the mutation cluster region: comparison of human pancreatic and colorectal cancers, *Int J Cancer.* 59: 43-7., 1994.

Yoo, J. Y., Wang, X. W., Rishi, A. K., Lessor, T., Xia, X. M., Gustafson, T. A. and Hamburger, A. W. Interaction of the PA2G4 (EBP1) protein with ErbB-3 and regulation of this binding by heregulin, *Br J Cancer.* 82: 683-90., 2000.

Yu, Q. and Stamenkovic, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14: 163-76., 2000.

**Z**hang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W. and Arnheim, N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis, *Proc Natl Acad Sci.* 89(13): 5847-51., 1992.

Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. Gene expression profiles in normal and cancer cells, *Science.* 276: 1268-72., 1997.

Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W. H., Tom, E., Mack, D. H. and Levine, A. J. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays, *Genes Dev.* 14: 981-93., 2000.

Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W. L., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R. and Sen, S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation, *Nat Genet.* 20: 189-93., 1998.

Zimmermann, C. R., Orr, W. C., Leclerc, R. F., Barnard, E. C. and Timberlake, W. E. Molecular cloning and selection of genes regulated in *Aspergillus* development, *Cell.* 21: 709-15., 1980.