

Chirurgische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. R. Siewert)

Tumorstadienabhängige Expression der Zielgene des Wnt-Signalweges CA II und OPN, des Mitosekontrollgens MAD2L2 sowie des potentiellen Tumorsuppressorgens SASH1 bei Kolonkarzinomen

Caroline Katharina Rimkus

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. B. Holzmann

2. Priv.-Doz. Dr. M. Speicher,

Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 07.03.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.09.2005 angenommen.

In Dankbarkeit meiner Familie und PDDRTHE gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	6
1.1 Epidemiologie Kolorektaler Karzinome	6
1.2 Karzinogenese kolorektaler Tumore	7
1.2.1 <i>Karzinogenese kolorektaler Tumore nach Fearon und Vogelstein</i>	8
1.2.2 <i>Die Bedeutung des Tumorsuppressorgens APC bei der Entstehung CRC</i> ...	9
1.2.3 <i>Die Bedeutung des Wnt-Signalweges bei der Entstehung CRC</i>	10
1.2.4 <i>Die Bedeutung des Onkogens K-ras bei der Entstehung CRC</i>	15
1.2.5 <i>Die Bedeutung des Tumorsuppressorgens p53 bei der Entstehung CRC</i> ...	15
1.2.6 <i>Die Bedeutung der genetischen Instabilität bei der Entstehung CRC</i>	16
1.2.6.1 <i>Microsatelliteninstabilität</i>	16
1.2.6.2 <i>Chromosomale Instabilität</i>	17
1.3 Molekulargenetische Analysen	18
1.3.1 <i>Ziele und Methoden molekulargenetischer Analysen</i>	18
1.3.2 <i>Zielgene der Genexpressionsanalyse</i>	19
1.3.2.1 <i>OPN</i>	20
1.3.2.2 <i>CA II</i>	20
1.3.2.3 <i>MAD2L2</i>	21
1.3.2.4 <i>SASH1</i>	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Bezugsquellennachweis	24
2.1.1 <i>Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien</i>	24
2.1.2 <i>Geräte</i>	25
2.1.3 <i>Software</i>	25
2.2 Patienten	26
2.3 Follow-up	28
2.4 RNA-Isolierung	28
2.5 Synthese der cDNA aus mRNA.....	29

2.6 Kontrolle der cDNA mit <i>RT-PCR</i>	30
2.7 Agarosegelelektrophorese.....	31
2.8 Semiquantitative Real-time PCR	32
2.9 Primer	32
2.10 Statistische Auswertung	33
2.9.1 <i>Aufbereitung der Daten der quantitativen Real-time PCR</i>	
<i>Genexpressionsanalyse</i>	34
2.9.2 <i>Auswertung der Daten der quantitativen Real-time PCR</i>	
<i>Genexpressionsanalyse</i>	34
3 Ergebnisse.....	35
3.1 Expressionsanalyse der semiquantitativen Real-time PCR.....	35
3.1.1 <i>OPN</i>	35
3.1.2 <i>CA II</i>	39
3.1.3 <i>MAD2L2</i>	41
3.1.4 <i>SASH1</i>	44
3.2 Prognostische Bedeutung der Genexpression	48
3.2.1 <i>Rezidivraten</i>	48
3.2.2 <i>Mortalität</i>	50
3.2.3 <i>Überlebensanalyse</i>	51
4 Diskussion	53
4.1 <i>OPN</i>	54
4.2 <i>CA II</i>	57
4.3 <i>OPN und CA II Coexpression</i>	59
4.4 <i>MAD2L2</i>	60
4.5 <i>SASH1</i>	62

5 Zusammenfassung	63
5.1 OPN	63
5.2 CA II.....	64
5.3 MAD2L2.....	64
5.4 SASH1.....	65
6 Ausblick	65
6.1 Wnt-Zielgene	65
6.1.1 <i>OPN</i>	66
6.1.2 <i>CA II</i>	66
6.2 MAD2L2.....	66
6.3 SASH1.....	66
7 Abkürzungsverzeichnis.....	67
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	69
8.1 Abbildungsverzeichnis	69
8.2 Tabellenverzeichnis	70
9 Literaturverzeichnis	72
10 Danksagung	84

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie kolorektaler Karzinome

In westlichen Ländern stellt das kolorektale Karzinom (CRC) immer noch die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache dar. In Deutschland lag 2003 die Inzidenz bei 35/100000. Auch verbesserte Screeningverfahren und die steigende Teilnahme an Früherkennungsprogrammen konnten die Mortalitätsrate von 25,5/100000 nicht senken. Bei Diagnosestellung sind noch zwei Drittel aller Kolonkarzinome kurativ behandelbar. Der Einsatz verschiedener etablierter multimodaler Therapiekonzepte, bestehend aus radikaler Resektion und neoadjuvanten oder adjuvanten Radiochemotherapieverfahren, trägt zur Verbesserung des Langzeittherapieerfolges bei. Das 5-Jahres Überleben im UICC Stadium I beträgt 98-100%, im Stadium II 75-80%, im Stadium III 59-66%, jedoch im Stadium IV nur noch 12-20%.

Das CRC stellt eines der wohl am intensivsten untersuchten Karzinome dar. Eine in Stadien ablaufende Karzinogenese, die in Verbindung mit definierten molekulargenetischen Veränderungen gebracht werden konnte, macht das CRC zu einer Basis für grundlegende tumorbiologische Forschungsansätze. Mittlerweile gewinnen neue und verbesserte Analyseverfahren, wie die quantitative Real-time PCR und Microarray-Analysen nicht nur für die Aufklärung der Entstehungsmechanismen des CRC, sondern auch zunehmend für die Beantwortung klinischer Fragestellungen an Bedeutung. Genetische Analysen bieten die Möglichkeit, herkömmliche Therapien effektiver einzusetzen und individualisierte Tumorthherapie mit neuen Behandlungsstrategien zu entwickeln. Darüber hinaus gewinnt man mit Hilfe dieser molekulargenetischen Analysen ein besseres Verständnis über tumorbiologische Prozesse im Rahmen der Karzinogenese.

1.2 Karzinogenese kolorektaler Tumore

Im Rahmen der Karzinogenese erwirbt ein Tumor viele genetische Veränderungen, die die Differenzierung des normalen Epithels in eine zunächst benigne proliferative Form, über die Dysplasie bis hin zum Karzinom vorantreiben.

Bisher ging man davon aus, dass das zentrale molekulargenetische Element für die Entstehung von Tumoren das Zusammenspiel von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen darstellt.

Der Einteilung in Onkogene und Tumorsuppressorgenen wird in letzter Zeit die Klassifizierung in „caretaker“ und „gatekeeper“ Gene gegenübergestellt. Gene, die die Rate neugebildeter oder apoptotischer Zellen bestimmen, werden als „gatekeeper“-Gene bezeichnet. Akkumulieren genetische Mutationen, so wird die Tumordissemination und Metastasierung gefördert. Verantwortlich sind „caretaker“-Gene, die die Rate der Mutationen der zuvor beschriebenen Gene kontrollieren und so zur genetischen Instabilität beitragen. Genetische Instabilität aufgrund von Mutationen von DNA-Reparaturgenen spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung kolorektaler Karzinome.

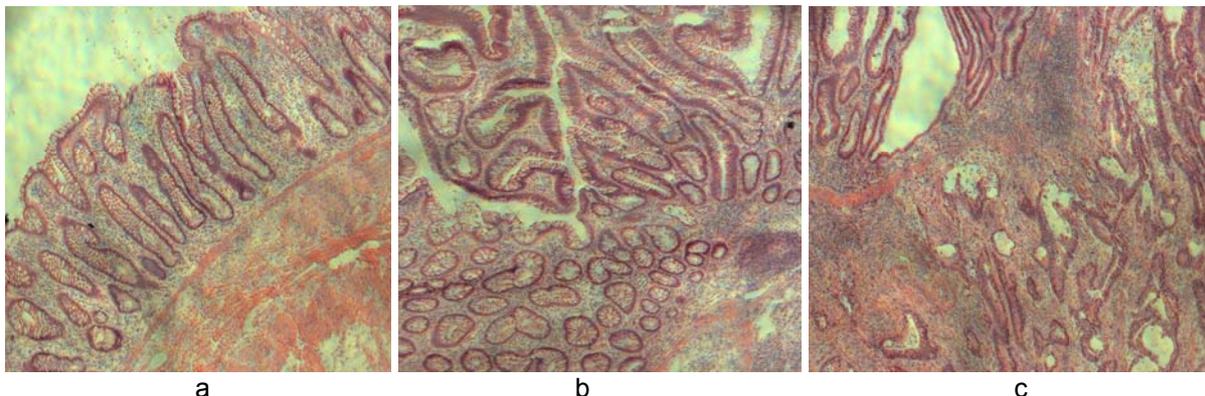


Abbildung 1: Histologie HE-Färbung (5-fach vergrößert)
a.) Kolonnormalschleimhaut b.) Adenom c.) Karzinom

1.2.1 Karzinogenese kolorektaler Tumore nach Fearon und Vogelstein

Fearon und Vogelstein etablierten das Konzept der stufenweisen Entstehung kolorektaler Karzinome und konnten stadienabhängig, angefangen bei sehr frühen Tumorformen, Gene zuordnen, die in ihrer Funktion als Tumorsuppressoren, -promotoren und -modulatoren zur Entstehung und zur Progression kolorektaler Karzinome beitragen (Fearon und Vogelstein, 1990). Solche genetischen Veränderungen zeigten sich nicht nur beim hereditären CRC, das circa 10% aller kolorektalen Karzinome ausmacht, sondern ließen sich auch in sporadisch entstandenen Tumoren nachweisen.

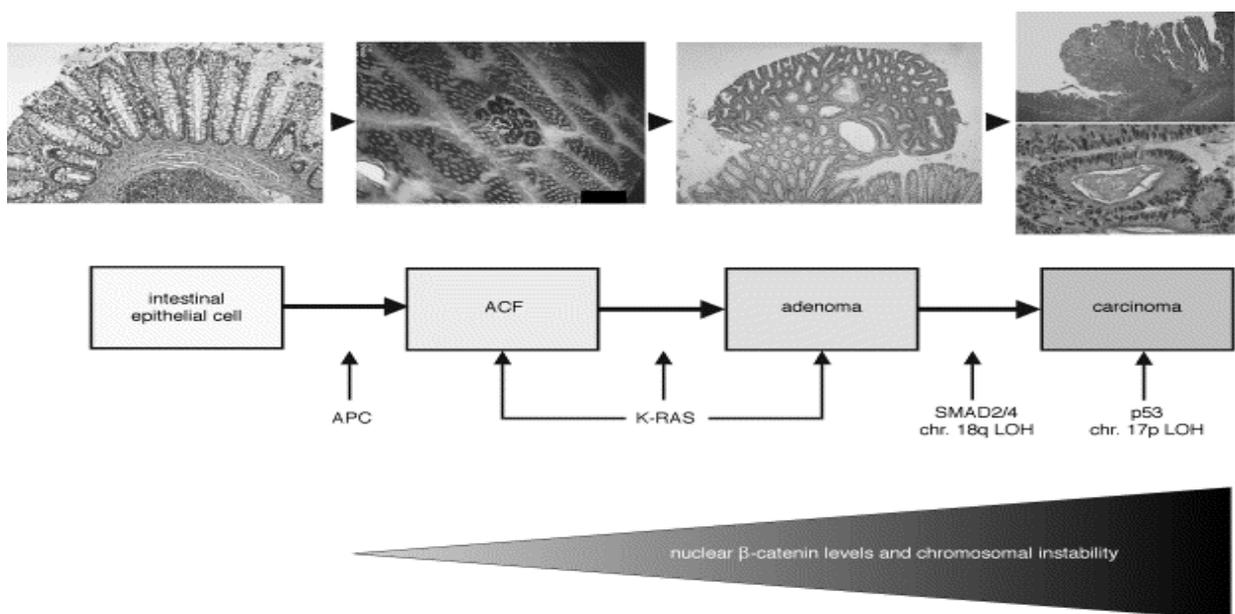


Abbildung 2: Adenom-Karzinomsequenz nach Fearon und Vogelstein

1.2.2 Die Bedeutung des Tumorsuppressorgens APC bei der Entstehung CRC

APC (adenomatous polyposis coli) ist ein Protein, das zahlreiche Interaktionen mit verschiedenen Proteinen eingehen kann und an zentraler Stelle des Wnt-Signalweges steht.

Normale Epithelzellen des Kolons sind in einen permanenten Differenzierungsprozeß eingebunden, bei dem die Zellen innerhalb von 20 Stunden von der Kryptenbasis bis an die Spitze wandern. Dort angelangt wird ein Apoptoseprozeß eingeleitet, der eine Abschilferung des Epithels bewirkt. Die Expression des APC Proteins, welches sich an der basolateralen Membran kolorektaler Epithelzellen befindet, leitet unter anderem die Apoptose ein (Morin et al., 1996). Liegt eine APC Mutation vor, erhält die Zelle kein Apoptose-auslösendes Signal und verbleibt im epithelialen Verband. Die Zelldifferenzierung ist zu Gunsten der Proliferation verschoben und das Voranschreiten eines möglichen neoplastischen Prozesses begünstigt. Die Tumorpromotion wird durch die Mitwirkung von APC bei der Zellmigration und Zelladhäsion vor allem aber über die Interaktion von APC mit dem E-Cadherin- β -Catenin-Komplex sowie über die Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signales unterstützt. In wie weit eine Mutation des APC Gens auch negativ modulierend in die Expression von Wnt-Zielgene einwirkt, wird an anderer Stelle erläutert.

Im Zusammenhang mit Zelladhäsion und Zellmigration bindet APC an Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchanging factor), wodurch die Interaktion mit Rac verstärkt wird. Dies moduliert das Zytoskelett und beeinflusst die Zelladhäsion und – motilität (Kawasaki et al., 2000). APC greift regulierend über direkte Mikrotubulibindung und Stabilisierung der Mikrotubulienden in den Zellzyklus ein (Zumbrunn et al., 2001). Über Bindung an das Mikrotubulibindungsprotein EB1, das für die APC vermittelte Bindung der Mikrotubuli an die chromosomalen Kinetochore

verantwortlich ist, nimmt APC zudem an der exakten Chromosomenteilung innerhalb der Mitose regulatorisch teil (Kaplan et al., 2001; Fodde et al., 2001).

In CRC treten Mutationen des auf Chromosom 5q gelegene Tumorsuppressorgens APC in hereditär sowie in 60-80% aller sporadisch entstandenen Tumoren auf. So zeigten sich APC Mutationen bei FAP Patienten (familiäre adenomatöse Polypose) als Ursache des hereditären Krankheitsbildes (Grodin et al., 1991; Nishisho et al., 1991; Kinzler et al., 1991). In sporadisch entstandenen Tumore ließ sich schon in den frühesten morphologisch nachweisbaren Tumovorläuferstadien, den aberranten Krypten (ACF, aberrant crypt foci), eine Inaktivierung beider Allele des APC Gens nachweisen (Jen et al., 1994; Luongo et al., 1994). So stellt die Inaktivierung des APC Wildtyp-Allels eine der frühesten genetischen Veränderungen während der Entstehung von Tumoren dar.

1.2.3 Die Bedeutung des Wnt-Signalweges bei der Entstehung kolorektaler Karzinome

Anlehnend an das von Fearon und Vogelstein etablierte Konzept konnten mit Hilfe molekulargenetischer Analysen unterschiedlicher Tumorstadien weitere Gene und Signalwege identifiziert werden, die die Entstehung von kolorektalen Karzinomen begünstigen.

Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Progression kolorektaler Karzinome spielt der Wnt-Signalweg (Thorstensen L and Lothe RA). In nahezu 90% aller CRC weist dieser aus vielen Komponenten und Mechanismen aufgebaute Signalweg eine veränderte Aktivierung auf.

Das zentrale Protein innerhalb dieses Signalweges stellt β -Catenin dar. β -Catenin war zunächst nur als ein Cadherin-bindendes Protein beschrieben und funktionell durch Bindung an E-Cadherin der Zelladhäsion zugeordnet. E-Cadherin, ein

Kalzium-abhängiges Zelladhäsionsprotein, bindet membranassoziiertes β -Catenin (Huber and Weis, 2001; Hulsken et al., 1994; Willert and Nusse, 1998). Eine Veränderung des intrazellulären E-Cadherin-Catenin-Komplexes bewirkt den Verlust der Zelladhäsion. Wird E-Cadherin unterexprimiert, so wird durch den Verlust der Zell-Zell-Bindung die lokale Tumorausdehnung sowie die Formation von Metastasen unterstützt (Efsthathiou et al., 1999; Takeichi et al., 1993).

Die tragende Rolle bei der Entstehung des CRC erlangt β -Catenin jedoch über seine Regulation innerhalb des Wnt-Signalweges. In normalen Kolonepithelzellen wird unter physiologischen Bedingungen der Wnt-Signalweg reprimiert und es kommt zu einer Phosphorylierung von β -Catenin. Nur phosphoryliertes β -Catenin kann im Zytosol durch das Proteasom degradiert werden. Treten jedoch in Tumorzellen Mutationen im Multiproteinkomplex des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auf, wie z. B. in den Genen CTNNB1, APC, Axin oder GSK-3 β (Glykogen Synthase Kinase 3 β), wird die Phosphorylierung von β -Catenin verhindert. Nicht-phosphoryliertes β -Catenin akkumuliert im Zytosol und wird in den Nukleus transloziert. Im Zellkern erfolgt die Bindung an die Transkriptionsfaktoren Tcf (T-cell factor) und Lef (lymphoid enhancer factor), welche die Transkription von Wnt-Zielgenen auslösen (Morin et al., 1996b; Amit et al., 2002; Behrens et al., 1998; Fraser et al., 2002; Liu et al., 2002; Manoukian and Woodgett, 2002). Durch Bindung an Transkriptionsrepressoren, wie z. B. Groucho, können andere Zielgene auch negativ reguliert werden (Roose et al., 1998; Cavallo et al., 1998).

Mittlerweile konnte eine Vielzahl von Wnt-Zielgenen identifiziert werden, die bereits die Entstehung von Adenomen begünstigen und zur Tumorprogression beitragen.

Nachfolgend findet sich eine Aufstellung der positiv sowie negativ regulierten Wnt-Zielgene, die in der Literatur für CRC beschrieben wurden:

In CRC findet man c-myc, Cyclin D1, uPAR, matrix metalloproteinase MMP-7, Axin-2, Nr-CAM, Gastrin, CD44, claudin-1 sowie Osteopontin hochreguliert (He et al., 1998; Tetsu and McCormick 1999; Shtutman et al, 1999; Mann et al., 1999; Brabletz et al., 1999; Crawford et al., 1999; Yan et al., 2001; Lustig et al., 2002; Conacci-Sorrell et al., 2002; Koh et al., 2000; Wielenga et al., 1999; Miwa et al., 2000; Ding et al, 2002; Coppola et al., 2004).

Die Wnt-Zielgene CEA related 1, FABP 1, Galactin 2, Kruppel-like factor 4 und Carbonic Anhydrase II zeigten sich unterexprimiert (Lawrie et al., 2004; Stone et al., 2002).

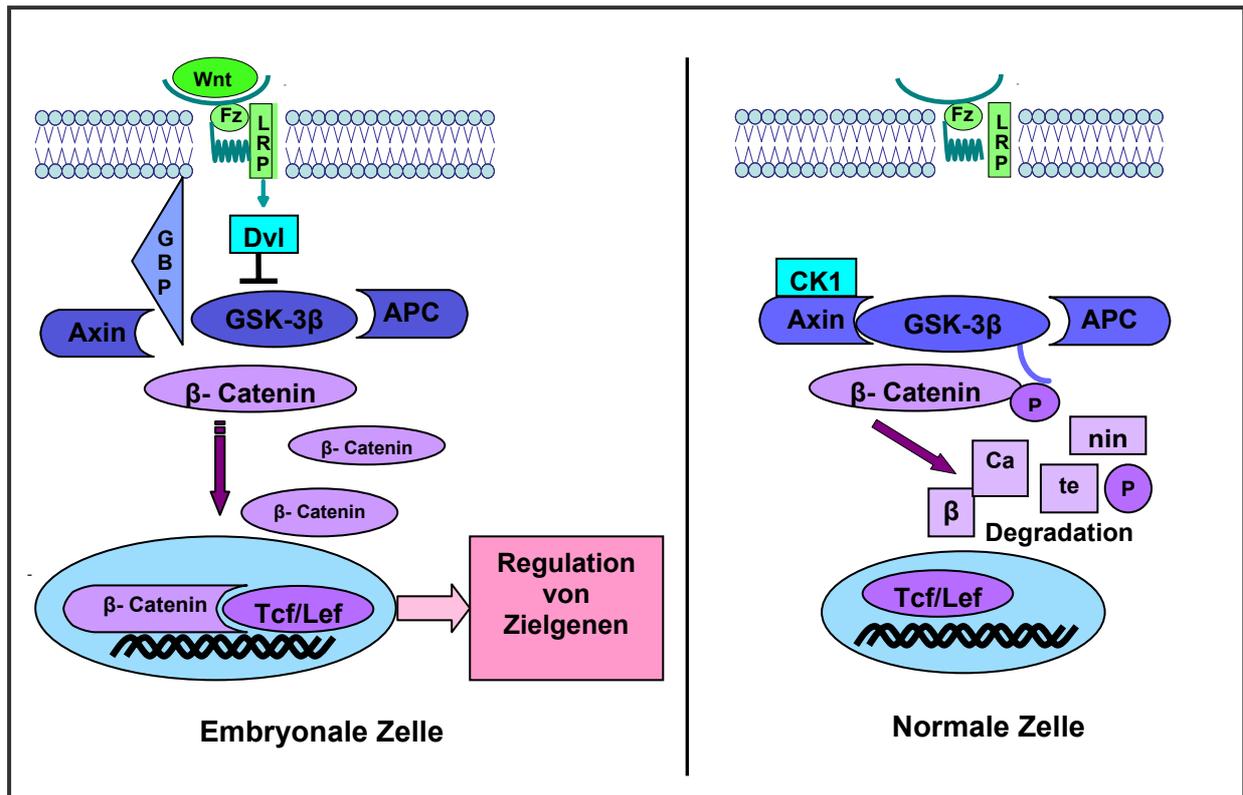


Abbildung 3: Wnt-Signalweg in der Embryonalphase:

Durch Bindung von Wnt-Liganden (Wingless-type MMTV interaction site family member) an den Fz/LRP-Rezeptor (Frizzled/Low density lipoprotein receptor related protein) wird Dvl (Dishevelled) aktiviert. Dadurch wird die Aktivierung des Multiprotein-Komplexes über Bindung von Dvl an GBP (GSK 3 β binding protein) gehemmt. Axin kann keinen Komplex mit GSK-3 β (Glykogen Synthase Kinase 3 β) eingehen, es findet keine Phosphorylierung von β -Catenin über GSK-3 β statt. Nicht-phosphoryliertes β -Catenin akkumuliert im Zytosol und kann nicht über das Proteasom degradiert werden. β -Catenin wird in den Nucleus transloziert und bindet dort die Transkriptionsfaktoren Tcf (T-cell factor) und Lef (lymphoid enhancing factor). Im Weiteren erfolgt die Regulation von Wnt-Zielgenen.

Wnt-Signalweg in normalen Zellen:

Ohne Wnt-Ligand wird CK1 (Casein Kinase 1) durch Axin zum Multiprotein-Komplex rekrutiert und damit die Phosphorylierung von β -Catenin angeregt. GSK-3 β phosphoryliert APC und Axin, welches die Interaktion von APC mit β -Catenin stärkt. Das CK1-Priming aktiviert die Phosphorylierung von β -Catenin über GSK-3 β . Phosphoryliertes β -Catenin wird von den F-Box Protein β -TrCP erkannt und durch das Proteasom degradiert.

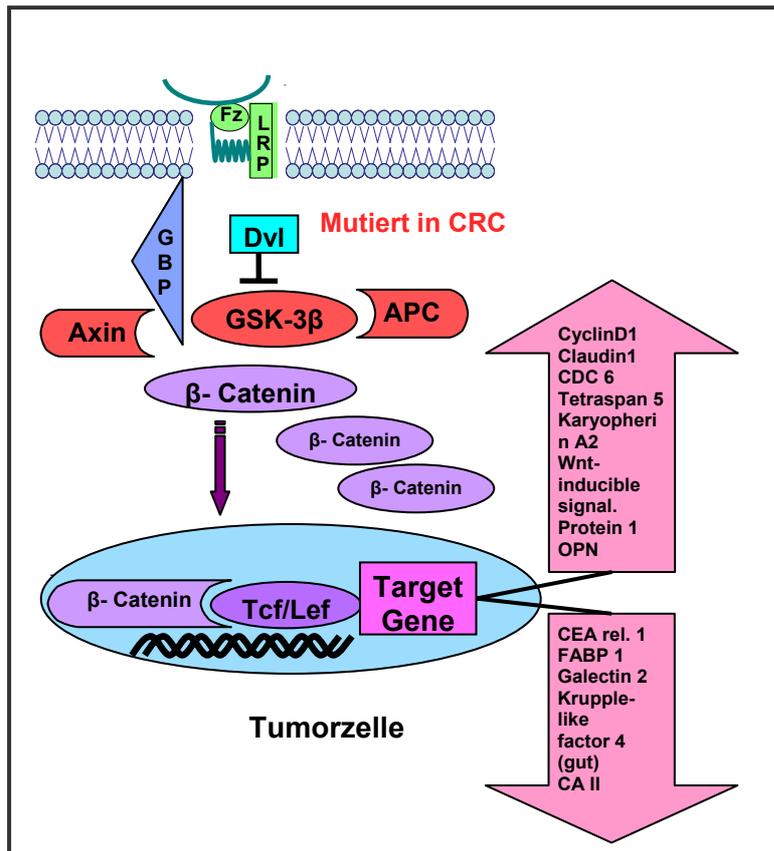


Abbildung 4: Wnt-Signalweg in Tumorzellen:

In Tumorzellen erfolgt die Aktivierung des Wnt-Signalweges in Abwesenheit eines Wnt-Liganden. Tumorzellen weisen Mutationen innerhalb des Multiproteinkomplexes auf (rot dargestellt). Durch das gestörte Zusammenspiel innerhalb des Multiproteinkomplexes kann β -Catenin nicht phosphoryliert werden. Nicht-phosphoryliertes β -Catenin akkumuliert im Zytosol und kann nicht über das Proteasom degradiert werden. β -Catenin wird in den Nucleus transloziert und bindet dort die Transkriptionsfaktoren Tcf und Lef. Im Weiteren erfolgt die Regulation von Wnt-Zielgenen.

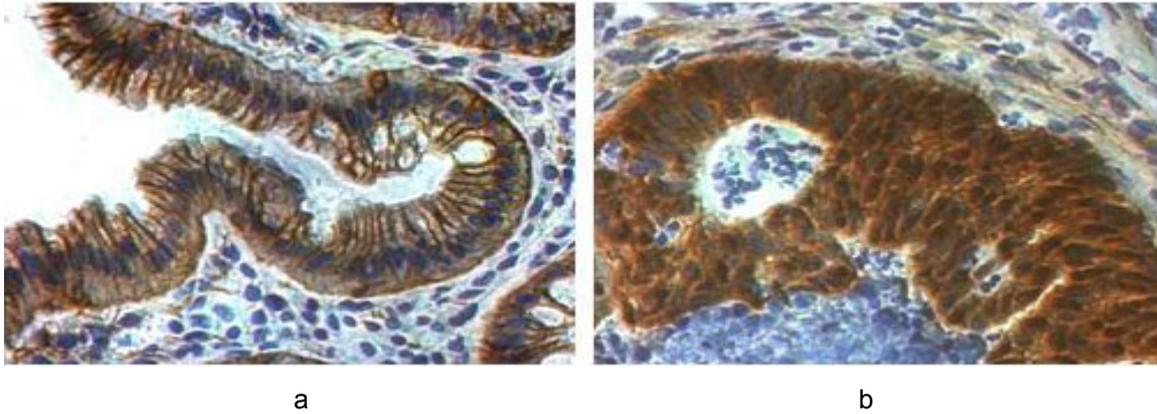


Abbildung 5: Immunhistologie β -Catenin/H (40-fach vergrößert)
a.) Normalschleimhaut b.) Karzinom

1.2.4 Die Bedeutung des Onkogens K-ras bei der Entstehung CRC

Bei der Tumorinitiation ist das Onkogen K-ras involviert (Janssen et al., 2002; Janssen, 2003; Tuveson et al., 2004). In 50 % aller Adenome, die größer als 1 cm sind sowie in 50% aller Karzinome wurde eine Mutation von K-ras gefunden (Vogelstein B and Kinzler KW, 1998; Bos et al., 1987; Forrester et al., 1987; Fearon and Vogelstein, 1990). Das K-ras Onkogen codiert ein den G-Proteinen homologes Protein, welches nach der Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität aktiviert wird und GTP bindet. K-ras liegt nun in der aktivierten Form vor, und kann nachgeordnete Signalwege aktivieren, z.B MAPK, die die Zellteilung und Apoptose regulieren. Liegt in einer Zelle eine Ras-Mutation vor, kann GTP nicht mehr hydrolysiert werden. Es kommt zu einer Daueraktivierung und zur Proliferation der Zelle.

1.2.5 Bedeutung des Tumorsuppressorgens p53 bei der Entstehung CRC

Eines der meist untersuchten Gene bei der Entstehung von Tumoren stellt das Tumorsuppressorgen p53 auf Chromosom 17q dar. Zellstreß wie DNA-Schäden, Hypoxie, Onkogenaktivierung, Verlust von Zellwachstums- und

Zellüberlebenssignalen aktiviert über verschiedene Signalwege die Expression von p53. p53 wird phosphoryliert, dadurch stabilisiert und akkumuliert im Nukleus. Als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor reguliert p53 die Expression von Genen, die in verschiedene Zellprozesse eingebunden sind, um das Wachstum der veränderten Zellen zu verhindern, DNA-Schäden zu reparieren oder Apoptoseprozesse einzuleiten (Meek, 2004; Gotz et Montenarh, 1996; Bates and Vousden, 1996; El-Deiry, 1998).

Gerade in der späten Phase der Tumorentstehung wirkt p53 als Tumorsuppressorgen auf das Tumorstadium ein. In ca. 80 % aller CRC sind p53 Mutationen nachweisbar (Baker et al., 1990). p53 mutierte Tumorzellen erlangen einen Wachstumsvorteil gegenüber nicht mutierten Zellen, da ihnen zum einen die Möglichkeit zur Zellzyklusblockade fehlt, um DNA-Reparaturprozesse einzuleiten, und zum anderen die Fähigkeit verloren geht, die Apoptose der veränderten Zelle einzuleiten. Darüber hinaus wird die Mutationsrate in p53 mutierten Zellen gesteigert. Das maligne Potential der Zellen nimmt zu.

1.2.6 Die Bedeutung der genetischen Instabilität bei der Entstehung CRC

In verschiedenen Phasen der Karzinogenese spielt bei der Tumorprogression genetische Instabilität eine entscheidende Rolle. Eine Erhöhung der Mutationsrate, Mutationen von DNA-Reparaturgenen, chromosomales Rearrangement und eine Veränderung der Chromosomenzahl tragen zur genetischen Instabilität bei.

1.2.6.1 Mikrosatelliteninstabilität

Eine der zwei Hauptformen stellt die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) dar. Mikrosatelliten sind Wiederholungen von meist nicht protein-kodierenden Sequenzfolgen, verteilt auf das menschliche Genom. Dabei bleibt die Basenlänge

dieser Marker konstant, die Anzahl der Wiederholungen an einem bestimmten Locus variiert jedoch individuell. Man spricht dabei von einem Polymorphismus.

Bei der erblichen Form des CRC, mit einem Anteil von 10% an allen CRC, spielt besonders die HNPCC (Hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinome) eine wichtige Rolle. Ursächlich liegt eine Keimbahnmutation der Mismatch-Repair-Genen MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2 vor (Bronner et al., 1994; Fishel et al., 1993; Kinzler and Vogelstein, 1996). Dadurch können DNA-Schäden nicht mehr adäquat behoben werden, die Mutation weiterer Gene ist die Folge. Mutationsanfällig sind besonders diejenigen Gene, die aus kurzen sich wiederholenden Mononukleotiden aufgebaut sind. Die Analyse von Mikrosatellitenmarkern dient dabei als Screening-Verfahren, um diejenigen Patienten zu identifizieren, die durch genetische Prädisposition weitere Tumore entwickeln werden, um sie in ein engeres Überwachungssystem einzubinden (Marra and Boland, 1995).

1.2.6.2 Chromosomale Instabilität

Chromosomale Instabilität (CIN) stellt die zweite Form der genetischen Instabilität dar. Darunter versteht man numerische und strukturelle Chromosomen-Aberrationen in Form von chromosomaler Amplifikation, Translokation und Deletion. Die molekularen Ursachen sind unklar, vermutet werden Veränderungen der Kontrollmechanismen im Zellzyklus, wie z. B. MAD2L2 Mutationen.

1.3 Molekulargenetische Analysen

1.3.1 Ziele und Methoden molekulargenetischer Analysen

Trotz verbesserter Screening-Verfahren zur Früherkennung des CRC, ist das CRC immer noch die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache. Mit Hilfe von diagnostischen und prognostischen Tumormarkern kann die Therapie des CRC zwar entsprechend dem Tumorstadium ausgerichtet werden, eine kurative Therapiedurchführung ist meist nur in frühen Tumorstadien möglich. Darüber hinaus konnten verschiedene Studien zeigen, dass nur wenige Patienten auf zusätzliche Therapien ansprechen (Rothenberg, 2004; Cassidy et al., 2004; O'Connell, 2001). Genetische Veränderungen tragen nicht nur zur Tumorinitiation, -progression und Metastasierung bei, sondern sind auch für das Ansprechen bzw. Nichtansprechen adjuvanter Therapien verantwortlich (Bush and Li, 2002; Ribic et al., 2003). Die individuelle genetische Ausstattung eines Tumors bestimmt maßgebend sein Verhalten. Gelingt es, diese genetischen Unterschiede der einzelnen Tumore zu analysieren, könnten neue diagnostische und prognostische Marker zur Verfügung stehen, die nicht nur das Rezidivrisiko eines Tumors, sondern auch das Ansprechen adjuvanter Therapien vorhersagbar machen.

Die Microarraytechnologie stellt eine relativ einfache und effektive Methode dar, diese Unterschiede zu erkennen, um ein individuelles Tumorprofil erstellen zu können. Dabei kann die Expression tausender Gene gleichzeitig analysiert werden. Dazu stehen zum einen Genchips mit genspezifischen Sonden, bestehend aus 500-5000 Basenpaare langen cDNA-Fragmenten, oder aus 25-80 Basenpaare langen Oligonukleotiden, zur Verfügung. Die Analyse und Aufbereitung der gewonnenen Daten bietet viele Möglichkeiten und bedarf äußerster Sorgfalt. Zusätzlich sollte eine weitere Methode diese Daten bestätigen. Dies kann zum Beispiel über eine

quantitative Real-time PCR-Analyse erfolgen. Diese Methode ermöglicht die Quantifizierung der Genexpression für jeweils ein ausgewähltes Transkript.

1.3.2 Zielgene der Genexpressionsanalyse

In Vorarbeiten wurden Microarrayanalysen an 25 CRC unterschiedlicher Tumorstadien im Vergleich zu Kolonnormalgewebe durchgeführt (Friederichs et al., 2004, Manuskript angenommen zur Veröffentlichung). Dabei zeigten sich regulatorische Komponenten des Wnt-Signalweges sowie Gene, die über den Wnt-Signalweg transkriptionel reguliert werden, verändert exprimiert. Die Microarrayanalysen gaben auch indirekte Hinweise auf das Vorliegen von chromosomaler Instabilität bei der Entstehung von CRC. Ein Gen, welches zur chromosomalen Instabilität beiträgt, ist das Mitosekontrollgen MAD2L2. Dieses Gen wurde überexprimiert in den Microarrayanalysen gefunden. Das am stärksten hochregulierte Wnt-Zielgen Osteopontin (OPN), das am stärksten herabregulierte Wnt-Zielgen Carbonic anhydrase II (CA II) sowie das Mitosekontrollgen MAD2L2 wurden ausgewählt, um die Microarray-Ergebnisse mittels quantitativer Real-time PCR mit dem Fluoreszenzfarbstoff SyBr®Green (Applied Biosystems) zu validieren. Zudem wurde versucht, die Expression dieser Gene anhand eines erweiterten Kollektivs von Kolontumoren unterschiedlicher Stadien zu quantifizieren, um tumorbiologische Prozesse ableiten zu können und hinsichtlich prognostischer Bedeutung zu beurteilen.

Neben den bereits etablierten Tumormarkern wie OPN und CA II wurde zusätzliches Augenmerk bei der quantitativen Expressionsanalyse auf das neuartige Tumorsuppressorgen SASH1 gelegt, welches bisher in Verbindung mit der Entstehung von Mammakarzinomen gebracht wurde (Zeller et., 2003).

1.3.2.1 Osteopontin

Osteopontin (OPN) ist ein Zielgen des Wnt-Signalweges. Es ist ein sekretorisches Glycophosphoprotein und ist Bestandteil der extrazellulären Matrix sowie der Matrix mineralisierter Gewebe. OPN ist aufgrund seiner vielfältigen Funktionen in verschiedene pathologische Prozesse eingebunden und in die Tumorgenese und Metastasierung involviert.

Auf der einen Seite wirkt OPN als Schlüsselzytokin regulierend auf die Entzündungs- und Reparaturprozesse von Geweben ein, und ist an der Entstehung der rheumatoiden Arthritis beteiligt (Ohshima et al., 2002; Petrow et al., 2000). Als Zytokin ist OPN eingebettet in die zelluläre Immunantwort und aktiviert die zellvermittelte sowie granulozytäre Entzündungsreaktion (O'Regan and Berman, 2000). Auf der anderen Seite stellt OPN ein wichtiges Knochenmatrixprotein dar, welches die Adhäsion von Osteoklasten vermittelt und so zur Knochenresorption beiträgt und bei der Entstehung von Osteoporose beteiligt ist (Yoshitake et al., 1999). Innerhalb der Tumorgenese ist OPN eingebunden in unterschiedliche Signalwege, die das Wachstum von Tumoren fördern, die Tumorprogression vorantreiben und am Metastasierungsprozeß beteiligt sind. OPN wird nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von Makrophagen und Lymphozyten des tumorumgebenden Gewebes sezerniert. Zudem kann OPN im Blutserum nachgewiesen werden.

1.3.2.2 Carbonic anhydrase II

Carbonic anhydrase II (CA II) stellt eines der 14 Isoenzyme der CA dar und ist im Zytosol lokalisiert. Es wird von nahezu allen Zellen und Geweben gebildet. Die CAs des Gastrointestinaltraktes werden unterschiedlich entlang der verschiedenen intestinalen Segmente, der Krypten und Villi in den Enterozyten exprimiert. Die CA II ist eingebettet in eine Reihe physiologischer und pathologischer Prozesse. Dabei

besteht die Hauptaufgabe in der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes, der Respiration sowie des Ionentransportes nahezu aller Organe (Sly and Hu, 1995a; Parkkila and Parkkila, 1996; Henry et al. 1986; Chiang et al., 2001; Crandall and O`Brasky, 1978; Ryan et al., 1982; Fleming et al., 1994; Sly and Hu 1995b). CA II spielt zudem eine wichtige Rolle im Hirnmetabolismus, der Urae- und Glykoneogenese, wie auch in der Fettsäure- und Aminosäurensynthese (Chegwidden et al., 2002; Sly et al., 1983; Dodgson et al., 1984; Hausinger and Gerok, 1985; Sly and Hu, 1995b).

Den Intestinaltrakt betreffend fördert CA II die H₂O- und NaCl-Absorption durch elektroneutrale (proximales Kolon) und elektrogenerische (distales Kolon) Prozesse und hat einen entscheidenden Einfluß auf die Regulation intestinaler Sekrete und des luminalen und zytosolischen pH-Wertes (Rajendran and Binder, 2002; Kivela et al., 2001; Kunzelmann and Mall, 2002; Parkkila et al., 1994; Greger et al., 1997; Sterling et al. 2001; Li et al., 2002).

Die genauen Ursachen für den Zusammenhang zwischen CA II Aktivität und der Karzinogenese sind noch nicht geklärt, können aber mit dem pH-homöostatischen Effekt der CA II in Verbindung gesehen werden.

1.3.2.3 MAD2L2

Neben diesen beiden Genen, die durch den Wnt-Signalweg reguliert werden, sollte auch ein Wnt-unabhängiges Gen in dieser Arbeit untersucht werden.

MAD2L2 (Mitotic arrest-deficient homolog-like 2) trägt eine potentielle Mitosekontrollfunktion und wurde ebenfalls in der Transkriptomstudie identifiziert, und überexprimiert in CRC im Vergleich zur Kolonnormalschleimhaut gefunden. Die beiden humanen Gene MAD2L1 und MAD2L2 sind Hauptkomponenten der

mitotischen Zellzykluskontrolle, eine Verbindung mit der Entstehung von CRC wurde vermutet (Cahill et al., 1999).

Studien an MAD2 (Mitotic arrest-deficient 2), dem orthologen Gen in Hefen, konnten zeigen, dass durch Aktivierung der Mitosekontrollpunkte das Voranschreiten der Anaphase gehemmt wird, indem die Chromosomentrennung verzögert wird (Li and Murray, 1991; Harwick et al., 1996; Guacci et al., 1994). Während dieser Blockade können Fehler, die bei der Ausbildung der Spindelstruktur oder bei der Aufreihung der Chromosome entstehen, beseitigt werden, um eine exakte Zellteilung zu ermöglichen. Damit wird in der Zelle sichergestellt, dass während der Zellteilung auch alle Chromosomen aufgetrennt werden, und kein Chromosom zurückbleibt. Ist Mad2B an Cdh1 gebunden, so induziert es eine Zellzyklusblockade über die Inhibition des „anaphase promoting complex“ (Li et al., 1997; Pfleger et al., 2001). Dieser Komplex ist während der Bindung an Cdh1 in der späten Mitosephase und während der G1-Phase aktiv (Fang et al., 1998a, b). Die Überexpression von MAD2L2 in Hefen aktiviert den Mitosekontrollpunkt und bewirkt einen Zellzyklusstop beim Übertritt der Zelle von der Meta- in die Anaphase (He et al., 1997).

Mutationen in Zellzykluskontrollgenen treten häufig in humanen Tumoren auf, wohingegen Mutationen des MAD2 Gens sehr selten beobachtet werden (Cahill et al., 1998; Takahashi et al., 1999; Wang et al., 2002; Hernando et al., 2001; Percy et al., 2000; Gemma et al., 2001; Imai et al., 1999).

1.3.2.4 SASH1

Die chromosomale Region 6q23-25 ist eine genetisch empfindliche Region vieler solider Tumore und beinhaltet einige Gene, denen eine Rolle als Tumorsuppressoren zugeschrieben wird (Huang et al., 2000; Stallmach et al., 2002; Trikkonen et al., 1998). LOH-Analysen und Expressionsanalysen bei sporadischen und hereditären

Mammakarzinomen identifizierten unterexprimierte Gene auf Chromosom 6q23-25. Dabei fiel besonders ein LOH im Bereich des Microsatellitenmarkers D6S311 auf, der mit einem schlechteren Überleben der Mammakarzinompatienten korreliert war. Durch die weitere Analyse der dazugehörigen Gensequenz wurde das neuartige Tumorsuppressorgen SASH1 (SAM and SH3 domain containing1) im Bereich 6q24.3 entdeckt. SASH1 ist aus 20 Exons aufgebaut und kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 140kDa. Das SASH1 Protein beinhaltet zwei SAM (sterile α module) Domänen, eine SH3 (Src homology domain 3) Domäne sowie einen prolinreichen Abschnitt. Damit zählt SASH1 zur SLY-Familie von Signaladapterproteinen (Beer et al., 2001). Es konnten 2 SASH1 Transkripte identifiziert werden, eines 4,4 kb, das andere 7,5 kb umfassend, welche in Brust-, Lungen-, Schilddrüsen-, Milz-, Plazenta-, und Thymusgewebe wiedergefunden wurden. RT-PCR-Analysen identifizierten bei 9 von 15 Mammakarzinomen eine Herabregulation von SASH1. In 37 von 50 (74%) Mammakarzinomen, in 19 von 21 (90%) Lungentumoren, in 5 von 6 (83%) Schilddrüsenkarzinomen und in einigen CRC wurde eine Unterexpression von SASH1 gefunden. Da bisher noch keine funktionell relevanten Mutationen im SASH1 Gen gefunden wurden, geht man davon aus, dass die Herabregulation von SASH1 über die Methylierung der Promotorregion verursacht wird (Zeller et al., 2003). Im Tiermodell zeigte sich in Vorarbeiten bei pVill-K-rasV12G Mäusen in 2/7 Darmtumoren (29%) ein LOH (loss of heterocycosity) von SASH1 (Eigene unveröffentlichte Beobachtung).

Mit quantitativer Real-time PCR sollte hier die Rolle von SASH1 bei der Entstehung von CRC tumorstadienabhängig untersucht, und das Expressionsniveau hinsichtlich einer prognostischen Bedeutung bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Agarose	Invitrogen,
DNA-Standard	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
dNTP	Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH &Co, Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Eisessig	Merck KG, Darmstadt
Microlance Injektionskanülen	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
M-MLV-RT	Promega, Mannheim, Deutschland Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Orange G	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Random Primer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RNasin®RNase Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR-Primer	metabion GmbH, Martinsried, Deutschland
Pufferlösung cDNA-Synthese	Promega, Mannheim, Deutschland
SyBr®Green	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TAE-Puffer	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tris	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

2.1.2 Geräte

Applied Biosystems PRISM®7700 Sequenze Detection System 1.6.3	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Biofuge 13	Heraeus®Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Biometra®T13 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Nanodrop® Photometer	Nanodrop®Technologies, Montchanin, DE, USA
UV-Illuminator Systems	BioRad, München, Deutschland

2.1.3 Software

SPSS 12.0	SPSS GmbH Software, München, Deutschland
GraphPad PRISM® Version 4	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Deutschland

2.2 Patienten

Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste 117 Patienten mit einem Kolonkarzinom sowie 10 Normalschleimhautgewebeproben. Zum Einschluss wurden die Kriterien Erkrankungszeitraum 1994-1997, kein Zweitkarzinom in der Vorgeschichte des Patienten, kein multizentrisches Auftreten des Karzinoms, keine neoadjuvante Vorbehandlung, lokale R0-Resektion sowie ein länger als 3 Monate andauerndes postoperatives Überleben festgelegt. Das Alter der Patienten betrug im Durchschnitt 64 Jahre (23; 94). Die 71 Männer waren zum Zeitpunkt durchschnittlich 62 Jahre alt (23; 84), die 46 Frauen 66 Jahre (41; 92). Die 127 resezierten Gewebeproben wurden von der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikum rechts der Isar, München, bereitgestellt. Eine schriftliche Einwilligung der Patienten zur Verwendung der Gewebeproben zu Forschungszwecken liegt vor. Die Bestimmung des histologischen Typs, des pathologischen Tumorstadiums sowie die Einteilung der TNM-Klassifikation erfolgten anhand der UICC Kriterien durch einen erfahrenen Pathologen. Nach der Tumorresektion wurden die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das UICC Stadium I umfasste 12 Patienten (10%), das UICC Stadium II 48 Patienten (41%), das UICC Stadium III 24 Patienten (21%) und das UICC Stadium IV 33 Patienten (28%). Die histopathologische Beurteilung ergab 103 Adenokarzinome (88%), 9 muzinöse Adenokarzinome (8%), 1 Siegelringzellkarzinom (1%), 3 undifferenzierte Karzinome sowie ein adenosquamöses Karzinom (1%). Der Differenzierungsstatus der Tumore betrug bei 3 Patienten (3%) G1, bei 75 Patienten (64%) G2, bei 36 Patienten (31%) G3 und bei 3 Patienten (3%) G4. Bei 23 Patienten (20%) zeigte sich peritumoral, bei einem Patienten (1%) im Bereich des Fettgewebes und bei 7 Patienten (6%) peritumoral sowie im Fettgewebe eine Lymphangiosis.

Aufgrund der unterschiedlichen Tumorlokalisation (Tabelle 1), wurden unterschiedliche Resektionsverfahren zur Erlangung des R0-Status durchgeführt (Tabelle 2).

Tumorlokalisation	n	%
Coecum	20	17
Ascendens	21	18
rechte Kolonflexur	4	3
Transversum	13	11
linke Kolonflexur	9	8
Descendens	10	9
Sigma	40	34

Tabelle 1: Tumorlokalisation

Operationsverfahren	n	%
Ant. Rektumresektion	2	2
Radikal erweiterte Sigmaresektion	34	29
Sigmaresektion	1	1
Erweiterte Hemikolektomie links	8	7
Hemikolektomie links	16	13
Transversumresektion	1	1
Erweiterte Hemikolektomie rechts	20	17
Hemikolektomie rechts	33	28
Subtotale Kolektomie	1	1
Totale Kolektomie	1	1

Tabelle 2: Operationsverfahren

50 Patienten (43%) erhielten nach Tumorresektion eine adjuvante Therapie. Sie wurden entweder im Rahmen des Ardan- oder Mayo-Protokolls mit 5-FU/Folinsäure systemisch behandelt (37%), oder erhielten eine lokale sowie systemische Chemotherapie (6%).

2.3 Follow-up

Das mediane follow-up der 117 Patienten betrug 91 Monate (44; 127). Innerhalb dieses Zeitraumes entwickelten 13 Patienten (11%) ein Rezidiv, darunter 3 Lokalrezidive (3%), 2 Rezidive im Bereich der Lymphknoten (2%) und 3 Rezidive (3%) im Bereich des Peritoneums. 11 Patienten (9%) entwickelten metachrone Metastasen, bei 24 Patienten (21%) wurden synchron vorhandene Metastasen progredient. Insgesamt starben 39 Patienten (33%), 37 (31%) davon tumorbedingt und 2 (2%) aufgrund anderer Ursachen.

2.4 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA wurden die Gewebe jeweils in 40 Schnitte à 16 µm Dicke geschnitten. Der prozentuale Tumoranteil aller Gewebe wurde nach HE-Färbung der Präparate durch einen erfahrenen Pathologen bestimmt. Der Tumoranteil betrug durchschnittlich 83%. Die lymphatische Invasion sowie das Vorhandensein von Lymphfollikeln wurden in 3 Graden beurteilt. Nach Homogenisierung der Gewebe erfolgte die Isolierung der gesamt RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen). Zur Homogenisierung wurden die Gewebeschnitte zunächst mit 600 µl RLT-Puffer versetzt und durch mehrmaliges Aufziehen in einer Pipette vermischt. Zur optimalen Homogenisierung wurde die Gewebesuspension nochmals in 0,7x40 mm Microlance Injektionskanülen (Becton Dickinson GmbH) mehrmals aufgezogen. Die weitere RNA-Isolierung mit DNase-Verdau erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die RNA-Elution erfolgte einmal mit 30 µl und nochmals mit 20 µl RNase freiem H₂O und einer jeweils folgenden einminütigen Zentrifugation der RNA-Isolierungssäule bei 8000 x g. Abschließend wurde der RNA-Gehalt mit einem Nanodrop® Photometer gemessen (Nanodrop®Technologies). Der durchschnittlich isolierte RNA-Gehalt betrug 0,67 µg/µl.

2.5 Synthese der cDNA aus mRNA

Mit dem Einsatz von 1 µg RNA erfolgte nach Anleitung des Herstellers die Synthese der cDNA mit dem Enzym M-MLV-RT (Promega/Fermentas).

Die Herstellung der cDNA mit dem Synthese-Protokoll von Promega erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 µl und beinhaltete:

- 1 µg total RNA in 12 µl RNase freiem H₂O
- 1 µl RNasin®RNase Inhibitor (Promega)
- 1 µl Random Primer [1 µg/µl] (Invitrogen GmbH)
- 5 µl Pufferlösung (Promega)
- 5 µl 10mM dNTP (Fermentas)
- 1 µl M-MLV-RT (Promega)

Es wurden zunächst der RNasin®RNase Inhibitor, der Random Primer und die RNA vermischt und 5 Minuten auf 70° C erhitzt, im Eisbad abgekühlt und kurz zentrifugiert. Nach Zugabe des Puffers, der dNTPs und der Reversen Transkriptase erfolgte eine Inkubationsphase von 10 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von einem Aufheizen der Proben auf 40° C über 50 Minuten und der Denaturierung der Reversen Transkriptase bei 94° C für 10 Minuten. Nach Abkühlung der synthetisierten cDNA im Eisbad wurden die Proben zentrifugiert.

Die cDNA-Synthese unter Verwendung der Reversen Transkriptase von Fermentas erfolgte in einem Gesamtvolumen von 31 µl und beinhaltete:

- 1 µg total RNA in 13 µl RNase freiem H₂O gelöst
- 1 µl RNasin®RNase Inhibitor (Promega)
- 1 µl Random Primer [1 µg/µl] (Invitrogen)
- 5 µl Pufferlösung (Fermentas)
- 10 µl 5mM dNTP (Fermentas)
- 1 µl M-MLV-RT (Fermentas)

RNasin®RNase Inhibitor, Random Primer und RNA wurden vermischt und 5 Minuten auf 70° C erhitzt, im Eisbad abgekühlt und kurz zentrifugiert. Nach Zugabe des Puffers, der dNTPs und der Reversen Transkriptase wurden die Proben 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Denaturierung des Enzyms erfolgte bei 94° C für 10 Minuten, mit einem anschließenden Abkühlen der cDNA im Eisbad.

Der cDNA-Gehalt wurde jeweils spektrophotometrisch mit einem Nanodrop Photometer bestimmt. Im Durchschnitt wurden 3,77 µg/µl cDNA synthetisiert.

2.6 Kontrolle der cDNA mit RT-PCR (reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)

Zur Qualitätskontrolle der cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die PCR Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl und setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

-36 µl aqua dest

-5 µl 10 x PCR-Puffer mit $(+\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fermentas)

-1,5 µl MgCl [25mM] (Fermentas)

-1 µl dNTP [5mM] (Fermentas)

-je 2 µl HPRT-Primer For/Rev [25mM]

-0,5 µl Taq DNA Polymerase (rekombinant) [500u/µl] (Fermentas)

-2 µl cDNA

Nach einem hot start bei 94° C über 5 Minuten folgte in einem Zyklus von 35 Wiederholungen die DNA-Denaturierung bei 94° C für 45 Sekunden, das Annealing bei 58° C für 60 Sekunden sowie die DNA-Synthese bei 72° C für 60 Sekunden. Die Polymerisation wurde durch Erhitzen der Proben auf 72° C über 10 Minuten beendet.

2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Im Anschluß wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit einem 2%-Agarose-Gel durchgeführt. Dem Agarose-Gel wurden zum Sichtbarmachen der DNA auf dem UV-Schirm vor dem Gießen 3 µl Ethidiumbromidlösung (Roth) zugesetzt. Vor dem Laden von 10 µl der Proben wurden diese mit 2 µl DNA-Probepuffer versetzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele mit Hilfe des Gel Doc 1000 UV-Illuminator Systems (BioRad) bei 302 nm betrachtet und mit einer Sofortbildkamera dokumentiert. Zur Größenabschätzung des PCR-Produktes diente ein 100bp DNA-Marker.

2%-Agarosegel

-2 g Agarose

-100 ml 1x TAE-Puffer

50xTAE-Puffer

-2M Tris

-0,05M EDTA

-1M Eisessig

DNA-Probepuffer

-1 ml 10xTAE

-1 ml Orange G [10mg/ml] (Sigma)

-5 ml Glyzerol

-3ml aqua dest

DNA-Marker

-40 µl DNA-Standard (New England BioLabs GmbH)

-35 µl Orange G [10mg/ml] (Sigma)

-125 µl aqua dest

2.8 Semiquantitative Real-Time-PCR

Die tumorstadienabhängigen Genexpressionsanalysen wurden mittels semiquantitativer Real-Time-PCR mit dem an doppelsträngige cDNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff SyBr®Green (Applied Biosystems) an dem Applied Biosystems PRISM® 7700 Sequenze Detection System 1.6.3 (Applied Biosystems) durchgeführt. Zunächst wurden die optimale Primer- und cDNA-Konzentration sowie die optimale Primer-Annealing-Temperatur ausgetestet. Die 30 µl umfassende PCR-Reaktion, zusammengesetzt aus 15 µl SyBr®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 3 µl aqua dest, jeweils 1 µl For/Rev-Primer [20mM] und 10 µl [0,01 µg/µl] cDNA, wurde für jede einzelne Gewebeprobe dreifach wiederholt. Die Analyseproben wurden zunächst auf 50° C für 2 Minuten und auf 95° C für 10 Minuten erhitzt, dann folgte die 40 Zyklen umfassende PCR-Reaktion beginnend mit dem Erhitzen der Proben auf 95° C über 15 Sekunden und endend bei der Annealing-Temperatur des entsprechenden Referenz- und Ziel-Primers über 60 Sekunden.

Die Kontrolle der PCR-Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese auf einem 2%-Agarose-Gel.

2.9 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Metabion GmbH synthetisiert.

Primer-Sequenzen

HPRT:	FOR	5`-GCT TTC CTT GGT CAG GCA GTA TAA T-3`
	REV	5`-AAG GGC ATA TCC TAC AAC AAA CTT G -3`
OPN:	FOR	5`-TTG CAG CCT TCT CAG CCA A-3`
	REV	5`-GGA GGC AAA AGC AAA TCA CTG-3`

CA II: FOR 5`-AAA CAA AGG GCA AGA GTG CTG-3`
REV 5`-AGT GAC CCT GGG TAG GTC GTC CA-3`
MAD2L2: FOR 5`-CGA GTT CCT GGA GGT GGC TGT GCA TC-3`
REV 5`-CTT GAC GCA GTG CAG CGT GTC CTG GAT A-3`
SASH: 1729-FOR 5`-ATC TCC TTT CTT GAG CTT GAG-3`
REV-U1824 5`-CGG GAA AGC GTC AAG TCG GA-3`

Primer-annealing-Temperatur

HPRT: 58°C
OPN: 58°C
CA II: 60°C
MAD2L2: 62°C
SASH: 60°C

2.10 Statistische Auswertung

Zur Analyse und Dokumentation der Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR wurde die Sequenze Detection Software Version 1.6.3 von Applied Biosystems verwendet. Die Programme Microsoft Excel (Microsoft Corporation), GraphPad PRISM[®] Version 4 (GraphPad Software Inc.) und SPSS (SPSS GmbH Software) wurden zur Auswertung der Daten verwendet.

2.10.1 Aufbereitung der Daten der quantitativen Real-time PCR Genexpressionsanalyse

Über die $2^{\Delta\Delta Ct(\text{threshold-cycles})}$ -Methode wurde semiquantitativ das Genexpressionsniveau der Gewebeproben berechnet.

Die Berechnung erfolgte nur bei Gewebeproben, die in der quantitativen Real-time PCR dreifach positiv liefen.

Zunächst wurde der Mittelwert der Ct-Werte aus allen positiven PCR-Läufen jedes einzelnen Gewebes berechnet. Dann erfolgte die Normalisierung der Ct-Werte der Tumorgewebe über die Subtraktion des gemittelten Ct-Wertes jeder einzelnen Tumorseite vom Ct-Mittelwert aller Normalschleimhautgewebe. Im nächsten Schritt wurden die Tumorseitenproben nochmals über die Expression des Referenzgens HPRT normalisiert. Dazu wurde der mit dem Normalgewebe normalisierte Ct-Wert des Zielgens der Tumorseite vom entsprechenden normalisierten Ct-Wert des Referenzgens subtrahiert. Aus dem so gebildeten $\Delta\Delta Ct$ -Wert wurde abschließend die Potenz mit der Basis 2 gebildet. Der sich durch diese Berechnung ergebende Zahlenwert gibt die relative Expression des einzelnen Zielgens normalisiert zum Normalgewebe und Referenzgen HPRT wieder.

Dabei zeigen Zahlenwerte <1 eine Herabregulation des entsprechenden Gens in der jeweiligen Tumorseiteprobe im Vergleich zum Normalgewebe an, Zahlenwerte >1 eine Hochregulation des entsprechenden Gens.

2.10.2 Auswertung der Daten der quantitativen Real-time PCR Genexpressionsanalyse

Auf die Berechnung des relativen Expressionsniveaus aufbauend, erfolgte die weitere Datenanalyse. Da die relativen Expressionswerte keiner Normalverteilung entsprachen, sind alle angegebenen Zahlenwerte als Median mit dem

Interquartilenabstand der relativen Expression in den jeweiligen Tumorstadien aufgeführt.

Die Analyse der Genexpression der einzelnen Tumorstadien zueinander sowie die Analyse der prognostischen Bedeutung erfolgte über den Kruskal-Wallis Test und Mann-Whitney Rank Sum Test. Zur univariaten und multivariaten Überlebensanalyse wurde die COX-Regression berechnet. Das Signifikanzniveau wurde auf $<0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR

Die quantitative Real-time PCR-Analyse erfolgte an einem ausgewählten Kollektiv von 117 Patienten mit einem Kolonkarzinom unterschiedlicher Tumorstadien. Die Normalisierung der Genexpression erfolgte über die $2^{\Delta\Delta Ct(\text{threshold-cycles})}$ -Methode. Dazu wurden zunächst alle Tumorgewebeproben anhand der durchschnittlichen Expression der 10 ausgewählten Normalschleimhautgewebeproben genspezifisch normalisiert. Anschließend erfolgte die Normalisierung über das Referenzgen HPRT.

3.1.1 OPN

Die Analyse der Genexpression von Osteopontin ergab eine tumorstadienabhängige Überexpression mit steigender Expression in Tumoren fortgeschrittener Stadien. Dabei zeigte sich schon in frühen Tumorstadien eine 2-fach gesteigerte OPN-Expression, Tumore im UICC Stadium II wiesen 3-fach mehr OPN auf und lymphogen metastasierte Tumore 1,7-fach mehr. In Tumoren, die bereits Fernmetastasen gebildet hatten, ließ sich eine fast 5-fach gesteigerte OPN-

Expression nachweisen. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Expression im UICC Stadium II und IV im Vergleich zum Normalgewebe.

Stadium	Relative OPN-Expression					
	n	MEDIAN	25% Percentil	75% Percentil	Mittelwert	SD
I	12	1,99	1,305	4,37	3,292	3,42
II	48	3,77	1,115	11,64	16,05	53,29
III	24	1,72	0,91	14,35	18,52	51,78
IV	33	5,28	1,94	14,83	12,76	17,30
nSH	10	1,245	0,195	2,03	8,43	23,42

Tabelle 3: relative OPN-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct ((N-T)OPN-(N-T)HPRT)}$)

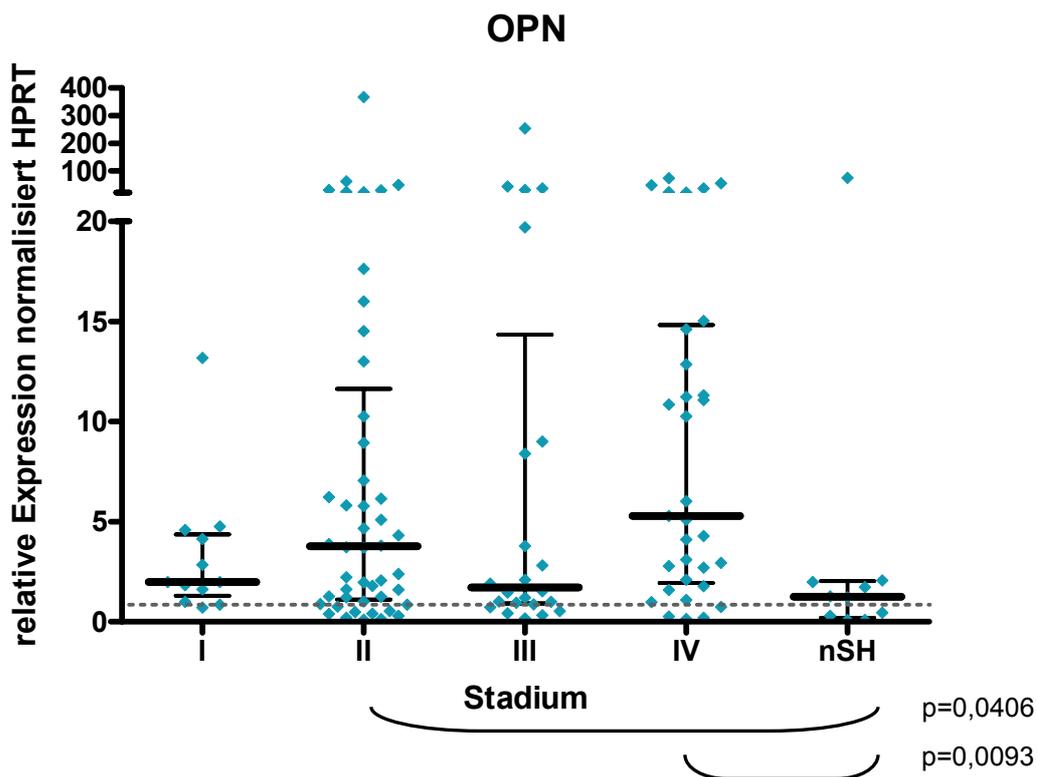


Abbildung 6: relative OPN-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct ((N-T)OPN-(N-T)HPRT)}$)

Stadium	p-Wert
I vs nSH	ns
II vs nSH	0,0406
III vs nSH	ns
IV vs nSH	0,0093
I vs II	ns
I vs III	ns
I vs IV	ns
II vs III	ns
II vs IV	ns
III vs IV	ns

Tabelle 4: Mann-Whitney-U-Test OPN-Expression

Betrachtet man nur die 77% aller Tumore, die Osteopontin überexprimierten, so wird der tumorstadienabhängige Anstieg der OPN-Expression deutlicher. In frühen Tumorstadien ließ sich ein beinahe 3-facher Expressionsanstieg finden. Tumore im UICC Stadium II zeigten eine 5,8-fach gesteigerte OPN-Expression und lymphogen metastasierte Tumore exprimierten 6,1-fach mehr OPN als Normalgewebe. Eine 11-fache Überexpression wiesen Tumore mit Fernmetastasen auf. Im Vergleich zum Normalgewebe ergab sich ein signifikanter Unterschied der OPN-Expression für alle Tumorstadien sowie für das UICC Stadium I im Vergleich zum UICC Stadium IV.

Stadium	Relative OPN-Expression					
	n	MEDIAN	25% Percentil	75% Percentil	Mittelwert	SD
I	9	2,85	1,905	4,675	4,104	3,62
II	37	5,78	2,15	16,82	20,69	60,10
III	16	6,09	1,72	25,87	27,48	62,08
IV	28	10,56	3,025	17,78	14,96	17,93

Tabelle 5: relative OPN-Expression von Tumoren mit OPN-Hochregulation ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)OPN-(N-T)HPRT)}$)

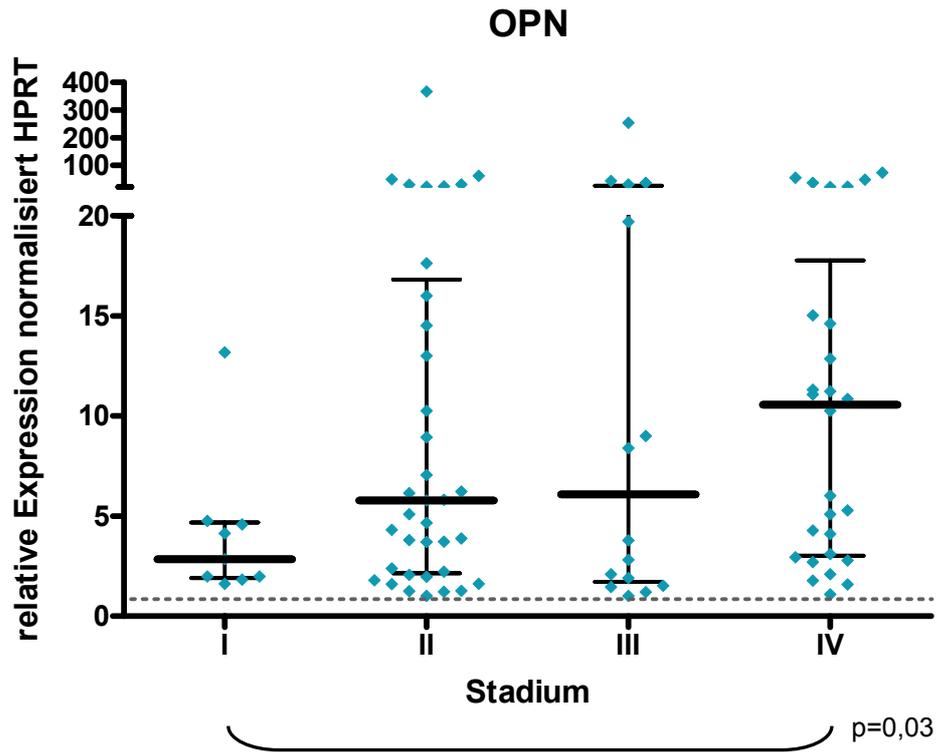


Abbildung 7: relative OPN-Expression von Tumoren mit OPN-Hochregulation ($2^{\Delta\Delta Ct ((N-T)OPN-(N-T)HPRT)}$)

Stadium	p-Wert
I vs nSH	0,022
II vs nSH	0,0017
III vs nSH	0,0143
IV vs nSH	0,0008
I vs II	ns
I vs III	ns
I vs IV	0,0323
II vs III	ns
II vs IV	ns
III vs IV	ns

Tabelle 6: Mann-Whitney-U-Test OPN-Expression OPN überexprimierender Tumore

3.1.2 CA II

Für Carbonic anhydrase II ergab sich eine starke Herabregulation der Genexpression. Schon in frühen Tumorstadien zeigte sich ein deutlicher Expressionsabfall des Wnt-Zielgens, der sich auf nahezu gleichförmigem Niveau bis in die höheren Tumorstadien nachweisen ließ. Tumore in den UICC Stadien I, II und IV exprimierten 0,03-fach weniger CA II, Tumore im UICC Stadium III 0,025-fach weniger. Alle Tumorstadien zeigten einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der CA II-Expression im Vergleich zum Normalgewebe.

Stadium	Relative CA II-Expression					
	n	Median	25% Percentil	75% Percentil	Mittelwert	SD
I	12	0,03	0,015	0,145	0,086	0,118
II	47	0,03	0,01	0,10	0,106	0,208
III	24	0,025	0,0	0,065	0,117	0,346
IV	33	0,03	0,01	0,095	0,216	0,798
nSH	10	0,77	0,435	3,76	1,869	2,007

Tabelle 7: relative CA II-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)CA II-(N-T)HPRT)}$)

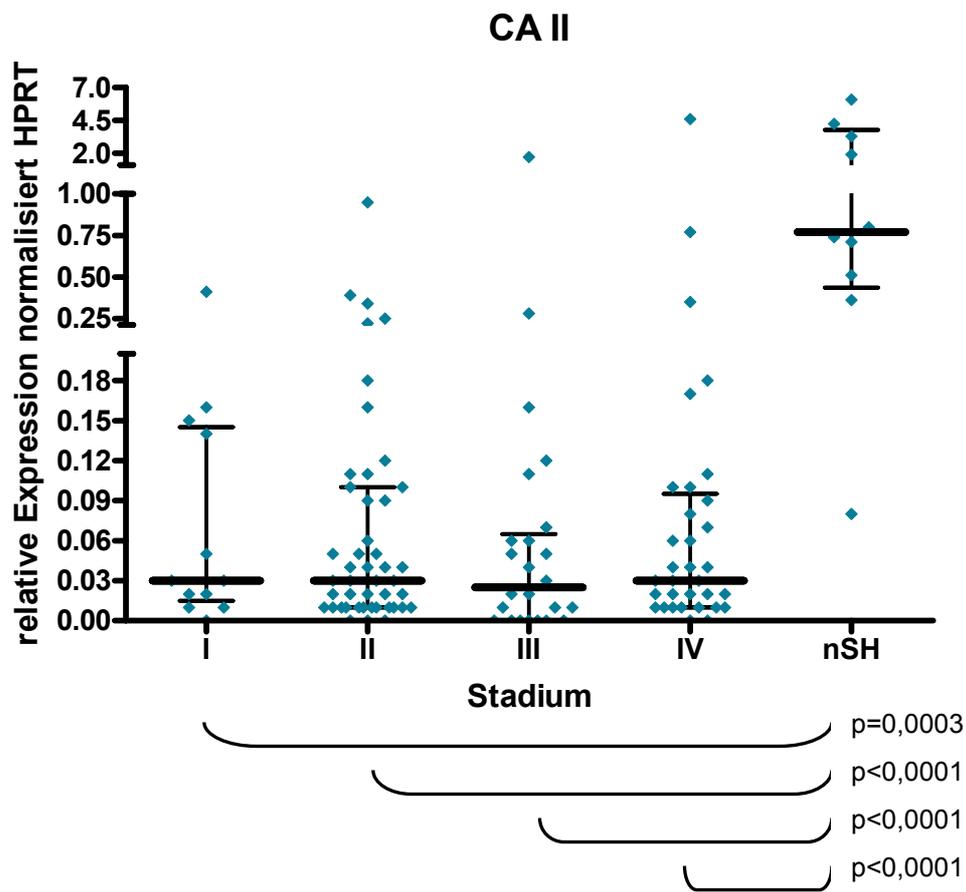


Abbildung 8: relative CA II-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct ((N-T)CA II-(N-T)HPRT)}$)

Stadium	p-Wert
I vs nSH	0,0003
II vs nSH	<0,0001
III vs nSH	<0,0001
IV vs nSH	<0,0001
I vs II	ns
I vs III	ns
I vs IV	ns
II vs III	ns
II vs IV	ns
III vs IV	ns

Tabelle 8: Mann-Whitney-U-Test CA II-Expression

Das Wnt-Zielgen konnte in 97% aller analysierten Tumore als herabreguliert nachgewiesen werden. So zeigt sich bei Analyse aller Tumore mit CA II-Unterepression ein identisches Bild der tumorstadienabhängigen CA II-Expression.

3.1.3 MAD2L2

MAD2L2 wurde in den untersuchten Kolonkarzinomen hochreguliert gefunden. Dabei zeigte MAD2L2 eine geringgradige Überexpression in Tumoren früher Stadien mit einem 1,3-fachen MAD2L2-Expressionsanstieg. Tumore im UICC Stadium II exprimierten 1,2-fach mehr MAD2L2 und lymphogen metastasierte Tumore 1,4-fach mehr als Normalmukosagewebe. In bereits fernmetastasierten Karzinomen ließ sich das Mitosekontrollgen 1,7-fach hochreguliert nachweisen. Signifikant zeigte sich nur die Expression von Tumoren des UICC Stadiums IV verglichen mit Normalgewebe.

Stadium	Relative MAD2L2-Expression					
	n	Median	25% Percentil	75% Percentil	Mittelwert	SD
I	12	1,29	0,83	1,71	1,373	0,697
II	48	1,24	0,83	2,295	1,934	1,94
III	24	1,345	0,65	3,085	2,09	2,358
IV	31	1,66	0,74	3,1	2,099	1,624
nSH	8	0,785	0,26	1,6	0,98	0,835

Tabelle 9: relative MAD2L2-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct ((N-T)MAD2L2-(N-T)HPRT)}$)

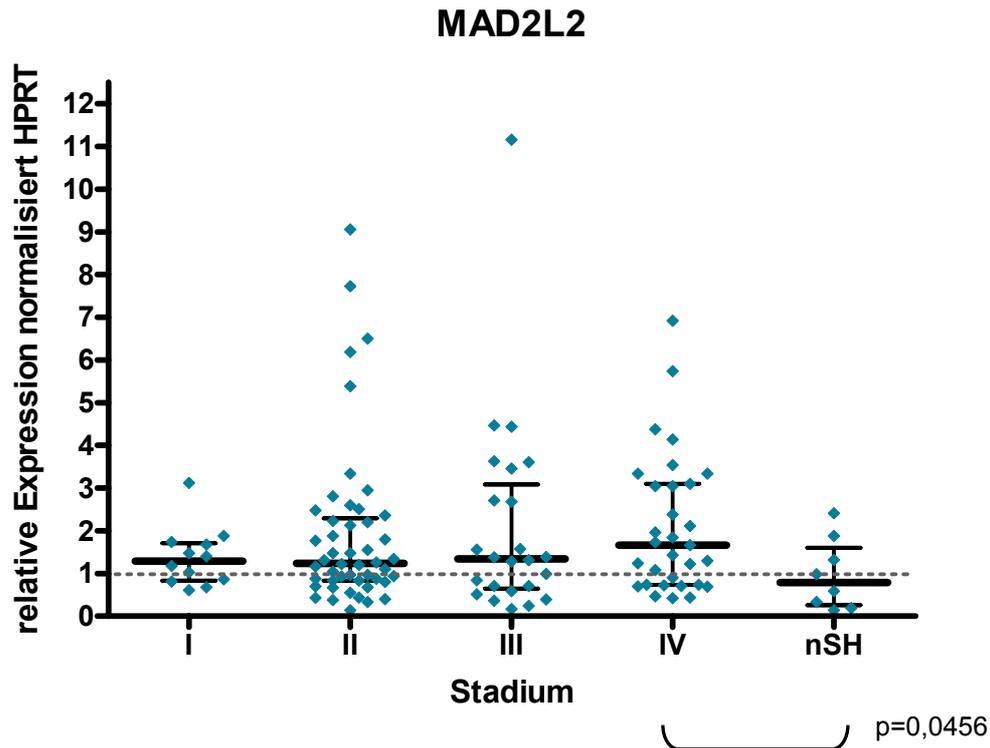


Abbildung 9: relative MAD2L2 Expression ($2^{\Delta\Delta Ct ((N-T)MAD2L2-(N-T)HPRT)}$)

Stadium	p-Wert
I vs nSH	ns
II vs nSH	ns
III vs nSH	ns
IV vs nSH	0,0456
I vs II	ns
I vs III	ns
I vs IV	ns
II vs III	ns
II vs IV	ns
III vs IV	ns

Tabelle 10: Mann-Whitney-U-Test MAD2L2-Expression

63% aller Tumore überexprimierten MAD2L2. Betrachtet man die MAD2L2-Expression dieser Tumore hinsichtlich der unterschiedlichen Tumorstadien, so ergibt sich ein etwas stärkerer tumorstadienabhängiger Anstieg der Genexpression, insbesondere in fortgeschrittenen Tumorstadien. Die MAD2L2-Überexpression

betrug im UICC Stadium I 1,6-fach, im UICC Stadium II 2,1-fach, im UICC Stadium III 2,7-fach und im UICC Stadium IV 2,4-fach. Hier erwiesen sich Tumore der UICC-Stadien II-IV als statistisch signifikant gegenüber Normalmukosa.

Stadium	Relative MAD2L2-Expression					
	n	Median	25% Percentil	75% Percentil	Mittelwert	SD
I	8	1,58	1,29	1,81	1,689	0,645
II	29	2,13	1,325	2,88	2,76	2,118
III	14	2,695	1,385	4,035	3,189	2,582
IV	21	2,38	1,545	3,44	2,788	1,549

Tabelle 11: relative MAD2L2-Expression von Tumoren mit MAD2L2-Überexpression

$$(2^{\Delta\Delta Ct ((N-T)MAD2L2-(N-T)HPRT)})$$

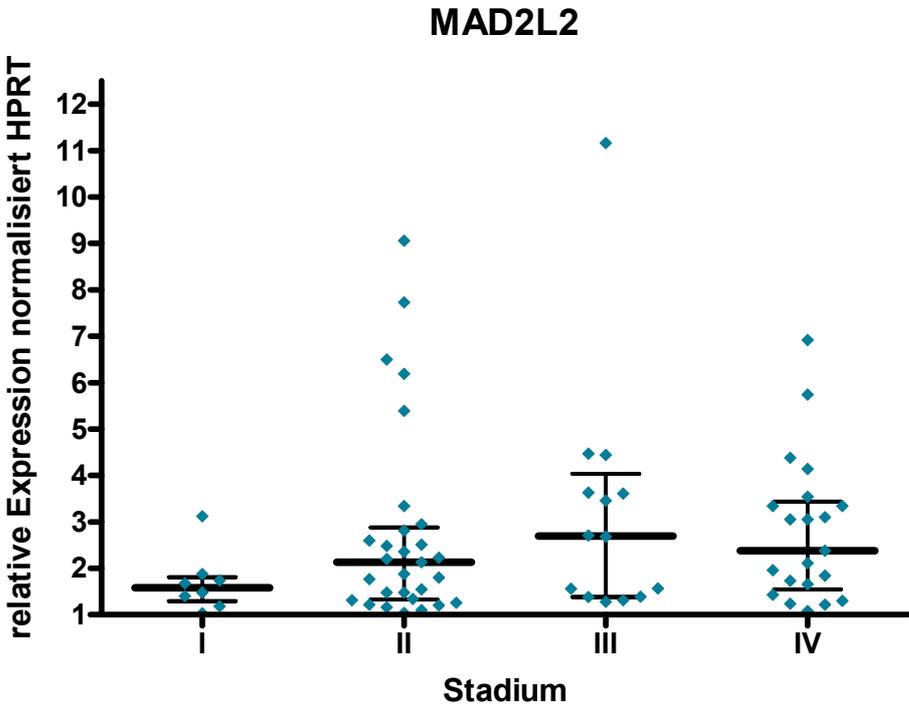


Abbildung 10: relative MAD2L2-Expression von Tumoren mit MAD2L2-Überexpression

$$(2^{\Delta\Delta Ct ((N-T)MAD2L2-(N-T)HPRT)})$$

Stadium	p-Wert
I vs nSH	ns
II vs nSH	0,0045
III vs nSH	0,0046
IV vs nSH	0,0032
I vs II	ns
I vs III	ns
I vs IV	ns
II vs III	ns
II vs IV	ns
III vs IV	ns

Tabelle 12: Mann-Whitney-U-Test MAD2L2-Expression MAD2L2 überexprimierender Tumore

3.1.4 SASH1

Das neuartige Tumorsuppressorgen SASH1 zeigte sich tumorstadienabhängig unterexprimiert. Dabei ergab sich schon in frühen Tumorstadien ein deutlicher Expressionsabfall von SASH1. Der Median der SASH1-Expression im UICC Stadium I betrug 0,17, im UICC Stadium II 0,1, im UICC Stadium III 0,11 und bei synchron fernmetastasierten Tumoren 0,15. Alle Tumorstadien wiesen einen signifikanten Expressionsunterschied verglichen mit Normalgewebe auf.

Stadium	Relative SASH1-Expression					
	n	Median	25% Percentil	75% Percentil	Mittelwert	SD
I	12	0,165	0,085	0,21	1,037	3,044
II	45	0,10	0,06	0,205	0,708	3,546
III	23	0,11	0,06	0,21	0,15	0,126
IV	30	0,15	0,08	0,695	2,505	5,529
nSH	10	0,465	0,17	10,94	6,63	13,19

Tabelle 13: relative SASH1-Expression ($2^{-\Delta\Delta Ct((N-T)SASH1-(N-T)HPRT)}$)

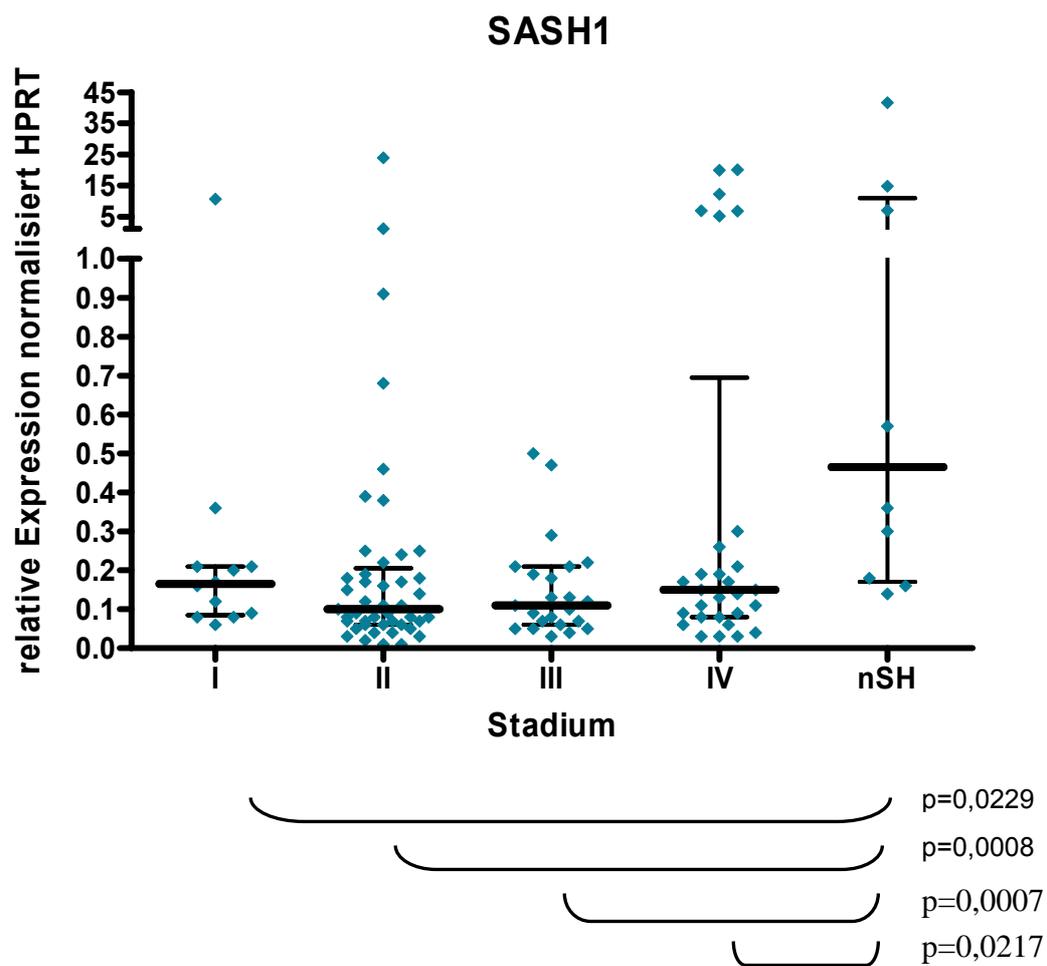


Abbildung 11: relative SASH1-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct ((N-T)SASH1-(N-T)HPRT)}$)

Stadium	p-Wert
I vs nSH	0,0229
II vs nSH	0,0008
III vs nSH	0,0007
IV vs nSH	0,0217
I vs II	ns
I vs III	ns
I vs IV	ns
II vs III	ns
II vs IV	ns
III vs IV	ns

Tabelle 14: Mann-Whitney-U-Test SASH1-Expression

91% aller untersuchten Kolonkarzinome zeigten eine Herabregulation von SASH1. Dabei ergab sich kein verändertes Bild der tumorstadienabhängigen Expression von SASH1. Karzinome des UICC Stadium I exprimierten das 0,16-fache, im UICC Stadium II das 0,09-fache und im UICC Stadium III und IV das 0,11-fache im Vergleich zu der SASH1-Expression von Normalschleimhautgewebe. Auch hier zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der SASH1-Expression aller Tumorstadien im Vergleich zu Normalgewebe.

Stadium	Relative SASH1-Expression					
	n	Median	25% Percentil	75% Percentil	Mittelwert	SD
I	11	0,16	0,08	0,21	0,158	0,087
II	43	0,09	0,06	0,18	0,158	0,177
III	23	0,11	0,06	0,21	0,15	0,126
IV	23	0,11	0,06	0,17	0,125	0,074

Tabelle 15 : relative SASH1-Expression von Tumoren mit SASH1-Herabregulation

$$(2^{\Delta\Delta Ct ((N-T)SASH1-(N-T)HPRT)})$$

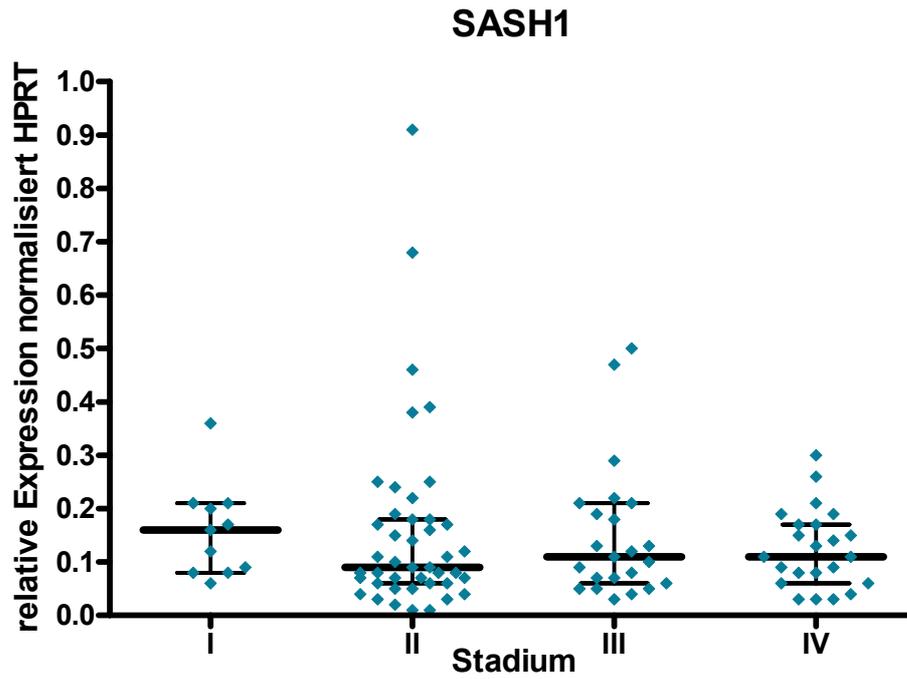


Abbildung 12: relative Expression von Tumoren mit SASH1-Unterexpression

$$(2^{\Delta\Delta Ct ((N-T)SASH1-(N-T)HPRT)})$$

Stadium	p-Wert
I vs nSH	0,0083
II vs nSH	0,0003
III vs nSH	0,0007
IV vs nSH	0,0003
I vs II	ns
I vs III	ns
I vs IV	ns
II vs III	ns
II vs IV	ns
III vs IV	ns

Tabelle 16: Mann-Whitney-U-Test SASH1-Expression SASH1 unterexprimierender Tumore

3.2 Prognostische Bedeutung der Genexpression

3.2.1 Rezidivraten

Bei einem medianen follow-up von 91 Monaten (44; 127) entwickelten 13 Patienten (11%) ein Rezidiv. Bei 3 Patienten (3%) rezidierte der Tumor lokal, bei 2 Patienten (2%) im Bereich der Lymphknoten, bei weiteren 3 Patienten (3%) im Peritoneum. 11 Patienten (9%) entwickelten metachrone Fernmetastasen und bei 24 Patienten (21%) mit synchroner Metastasierung war ein Progreß der Metastasen zu verzeichnen.

Die Berechnung hinsichtlich prognostischer Bedeutung der Genexpression von OPN, CA II, MAD2L2 und SASH1 erfolgte über den Mann-Whitney-U-Test zur Kontrolle des Lagemaßes zweier unabhängiger nichtnormalverteilter Stichproben sowie über den Kruskal-Wallis-H-Test zur einfaktorischen Varianzanalyse nichtnormalverteilter Stichproben.

Bezüglich der Rezidivrate ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Genexpression aller untersuchten Gene (Tabelle 17).

Vergleicht man isoliert die Patienten mit einem Wiederauftreten der Erkrankung in Form von Lokal-, Lymphknoten- und Peritonealrezidiven mit denen, die kein Rezidiv entwickelten, oder mit denen, deren Tumore progredient wurden, so zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Gruppen (Tabelle 17 und 18). Im Bezug auf die Metastasierungsrate wies SASH1 einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich der Genexpression nicht metachron metastasierter, metachron metastasierter und progredient gewordener synchroner Metastasen auf (Tabelle 19). Der p-Wert lag hier bei 0,046. Der Vergleich der SASH1-Expression nicht metastasierter Patienten mit Patienten, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes Metastasen entwickelten, war signifikant bei einem p-Wert

von 0,014. Die Expression von OPN, CA II und MAD2L2 zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede in diesen Analysen (Tabelle 19).

Kruskal-Wallis-H-Test	Gruppen	Gen	Signifikanzniveau
Rezidivrate	kein Rezidiv	OPN	0,188
		CA II	0,831
	Rezidiv Progreß	MAD2L2	0,32
		SASH1	0,249
Mann-Whitney-U-Test Rezidivrate	kein Rezidiv	OPN	0,35
		CA II	0,657
		MAD2L2	0,129
		SASH1	0,107
	kein Rezidiv Progreß	OPN	0,082
		CA II	0,632
		MAD2L2	0,559
		SASH1	0,456
	Rezidiv Progreß	OPN	0,986
		CA II	0,957
		MAD2L2	0,523
		SASH1	0,445

Tabelle 17: Prognostische Bedeutung hinsichtlich der Rezidivrate

Kruskal-Wallis-H-Test	Gruppen	Gen	Signifikanzniveau
Lokalrezidivrate	kein Rezidiv	OPN	0,317
		CA II	0,688
	Rezidiv	MAD2L2	0,753
		SASH1	0,824
Lymphknotenrezidivrate	kein Rezidiv	OPN	0,635
		CA II	0,165
	Rezidiv	MAD2L2	0,136
		SASH1	0,572
Peritonealrezidivrate	kein Rezidiv	OPN	0,63
		CA II	0,634
	Rezidiv	MAD2L2	0,956
		SASH1	0,344

Tabelle 18: Prognostische Bedeutung hinsichtlich der Lokal-, Lymphknoten- und Peritonealrezidivrate

Kruskal-Wallis-H-Test	Gruppen	Gen	Signifikanzniveau
metachrone Metastasierungsrate	kein Rezidiv metachrone Metastase Progreß synchroner Metastasen	OPN	0,077
		CA II	0,323
		MAD2L2	0,299
		SASH1	0,046
Mann-Whitney-U-Test metachrone Metastasierungsrate	kein Rezidiv metachrone Metastase	OPN	0,119
		CA II	0,146
		MAD2L2	0,115
		SASH1	0,014
	kein Rezidiv Progreß synchroner Metastasen	OPN	0,065
		CA II	0,513
		MAD2L2	0,574
		SASH1	0,393
	metachrone Metastase Progreß synchroner Metastasen	OPN	0,487
		CA II	0,46
		MAD2L2	0,5
		SASH1	0,152

Tabelle 19: Prognostische Bedeutung hinsichtlich der Metastasierungsrate

3.2.2 Mortalität

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 91 Monaten verstarben 39 Patienten (33%). 37 Patienten (31%) verstarben tumorbedingt und 2 Patienten (2%) wiesen andere Todesursachen auf.

Bei der Analyse der Genexpression OPN, CA II, MAD2L2 und SASH1 hinsichtlich prognostischer Bedeutung im Bezug auf die Todesrate ergaben sich keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede bei der Durchführung des Kruskal-Wallis-H-Tests sowie des Mann-Whitney-U-Tests (Tabelle 20).

Kruskal-Wallis-H-Test	Gruppen	Gen	Signifikanzniveau
Todesrate	Lebend tumorbedingt verstorben andere Todesursache	OPN	0,194
		CA II	0,748
		MAD2L2	0,42
		SASH1	0,265
Mann-Whitney-U-Test	Lebend tumorbedingt verstorben	OPN	0,075
		CA II	0,533
		MAD2L2	0,209
		SASH1	0,164
	kein Rezidiv andere Todesursache	OPN	0,926
		CA II	0,576
		MAD2L2	0,712
		SASH1	0,473
	tumorbedingt verstorben andere Todesursache	OPN	0,52
		CA II	0,921
		MAD2L2	0,62
		SASH1	0,275

Tabelle 20: Prognostische Bedeutung hinsichtlich der Todesrate

3.2.3 Überlebensanalysen

Welchen Einfluss die Genexpression von OPN, CA II, MAD2L2 und SASH1 auf das Überleben haben, wurde mit Hilfe der COX-Regressionsanalyse berechnet. Zu den bekannten Einflussfaktoren auf das Überleben der Patienten wie das Alter, das Geschlecht, der lokale Resektionsstaus, das Grading, das Auftreten von Lymphangiosis, das Tumorstadium und das Auftreten von Rezidiven, wurde zusätzlich der Einfluss der OPN-, CA II-, MAD2L2- und SASH1-Expression herangezogen .

In der univariaten Analyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Bezug auf das Überleben der Einflussfaktoren Alter, Geschlecht, OPN-, CA II- sowie SASH1-Expression. Signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch für die Einflussfaktoren Grading mit einem p-Wert von 0,005, Vorhandensein von Lymphangiosis mit einem p-Wert von <0,001, Auftreten von Rezidiven mit einem p-Wert von <0,001, UICC Stadium mit einem p-Wert von <0,001, Wiederauftreten der Erkrankung mit einem p-

Wert von <0,001 und für den Einflussfaktor MAD2L2-Expression mit einem p-Wert von 0,043 (Tabelle 21).

Univariate Überlebensanalyse	Signifikanzniveau
Alter	0,794
Geschlecht	0,364
Grading	0,005
Lymphangiosis	<0,001
UICC Stadium	<0,001
R lokal	.
Rezidiv	<0,001
OPN-Expression	0,768
CA II-Expression	0,079
MAD2L2-Expression	0,043
SASH1-Expression	0,157

Tabelle 21: univariate Überlebensanalyse

Anhand den oben genannten Einflussfaktoren erfolgte die multivariate Analyse. Neben dem Wiederauftreten der Erkrankung mit einem relativen Risiko bezüglich des Überlebens von 3,67, dem Vorhandensein von Lymphangiosis mit einem relativen Risiko von 1,89 und dem Grading mit einem relativen Risiko von 2,26, erwies sich die Expression von SASH1 als 4. unabhängiger Prognoseparameter mit einem relativen Risiko von 1,07.

Likelihood Ratio	p-Wert	B	SE	Rel. Risiko	Konfidenzintervall
Step 1 REZIDIV	,000	1,300	,158	3,67	2,68-5,02
Step 2 LYMPHANGIOSIS	,001	,638	1,93	1,89	1,31-2,75
Step 3 GRADING	,009	,816	,312	2,26	1,24-4,17
Step 4 SASH	,050	,070	,036	1,07	0,99-1,16

Tabelle 22: multivariate Überlebensanalyse

4 Diskussion

Molekulargenetische Analysen der vergangenen Jahre haben dazu beigetragen, die Mechanismen der Initiation, Progression und Metastasierung von CRC, die über das von Fearon und Vogelstein etablierte Konzept der stufenweisen Entstehung CRC hinausreichen, im Detail aufzudecken.

Durch Analysen in Tiermodellen und Untersuchungen humaner Gewebe konnten Gene identifiziert werden, die in Funktion als Tumorsuppressoren, -modulatoren und -promotoren in das Zellwachstum auf unterschiedliche Weise eingreifen.

Von besonderem klinischem Interesse sind jedoch solche Gene, die dazu beitragen, Aussagen über Prognose, Progression und Ansprechen von Tumorthérapien treffen zu können. Das Ziel molekulargenetischer Analysen stellt nicht nur die Aufklärung molekulargenetischer Entstehungsmechanismen von Karzinomen dar, sondern die Etablierung eines genetischen Tumorprofils, um neue diagnostische und prognostische Marker heranziehen zu können, die nicht nur das Rezidivrisiko eines Tumors, sondern auch das Ansprechen adjuvanter Therapien vorhersagbar machen. Das individuelle Tumorprofil soll dazu beitragen, herkömmliche Therapien effektiver einzusetzen und individualisierte Tumorthérapie mit neuen Behandlungsstrategien zu entwickeln.

Im Rahmen einer Microarray-Analyse an CRC an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München wurden die Wnt-Zielgene OPN als am stärksten hochreguliertes Target, und CA II als am stärksten herabreguliertes Target identifiziert. Zudem wurde das Mitosekontrollgen MAD2L2 als hochreguliert gefunden. In dieser Studie sollten diese Marker validiert und an einem erweiterten Kollektiv vertiefend untersucht werden. Ebenso sollte in

dieser Studie die Rolle des Gens SASH1, das bei Mammakarzinomen unterexprimiert ist, bei der CRC Entstehung analysiert werden.

4.1 Osteopontin

Osteopontin ist in verschiedene Signalwege eingebunden, die das Wachstum, die Progression und Metastasierung von Tumoren fördern. In unterschiedlichen Tumortypen wird OPN hochreguliert gefunden. Die tumorgenetischen Eigenschaften von OPN resultieren dabei aus seinen vielfältigen Funktionen. OPN unterstützt die Zelladhäsion, verhindert die Apoptose von Endothelzellen und ist ein Ligand für das $\alpha(v)\beta(3)$ Integrin, das eine entscheidende Rolle bei der endothelialen Zellbiologie und Neovaskularisation spielt. Man geht davon aus, dass das von Tumorzellen produzierte OPN über die Stimulation der Angiogenese das Tumorstadium fördert. Es konnte gezeigt werden, dass OPN nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von tumorinfiltrierenden Makrophagen und Lymphozyten produziert wird. Tumorzellen produzieren OPN nicht nur selbst, sie können es auch von der Umgebung aufnehmen (Tuck et al., 1998). Als lösliches Produkt kann es ungebunden weder die endotheliale Zellproliferation fördern, noch die Apoptose von Zellen verhindern. Erst durch Bindung von OPN an eine Matrixoberfläche wird z.B. die Zelladhäsion von Endothelzellen der Umbilikalvene unterstützt und die Apoptose durch Weiterführung des Zellzyklus verhindert (Rittling et al., 2002). OPN trägt auch dazu bei, Peroxidlevel von Zellen zu reduzieren, das Überleben hypoxischer Zellen zu unterstützen und Tumorzellen nicht von aktivierten Makrophagen zerstören zu lassen (Denhardt et al., 1995). In Northern Blot und Western Blot Analysen zeigte sich für Säugerzellen, die kein OPN produzieren, eine größere Empfindlichkeit gegenüber der zytotoxischen Aktivität von aktivierten RAW264.7 makrophagen-ähnlichen Zellen. In einem in vitro Metastasierungs-Assay zeigte sich in diesen

Zellen ein geringeres tumorigenes und invasives Potential. OPN verhindert die NO-vermittelte Zytotoxizität und unterstützt dadurch den metastasierenden Phenotyp (Feng et al., 1995). Durch die Identifikation der Sequenzen von OPN-Promotorelementen, wie z.B. von RAE (Ras-activated enhancer) und einer T cell factor-4 Bindungsstelle konnte die Regulation der OPN-Transkription durch Ras- und Wnt-Signalwege aufgeklärt werden (Denhardt et al., 2003).

Untersucht man die OPN-Expression in humanen Tumoren, so lässt sich ebenso ein Zusammenhang zwischen Expression und Tumorwachstum bzw. -progression, und der OPN-Expression und gesteigertem Metastasierungsverhalten nachweisen. Studien zeigten, dass Brustepithelzellen in Abhängigkeit der OPN-Expression eine erhöhte Invasivität durch eine Erhöhung der Zellmigrationsrate und Induktion der uPA-Expression aufwiesen (Tuck et al., 1999). Zudem ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhter OPN-Expression und vermindertem Überleben bei Patienten mit Brust-, Lungen- sowie kolorektalen Tumoren (Tuck et al., 1998; Rudland et al., 2002; Chambers et al., 1996; Tuck and Chambers, 2001; Agrawal et al., 2003). Microarray und Northern Blot Analysen bei Patienten mit CRC erbrachten eine Korrelation zwischen OPN-Expression und Tumorprogression (Agrawal et al., 2002). Im Tiermodell konnte in Ras-induzierten Darmtumoren eine gesteigerte Expression des OPN-Othologs SPP1 gezeigt werden (Janssen, unveröffentlichte Beobachtung).

Mit der Durchführung der quantitativen RT-PCR konnten wir eine tumorstadienabhängige Überexpression von OPN nachweisen, und damit die Microarray Befunde validieren. Wie schon andere Studien zeigen konnten, ergab sich insbesondere bei fortgeschrittenen Tumorstadien ein signifikanter Anstieg der OPN-Expression. Die Analyse von Tumoren früher Stadien erbrachte eine 2-fach gesteigerte OPN-Expression. Dabei konnte man in 75% aller Tumore dieser frühen

Tumorstadien schon einen OPN-Expressionsanstieg nachweisen. Damit zeigt sich nicht nur die Beteiligung von dem Wnt-Zielgen OPN am Tumorwachstum und der – progression, sondern es ergibt sich auch daraus ein indirekter Hinweis der Deregulation des Wnt-Signalweges schon in frühen Tumorstadien. Die im Vergleich zur 4-fach gesteigerten OPN-Expression im UICC Stadium II wieder abfallende OPN-Expression von Tumoren mit lymphogenen Metastasen im UICC Stadium III auf das 1,7-fach, lässt sich durch den geringeren Anteil OPN überexprimierender Tumore in diesem Tumorstadium erklären. Der besonders in UICC Stadium IV ausgeprägte Anstieg der OPN-Expression, wie auch die in diesem Tumorstadium steigende Anzahl OPN überexprimierender Tumore, lässt vermuten, dass OPN gerade beim Metastasierungsprozeß eine Rolle spielt. 85% synchron metastasierter Tumore weisen eine Hochregulation des Genes auf.

Insgesamt 77% aller Tumore zeigten eine OPN-Überexpression. Dies kann als ein indirekter Hinweis auf Deregulation des Wnt-Signalweges dienen. Literaturangaben zu Folge zeigen 60-80% aller sporadischen CRC eine Wnt/APC-Deregulation. Der Befund zeigt also gute Übereinstimmung. Ob Tumore ohne OPN-Überexpression tatsächlich keine Wnt-Deregulation aufweisen, muß allerdings noch experimentell belegt werden. Damit konnte diese Studie an Kolonkarzinomen unterschiedlicher Tumorstadien nicht nur eine tumorstadienabhängige Expression von OPN, sondern auch einen signifikanten OPN-Anstieg besonders in den Tumoren, die bereits Fernmetastasen gebildet hatten, nachweisen.

Hinsichtlich der OPN-Expression als Prognoseparameter konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang bezüglich der Rezidivrate, der Mortalität und des Überlebens erkennen.

Ein Nachweis der OPN-Expression lässt sich nicht nur im Tumorgewebe nachweisen, sondern aufgrund der sekretorischen Eigenschaften ist das Protein

OPN auch im Serum nachweisbar (Rittling et al., 2002). So ließen sich steigende OPN-Plasmaspiegel bei Patienten mit metastasierten Mammakarzinomen wieder finden kann (Singhal et al., 1997). Damit könnte OPN als leicht messbarer klinischer Tumormarker dienen, der die bisher bestehenden traditionellen Prognosekriterien ergänzt.

4.2 Carbonic anhydrase II

Verschiedene Studien konnten eine Verbindung zwischen einer veränderten CA II-Expression und der Entstehung von unterschiedlichen Tumoren erkennen. Die ursächlichen Mechanismen, durch die CA II über die Regulation des pH-Wertes an der Tumorentstehung teilnimmt, sind noch nicht eindeutig geklärt.

Es ist bekannt, dass Tumorzellen einen geringeren extrazellulären pH-Wert als Normalgewebe und eine größere Kapazität das extrazelluläre Milieu über die Laktatsäureproduktion und die membranöse H⁺-ATPase anzusäuern, aufweisen (Montcourrier et al., 1997; Lee and Tannock, 1998). Interaktionen zwischen Zellen und ihrer Umgebung fördern über einen geringen pH-Wert und einen veränderten hydrostatischen und oxygenetischen Druck das Tumorstadium (Helmlinger et al., 1997). Die veränderte proteolytische Aktivität bei niedrigem pH-Werte ist mitverantwortlich für die Förderung des metastatischen Phänotypes (Webb et al., 2001).

Expressionanalysen verschiedener humaner Tumore zeigten jedoch ein unterschiedliches Expressionsverhalten von CA II. Überexprimiert wurde CA II in Hirn-, Magen- und Pankreastumoren gefunden (Pakkila et al., 1995a; Pastrekova et al., 1997; Pakkila et al., 1995b), wohingegen Lungen-, Leber- und Kolontumore eine Unterexpression von CA II aufwiesen (Chiang et al., 2002; Kivela et al., 2001; Kuo et al., 2003; Bekku et al., 2000). Der Abfall der CA II-Expression korrelierte mit

Aggressivität des Tumors und dem Vorhandensein von synchronen Fernmetastasen (Bekku et al., 2000).

Die Analyse der 117 Kolonkarzinome ergab einen tumorstadienabhängigen Abfall der CA II-Expression. Die Validierung der Microarray-Analyse dieses Wnt-Targets war auch hier erfolgreich. Dabei zeigte sich schon in sehr frühen Tumorstadien eine deutliche Abnahme der CA II-Expression. Die quantitative PCR-Analyse konnte jedoch keinen deutlichen Unterschied hinsichtlich der CA II-Expression früher und fortgeschrittener Tumorstadien nachweisen. Im Gegensatz zu OPN, das nur in 23% aller Proben nicht differentiell reguliert war, lagen nur 3% aller Tumore ohne CA II-Unterexpression vor. Dies legt nahe, dass die CA II-Expression neben dem Wnt-Signalweg noch weitere Regulatoren hat. In insgesamt 97% aller Tumore nahm die CA II-Expression ab. Besonders im UICC Stadium I konnte man in allen untersuchten Tumoren einen CA II-Expressionsabfall finden, welches für eine Beteiligung von CA II an der Tumorinitiation spricht. 96-98% der Tumore der verbleibenden Tumorstadien unterexprimierten CA II.

Damit spielt die CA II-Unterexpression nicht nur bei Tumoren höherer Tumorstadien eine Rolle, sondern lässt sich auch schon in sehr frühen Tumorstadien nachweisen. Es zeigt sich auch hier der indirekte Hinweis auf eine Deregulation des Wnt-Signalweges schon in frühen Tumorstadien.

Hinsichtlich der Prognose bezüglich der Rezidivrate, der Mortalität und dem Überleben ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Dennoch scheint eine weitere Analyse bezüglich der tumorstadienabhängigen und prognosebezogenen Expression als sinnvoll, um nicht nur bestehende Tumormarker ergänzen zu können, sondern auch, wie die Entwicklung von CA II-Inhibitoren zeigte, neue Angriffspunkt für den Einsatz neuer Therapien anbieten zu können oder bestehende zu ergänzen.

Mit der Vorstellung, dass CA-Inhibitoren, wie Sulphonamid und Acetazolamid-ähnliche Inhibitoren, eine Ansäuerung des intratumoralen Milieus und eine verminderte Bereitstellung von HCO_3^- zur Nukleotidsynthese bewirken, zeigte sich bei der Behandlung von Leukämie-, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-, Ovarialkarzinom-, Melanom-, Nierenkarzinom- sowie Mammakarzinomzelllinien mit CA-Inhibitoren eine Verminderung des Zellwachstums (Chegwidden and Spencer 1995). Durch die Anhebung des pH-Werts in Geweben durch Verabreichung von CA-Inhibitoren ergibt sich zusätzlich die Möglichkeit modulierend die Wirksamkeit von Strahlen- und Chemotherapien in Geweben mit geringem pH-Wert zu verbessern (Teicher et al., 1993).

4.3 OPN und CA II Coexpression

Da der Nachweis einer Veränderung des Wnt-Signalweges über einen PTT-Assay (protein truncation test) experimentell aufwendig ist, sollte hier untersucht werden, ob durch die relativ einfache Analyse von Wnt-Zielgenen mittels quantitativer Real-time PCR eine Möglichkeit besteht, im klinischen Bereich individuelle Aussagen über eine Wnt-Mutation zu treffen. Betrachtet man die Expression der beiden Wnt-Zielgene gemeinsam, so zeigte sich im UICC Stadium I und II eine gemeinsame Deregulation in 75% aller Tumore, im UICC Stadium III in 67% und im UICC Stadium IV in 82% aller Tumore (Tabelle). Damit ergibt sich ein Hinweis auf eine frühe Aktivierung des Wnt-Signalweges in der Karzinogenese CRC. In lokal fortgeschrittenen Tumoren konnte man in 20% der Tumore noch keine OPN-Überexpression wiederfinden, obwohl CA II schon herabreguliert war. Wohingegen nur 15% der Tumore, die bereits Fernmetastasen gebildet hatten, keinen Anstieg der OPN-Expression zeigten, obwohl auch hier CA II unterexprimiert war. Die Analyse der gemeinsam

deregulierten Expression von OPN und CAII bestärkt die Ergebnisse der Expressionsanalyse der einzelnen Gene, denn hier wird die frühe Beteiligung von CA II und die späte Beteiligung von OPN bei der Entstehung von CRC deutlich.

Stadium I	Tumore gesamt	12	
	Tumore ohne OPN-Überexpression, aber mit CA II-Unterexpression	3	25%
	Tumore mit OPN-Überexpression und CA II-Unterexpression	9	75%
Stadium II	Tumore gesamt	48	
	Tumore ohne OPN-Überexpression, aber mit CA II-Unterexpression	10	21%
	Tumore mit OPN-Überexpression und CA II-Unterexpression	37	77%
Stadium III	Tumore gesamt	24	
	Tumore ohne OPN-Überexpression, aber mit CA II-Unterexpression	7	29%
	Tumore mit OPN-Überexpression und CA II-Unterexpression	15	63%
Stadium IV	Tumore gesamt	32	
	Tumore ohne OPN-Überexpression, aber mit CA II-Unterexpression	4	13%
	Tumore mit OPN-Überexpression und CA II-Unterexpression	27	84%

Tabelle 23: Gemeinsame Deregulation der Wnt-Zielgene OPN und CA II

4.4 MAD2L2

Mitosekontrollgene spielen eine große Rolle bei der Entstehung von Tumoren und Mutationen dieser Gene stellen in humanen Tumoren keine Seltenheit dar.

Als mitotisches Zellzykluskontrollgen löst MAD2L2 durch die Inhibition des APC-Komplexes (anaphase promoting complex) beim Übertritt der Zelle von der Meta- in die Anaphase eine Zellzyklusblockade, um eine exakte Zellteilung zu gewährleisten. Einen engen Zusammenhang zwischen der MAD2-Expression und einer Mitosekontrollpunktantwort zeigte sich in einem MAD2-Proteinexpression-induzierbaren System in Ovarialtumorzelllinien. Dabei führte die durch Ponasterone induzierbare MAD2-Expression zu einer Aktivierung der Kontrollpunktantwort, wohingegen es durch Reduktion des MAD2-Proteins zu einem Verlust der

Mitosenkontrollpunktkontrolle kam (Wang et al., 2002). In MAD2 knockout-Mäusen konnte man Chromosomenmissegregation beobachten (Dobles et al., 2000). Die Deletion von einem MAD2-Allel in humanen Kolonkarzinomzellen und embryonalen Fibroblasten erbrachte eine fehlerhafte Mitosekontrollpunktkontrolle. Nach heterozygoter Deletion von MAD2 entwickelten Mäuse nach einer langen Latenzzeit Lungentumore (Michel et al., 2001). Bei einer hohen Fehlerhaftigkeit von Mitosekontrollgenen in humanen Tumoren, werden MAD2-Genmutationen sehr selten beobachtet.

Die quantitative Real-time PCR-Analyse zeigte eine Überexpression von MAD2L2 in CRC und bestätigte das Ergebnis der Microarray-Analyse. Es zeigte sich ein diskreter tumorstadienabhängiger Anstieg der MAD2L2-Expression, mit einem signifikanten Unterschied der Genexpression im UICC Stadium IV zum Normalgewebe. Dabei fand sich nur in 63% aller untersuchten Tumore eine Hochregulation von MAD2L2. Den signifikanten Expressionsanstieg von MAD2L2 in Tumoren, die bereits Fernmetastasen gebildet hatte, sehen wir im Zusammenhang mit der steigenden Anzahl von Zellteilungsfehlern bei fortgeschrittenen Tumoren und der dadurch zunehmend Aktivierung von Mitosekontrollsystemen.

Damit scheint das Mitosekontrollgen MAD2L2 eine Rolle bei der Entstehung CRC besonders in höheren Tumorstadien zu spielen. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit dem Vogelstein-Modell, in dem die CIN besonders bei Tumoren höherer Tumorstadien an Bedeutung gewinnt. Es zeigte sich auch bei der Analyse von Magenkarzinomen besonders bei Patienten mit synchronen Metastasen ein Anstieg der hsMAD2 Proteinexpression (Tanaka et al., 2001).

Im Bezug auf Prognoseparameter hinsichtlich Rezidivrate und Mortalität ergab sich kein signifikanter Unterschied bei der MAD2L2-Expressionsanalyse. In der univariaten Überlebensanalyse erwies sich MAD2L2 jedoch als signifikanter

Einflussfaktor auf das Überleben der Patienten. In der multivariaten Überlebensanalyse stellte sich MAD2L2 jedoch nicht als unabhängigen Prognoseparameter heraus.

4.5 SASH1

Das über Expressionsanalysen identifizierte potentielle Tumorsuppressorgen SASH1 zeigte sich in Mammakarzinomen unterexprimiert. Die Unterexpression von SASH1 korrelierte mit schlechter Prognose sowie mit aggressiverem Tumorwachstum. Diese Unterexpression war in über 70% der untersuchten Tumore nachweisbar, so dass eine funktionelle Beteiligung von SASH1 bei der Karzinogenese solider Tumore vermutet wird. Zudem wurde in einer Auswahl anderer solider Tumore ebenso eine Herabregulierung von SASH1 gefunden. Die genaue Funktion von SASH1 ist noch ungeklärt, es scheint aber als Signaladaptermolekül eine Rolle bei der Karzinogenese zu spielen (Zeller et al., 2003).

SASH1 zeigte sich nicht nur im Tiermodell bei Darmtumoren differentiell reguliert, sondern es ließ sich auch ein LOH von SASH1 nachweisen (eigene unveröffentlichte Beobachtung). Die Analyse von 117 humanen Kolonkarzinomen unterschiedlicher Tumorstadien ergab einen tumorstadienabhängigen Abfall der Expression von SASH1. Dabei lag der Anteil SASH1-unterexprimierender Tumore bei 91%. In frühen Tumorstadien zeigte sich bei 92-100% aller Tumore eine SASH1-Unterexpression, bei fernmetastasierten Tumoren lag der Anteil SASH1 unterexprimierender Tumore jedoch nur bei 77%. Damit scheint die SASH1-Unterexpression besonders in frühen Tumorstadien bei der Entstehung und dem Wachstum von CRC eine Rolle zu spielen.

Hinsichtlich der Prognose erlangt SASH1 erst in späten Tumorstadien Bedeutung, welches sich in dem signifikanten Unterschied der SASH1-Expression bei metachron

metastasierten Patienten und bei progredienten metachronen Metastasen zeigte. Bezüglich der Mortalität ließ sich aber kein signifikanter Unterschied erkennen. In der multivariaten Überlebensanalyse zeigte sich SASH1 neben dem Auftreten von Rezidiven, dem Vorhandensein von Lymphangiosis und dem Grading als unabhängiger Prognoseparameter mit einem relativen Risiko von 1,07.

Aufgrund des hohen Anteils SASH1-unterexprimierender Tumore und des tumorstadienabhängigen Expressionsabfalls scheint SASH1 wohl eine entscheidende Rolle bei der Entstehung CRC, besonders in frühen Tumorstadien, zu spielen. Die Expression des neuartigen Tumorsuppressor SASH1 erweist sich zudem als prognostischer Parameter bezüglich der Metastasierungsrate und des Überlebens.

5 Zusammenfassung

Bei den drei Targets der Transkriptomstudie, gelang eine Validierung des Microarray-Befundes, sowie eine Präzisierung über der Regulation der Genexpression in unterschiedlichen Tumorstadien.

5.1 OPN

Die quantitative Genexpressionsanalyse zeigte besonders in fortgeschrittenen Tumorstadien eine gesteigerte tumorstadienabhängige Expression. Bezüglich der OPN-Expression als Prognoseparameter hinsichtlich der Rezidivrate, der Mortalität und des Überlebens ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen.

OPN scheint neben der Metastasierung von Tumoren bereits in frühen Tumorstadien eine Rolle bei der CRC Entstehung zu spielen.

Die Analyse der Genexpression mittels quantitative Real-time PCR ergab den indirekten Hinweis auf eine Deregulation des Wnt-Signalweges auch schon in frühen Tumorstadien.

5.2 CA II

Schon bei Tumoren früher Tumorstadien ließ sich eine Unterexpression von CA II finden und damit ein indirekter Hinweis auf eine frühe Deregulation des Wnt-Signalweges bei CRC.

Hinsichtlich der Prognose bezüglich der Rezidivrate, der Mortalität und dem Überleben ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Klinisches Interesse an der Expression von CA II besteht nicht nur aufgrund der tumorstadienabhängigen Expression, sondern auch aufgrund der Möglichkeiten der therapeutischen Konsequenzen.

Der Nachweis einer Deregulation der beiden Wnt-Targets OPN und CA II erlaubt möglicherweise einen experimentell leicht zugänglichen Hinweis auf eine Wnt-Signalstörung.

5.3 MAD2L2

Das Mitosekontrollgen MAD2L2 spielt vermutlich in Übereinstimmung mit dem Vogelstein-Modell in Tumoren höherer Tumorstadien eine Rolle bei der Entstehung der CIN.

Im Bezug auf Prognoseparameter hinsichtlich Rezidivrate und Mortalität ergab sich kein signifikanter Unterschied bei der MAD2L2-Expressionsanalyse. In der univariaten Überlebensanalyse erwies sich die MAD2L2-Expression jedoch als signifikanter Einflussfaktor auf das Überleben der Patienten.

5.4 SASH1

SASH1 stellt ein neuartiges, potentielles Tumorsuppressorgen dar. Befunde in Mammakarzinomen und in Tiermodellen für CRC legen eine mögliche Rolle des Tumorsuppressors SASH1 als Signaladapterprotein aus der Sly-Familie nahe (Beer et al., 2001). Die Analyse der 117 humanen Kolonkarzinome mit einem hohen Anteil SASH1-unterexprimierender Tumore und einer tumorstadienabhängigen Genexpression, weisen auf eine Rolle von SASH1 als Tumorsuppressor bei der CRC Entstehung hin.

Schon in frühen Tumorstadien der untersuchten humanen Kolonkarzinome konnte eine Unterexpression von SASH1 gefunden werden. Prognostische Bedeutung erlangt SASH1 bezüglich der Metastasierungsrate und des Überlebens.

Der Grund für eine Herabregulation von SASH1 könnte in Mutationen, einem LOH oder einer Promotormethylierung liegen.

6 Ausblick

6.1 Wnt-Zielgene OPN und CA II

Der methodisch relativ einfache Nachweis einer OPN- und CA II-Deregulation mittels quantitativer Real-time PCR ergab Hinweise auf eine frühe Aktivierung des Wnt-Signalweges bei der CRC Entstehung. Da eine gemeinsame Deregulation von CA II und OPN jedoch nur in 67-82% der Tumore nachgewiesen werden konnte, sollte die Übereinstimmung der OPN- und CA II-Deregulation mit der tatsächlichen Wnt-Aktivierung überprüft werden. Ein veränderter Wnt-Signalweg könnte zum Beispiel über den immunhistochemischen Nachweis von nucleärem β -Catenin in Tumorzellen detektiert werden.

6.1.1 OPN

Die Expressionsanalyse von OPN zeigte besonders im UICC Stadium IV einen signifikanten Anstieg der OPN-Expression. Damit ist OPN ein potentieller Marker für Tumore fortgeschrittener Tumorstadien. Da OPN auch im Serum nachweisbar ist, könnte über einen ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) die Bestimmung von OPN aus dem peripheren Blut erfolgen.

6.1.2 CA II

Insgesamt 97% aller untersuchten Kolonkarzinome wiesen eine Deregulation von CA II auf, aber nur bei 77% der untersuchten Karzinome ließ sich eine OPN-Deregulation nachweisen. Damit ergibt sich ein Hinweis auf eine mögliche zusätzlich Regulation von CA II außerhalb des Wnt-Signalweges, die untersucht werden sollte.

6.2 MAD2L2

Da besonders Tumore fortgeschrittener Tumorstadien eine MAD2L2-Überexpression aufwiesen und auch CIN gerade bei fortgeschrittenen Tumoren eine bedeutende Rolle spielt, sollte eine Korrelation der MAD2L2-Deregulation und dem Auftreten von CIN untersucht werden.

6.3 SASH1

Neben der Aufklärung der Funktion von SASH1 sollten weitere Analysen folgen, die die Ursachen der Deregulation des neuartigen Tumorsuppressorgens wie SASH1-Mutationen, LOH und die Promotormethylierung untersuchen.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACF	aberrant crypt foci
APC	adenomatous polyposis coli
CA	carbonic anhydrase
cdc2	cell division cycle gene 2
cdk2	cyclin dependent kinase 2
cDNA	complementary DNA
CIN	chromosomale Instabilität
CK1	Casein Kinase 1
CRC	Kolorektales Karzinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dvl	Dishevelled
FAP	familiäre adenomatöse Polypose
Fz	Frizzled
GBP	GSK 3 β binding protein
GAP	GTPase-Aktivierungsprotein
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
HNPCC	Hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinome
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
Lef	lymphoid enhancing factor
LOH	loss of heterozygosity
LRP	Low density lipoprotein receptor related protein
MAD2	Mitotic arrest-deficient 2

MAD2L2	Mitotic arrest-deficient homolog-like 2
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
OPN	Osteopontin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RR	Ribonukleotid Reduktasen
SASH1	SAM and SH ₃ domain containing 1
SAM	sterile α module
SH ₃	Src homology domain 3
Tcf	T-cell factor
Wnt	Wingless-type MMTV interaction site family member

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Histologie HE-Färbung
a.) Kolonnormalschleimhaut b.) Adenom c.) Karzinom
- Abbildung 2: Adenom-Karzinomsequenz nach Fearon und Vogelstein
- Abbildung 3: Wnt-Signalweg in der Embryonalphase und der normalen Zelle
- Abbildung 4: Wnt-Signalweg in Tumorzellen
- Abbildung 5: Immunhistologie β -Catenin
a.) Normalschleimhaut b.) Karzinom
- Abbildung 6: relative OPN-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)OPN-(N-T)HPRT)}$)
- Abbildung 7 : relative OPN-Expression von Tumoren mit OPN-Hochregulation
($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)OPN-(N-T)HPRT)}$)
- Abbildung 8: relative CA II-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)CA\ II-(N-T)HPRT)}$)
- Abbildung 9: relative MAD2L2-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)MAD2L2-(N-T)HPRT)}$)
- Abbildung 10 : relative MAD2L2-Expression von Tumoren mit MAD2L2-
Überexpression ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)MAD2L2-(N-T)HPRT)}$)
- Abbildung 11: relative SASH1-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)SASH1-(N-T)HPRT)}$)
- Abbildung 12: relative Expression von Tumoren mit SASH1-Unterexpression
($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)SASH1-(N-T)HPRT)}$)

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Tumorlokalisierung
Tabelle 2:	Operationsverfahren
Tabelle 3:	relative OPN-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)OPN-(N-T)HPRT)}$)
Tabelle 4:	Mann-Whitney-U-Test OPN-Expression
Tabelle 5:	relative OPN-Expression von Tumoren mit OPN-Hochregulation ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)OPN-(N-T)HPRT)}$)
Tabelle 6:	Mann-Whitney-U-Test OPN-Expression OPN überexprimierender Tumore
Tabelle 7:	relative CA II-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)CA\ II-(N-T)HPRT)}$)
Tabelle 8:	Mann-Whitney-U-Test CA II-Expression
Tabelle 9:	relative MAD2L2-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)MAD2L2-(N-T)HPRT)}$)
Tabelle 10:	Mann-Whitney-U-Test MAD2L2-Expression
Tabelle 11:	relative MAD2L2-Expression von Tumoren mit MAD2L2- Überexpression ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)MAD2L2-(N-T)HPRT)}$)
Tabelle 12:	Mann-Whitney-U-Test MAD2L2-Expression MAD2L2 überexprimierender Tumore
Tabelle 13:	relative SASH1-Expression ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)SASH1-(N-T)HPRT)}$)
Tabelle 14:	Mann-Whitney-U-Test SASH1-Expression
Tabelle 15:	relative SASH1-Expression von Tumoren mit SASH1- Herabregulation ($2^{\Delta\Delta Ct((N-T)SASH1-(N-T)HPRT)}$)
Tabelle 16:	Mann-Whitney-U-Test SASH1-Expression SASH1 unterexprimierender Tumore
Tabelle 17:	Prognostische Bedeutung hinsichtlich der Rezidivrate
Tabelle 18:	Prognostische Bedeutung hinsichtlich der Lokal-, Lymphknoten- und Peritonealrezidivrate

Tabelle 19:	Prognostische Bedeutung hinsichtlich der Metastasierungsrate
Tabelle 20:	Prognostische Bedeutung hinsichtlich der Todesrate
Tabelle 21:	univariate Überlebensanalyse
Tabelle 22:	multivariate Überlebensanalyse
Tabelle 23:	Gemeinsame Deregulation der Wnt-Zielgene OPN und CA II

9 Literatur

Agrawal et al., 2002. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D and Yeatman TJ. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst* (2002), 94(7):513-521

Agrawal et al., 2003. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D and Yeatman TJ. Osteopontin identified as colon cancer tumor progression marker. *C R Biol* (2003), 326:1041-3

Amit et al., 2002. Amit S, Hatzubai A, Birman Y et al.; Axin-mediated CK1 phosphorylation of beta-catenin at Ser 45 : a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* (2002), 16:1066-1076

Baldus et al., 2004. Baldus SE, Mönig SP, Huxel S, Landsberg S, Hanisch FG, Engelmann K, Schneider PM, Thiele J, Hölscher AH and Dienes HP. MUC1 and nuclear β -Catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumour prognosis. *Clin Cancer Res* (2004), 10:2790-2796

Baker et al., 1990. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S and Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17q allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* (1990), 50:7717

Bates S and Vousden KH, 1996. p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* (1996), 6:12-18

Beer et al., 2001. Beer S, Simins AB, Schuster A and Holzmann B. Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells. *BBA Gene Struct Expr* (2001), 1520:89-93

Behrens et al., 1998. Behrens J, Jerechow BA and Wurtele M. Functional interaction of an axin homolog, conductin with beta-catenin, APC and GSK3beta. *Science* (1998), 280:596-599

Bekku et al., 2002. Bekku S, Mochizuki H, Yamamoto T, Ueno H, Takayama E and Takayama T. Expression of carbonic anhydrase I or II and correlation to clinical aspects of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* (2000), 34:998-1001

Bondi et al., 2004. Bondi J, Bukholm G, Nesland JM and Bukholm IRK. Expression of non-membranous beta-catenin and gamma-catenin, c-Myc and cyclin D1 in relation to patient outcome in human colon adenocarcinomas. *Apmis* (2004), 112(1):49

Bos et al., 1987. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ and Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* (1987), 327:293-297

Brabletz et al., 1999. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F and Kirchner T. Beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* (1999), 155:1033-1038

Bronner et al., 1994. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, Tannergard P, Bollag RJ, Godwin AR, Ward DC, Nordenskjold M, Fishel R, Kolodner R and Liskay RM. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* (1994), 368:258-261

Bush JA and Li G, 2002. Cancer Chemoresistance: The relationship between p53 and multidrug transporters. *Int J Cancer* (2002), 98:323-330

Cahill et al., 1998. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW and Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* (1998), 392:300-303

Cahill et al., 1999. Cahill DP, da Costa LT, Carson-Walter EB, Kinzler KW, Vogelstein B and Lengauer C. Characterization of MAD2B and other mitotic spindle checkpoint genes. *Genomics* (1999), 58(2):181-187

Chambers et al., 1996. Chambers AF, Wilson SM, Kervliet N, O'Malley FP, Harris JF and Casson AG. Osteopontin expression in lung cancer. *Lung Cancer* (1996), 15:311-323

Chung et al., 2001. Chung GG, Provost E, Kielhorn EP, Charette LA, Smith BL and Rimm DL. Tissue microarray analysis of beta-catenin in colorectal cancer shows nuclear phosphor- β -Catenin is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res* (2001), 7:4013-4020

Cassidy et al., 2004. Cassidy J, Tabernero J, Twelves C, Brunet R, Butts C, Conroy T, Debraud F, Figuer A, Grossmann J, Sawada N, Schoffski P, Sobrero Van Cutsem E and Diaz-Rubio E. XELOX (capecitabine plus oxaliplatin): active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* (2004), 22(11):2084-91

Cavallo et al., 1998. Cavallo RA, Cox RT, Moline MM, Polevoy GA, Clevers H, Peifer M and Bejsovec A. Drosophila Tcf and Groucho interact to repress wingless signalling activity. *Nature* (1998), 395(6702):604-608

Chegwidden WR and Spencer IM, 1995. Sulphonamide inhibitors of carbonic anhydrase inhibit the growth of human lymphoma cells in culture. *Inflammopharmacol* (1995), 3:231-239

Chegwidden et al., 2000. Chegwidden WR, Dogson SJ and Spencer IM. The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals. Chegwidden WR, Carter ND, Edwards YH, Editors, *The carbonic anhydrases new horizons* (2000), pp. 343-363, Switzerland

Chiang et al., 2001. Chiang WL, Chu SC, Lai JC, Yang SF, Chioua HL and Hsieh YS. Alternations in quantities and activities of erythrocyte cytosolic carbonic anhydrase

isoenzymes in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient individuals. *Clin Chim Acta* (2001), pp. 195-201

Chiang et al., 2002. Chiang WL, Chu SC, Yang SS, Li MC, Lai JC, Yang SF, Chiou HL and Hsieh JS. The aberrant expression of cytosolic carbonic anhydrase and its clinical significance in human non-small cell lung cancer. *Cancer letters* (2002), 188(1-2):199-205

Conacci-Sorrell et al., 2002. Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtutman M, feinstein E, Einat P and Ben-Ze'ev A. Nr-cam is a target of beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev* (2002), 16(16):2058-2072

Coppola et al. 2004, Coppola D, Szabo M, Boulware D, Muraca P, Alsarraj M, Chambers AF and Yeatman TJ. Correlation of Osteopontin Proteinexpression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clin Cancer Res* (2004), 10(1):184-190

Crandall ED and O`Brasky JE, 1978. Direct evidence of participation of rat lung carbonic anhydrase in CO₂ reactions. *J Clin Invest* (1978), pp. 618-622

Crawford et al., 1999. Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P and Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* (1999), 18:2883-2891

Denhardt et al., 1995. Denhardt DT, Lopez CA, Rollo EE, Hwang SM, An XR and Walther SE. Osteopontin-induced modifications of cellular functions. *Ann N Y Acad Sci* (1995), 760:127-42

Denhardt et al., 2003. Denhardt DT, Mistretta D, Chambers AF, Krishna S, Porter JF, Raghuram S and Rittling SR. Transcriptional regulation of osteopontin and the metastatic phenotype: evidence for a Ras-activated enhancer in the human OPN promoter. *Clin Exp Metastasis* (2003), 20:77-84

Ding et al., 2002. Ding L, Zheng S and Cao J. Expression of Osteopontin mRNA and its protein in colorectal cancer and liver metastatic tissues. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (China)* 2002, 82(14):970-973)

Dobles et al., 2000. Dobles M, Liberal V, Scott ML, Benezra R, and Sorger PK. Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* (2000), 101:635-645

Dodgson et al., 1984. Dodgson SJ, Forster RE II and Storey BT. The role of carbonic anhydrase in hepatocyte metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1984), pp. 516-524

Efstathiou et al., 1999. Efstathiou JA, Liu D, Wheeler JMD, Kim HC, Beck NE, Ilyas M, Karayiannakis AJ, McC.Mortensen NJ, Kmiot W, Playford RJ, Pignatelli M and Bodmer WF. Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natal Acad Sci USA* (1999), 96:2316-2321

El-Deiry WS, 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Semin. Cancer Biol* (1998), 8:345-357

Fang et al., 1998a. Fang G, Yu H and Kirschner MV. Direct binding of DC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in Mitosis and G1. *Mol Cell* (1998a), 2:163-171

Fang et al., 1998b. Fang G, Yu H and Kirschner MV. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator Cdc20 from a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes & Dev* (1998), 12:1871-1883

Fearon ER und Vogelstein BA, 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* (1990),61:759-767

Feng et al., 1995. Feng B, Rollo EE and Denhardt DT. Osteopontin (OPN) may facilitate metastasis by protecting cell lines from macrophage NO-mediated cytotoxicity. Evidence from cell lines down-regulated for OPN expression by a targeted ribozyme. *Clin Exp Metastasis* (1995), 13:453-462

Fishel et al., 1993. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M and Kolodner R. The human gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* (1993), 75(5):1027-1038

Fodde et al., 2001. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH and Clevers H. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* (2001), 3 :433-438

Forrester et al., 1987. Forrester K, Almoguera C, Han K, Gizzle WE and Perucho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* (1987); 327:298-303

Fleming et al., 1994. Fleming RE, Moxley MA, Waheed A, Crouch EC, Sly WS and Longmore WJ. Carbonic anhydrase II expression in rat type II pneumocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* (1994), pp. 499- 505

Fraser et al., 2002. Fraser E, Young N, Dajani R, Franca-Koh J, Ryves J, Williams RSB, Yeo M, Webster MT, Richardson C, Smalley MJ, Pearl LH, Harwood A and Dale TC. Identification of the Axin and Frat binding region of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* (2002), 277:2176-2185

Friederichs et al., 2004. Friederichs J, Rosenberg R, Mages J, Janssen KP, Mäckl C, Nekarda H, Holzmann B and Siewert JR. Microarray analysis of colonic mucosa and different clinical stages of colorectal carcinoma: towards a molecular genetic understanding of tumorprogression. *Int J Col Dis*, angenommen zur Veröffentlichung (2004)

Gemma et al., 2001. Gemma A, Hosoya Y, Seike M, Uematsu K, Kurimoto F, Hibino S, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S and Emi M. Genomic structure of the human

MAD2 gene and mutation analysis in human lung and breast cancers. *Lung Cancer* (2001), 32:289-295

Gotz C et Montenarh M, 1996. p53: DNA damage, DNA repair, and apoptosis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* (1996), 127:65-95

Greger et al. 1997. Greger R, Bleich M, Leipziger J, Ecke D, Mall M and Kunzelmann K. Regulation of ion transport in colonic crypts. *News Physiol Sci* (1997), 12:62-66

Groden et al., 1991. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L and Robertson M. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* (1991), 66(3):589-600

Guacci et al., 1994. Guacci V, Hogan E and Koshland D. Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J Cell Biol* (1994), 125(3):517-530

Hardwick et al., 1996. Hardwick KG, Weiss E, Luca FC, Winey M and Murray AW. Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science* (1996), 273(5277):953-956

Hausinger D and Gerok W, 1985. Hepatic urea synthesis and pH regulation. Role of CO₂, HCO₃⁻, pH and the activity of carbonic anhydrase. *European Journal of Biochemistry* (1985), 2:381-386

He et al., 1997. He X, Patterson PE and Sazer S. The *Schizosaccharomyces pombe* spindle checkpoint mad2p blocks anaphase and genetically interacts with the anaphase-promoting complex. *Cell Biol* (1997), 94:7965-7970

He et al., 1998. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW. Identification of c-Myc as a target of the APC pathway. *Science* (1998), 281:1509-1512

Helmlinger et al., 1997. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M and Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* (1997), pp. 177-182

Henry et al., 1986. Henry RP, Dodgson SJ, Forster RE and Storey BT. Rat lung carbonic anhydrase: activity, localization and isozymes. *J Appl Physiol* (1986), pp. 638-645

Hernando et al., 2001. Hernando E, Orlov I, Liberal V, Nohales G, Benezra R and Cordon-Cardo C. Molecular analyses of the mitotic checkpoint components hMAD2, hBUB1 and hBUB3 in human cancer. *Int J Cancer* (2001), 95:223-227

Huang et al., 2000. Huang LW, Garrett AP, Muto MG, Colitti CV, Bell DA, Welch WR, Berkowitz RS and Mok SC. Identification of a novel 9 cM deletion unit on chromosome 6q23-24 in papillary serous carcinoma of peritoneum. *Hum Pathol* (2000), 31(3):367-373

Huber AH and Weis WI, 2001. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* (2001), 105:391-402

Hulsken et al., 1994. Hulsken J, Birchmeier W and Behrens J. E-cadherin and APC compete for interaction with the beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* (1994), 127:2061-2069

Imai et al., 1999. Imai Y, Shiratori Y, Kato N, Inoue T and Omata M. Mutational inactivation of mitotic checkpoint genes, hSMAD2 and hBUB1, is rare in sporadic digestive tract cancers. *Jpn J Cancer Res* (1999), 90:837-840

Janssen et al., 2002. Janssen KP, El Marjou F, Pinto D, Sastre X, Rouillard D, Fouquet C, Soussi T, Louvard D and Robine S. Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* (2002), 123:492-504

Janssen KP, 2003. Murine models of colorectal cancer: studying the role of oncogenic K-ras. *Cell Mol Life Sci* (2003), 60(3):495-506

Jen et al, 1994. Jen j, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B and Kinzler KW. Molecular determinations of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* (1994), 54(21):5523-5526

Kaplan et al., 2001. Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK and Nathke IS. A role for the adenomatous polyposis coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* (2001), 3:429-432.

Kawasaki et al., 2000. Kawasaki Y, Senda T, Ishidate T, Koyama R, Iwayama Y, Higuchi O and Akiyama T. Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* (2000), 289:1194-1197

Kinzler et al., 1991. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy D KJ, Preisinger AC, Hedge P and McKechnie. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* (1991), 253(5020):661-665

Kivela et al., 2001. Kivela AJ, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivela J, Pakkila AK, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Parkkila TS and Rajaniemi H. Differential expression of cytoplasmatic carbonic anhydrase, CA I and CA II, and membrane-associated isozymes, CA IX and XII, in normal mucosa of large intestine and in colorectal tumors. *Digestive Diseases and Sciences* (2001), 10:2179-2186

Kinzler KW and Vogelstein B, 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* (1996), 87:159-170

Koh et al., 2000. Koh TJ, Bulita CJ, Fleming JV, Dockray GJ, Varro A and Wang TC. Gastrin is a target gene of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *J Clin Invest* (2000), 106:533-9

Kuo et al., 2003. Kuo WH, Chiang WL, Yang SF, Yeh KT, Yeh CM, Hsieh Y and Chu SC. The differential expression of cytosolic carbonic anhydrase in human hepatocellular carcinoma. *Life Sc* (2003), 73:2211-23

Kunzelmann and Mall 2002. Electrolyte Transport in the mammalian Colon: Mechanisms and Implications for Disease. *Physiol Rev* (2002), 82:245-289

Lawrie et al., 2004. Lawrie LC, Dundas SR, Curran S and Murray GI. Liver fatty binding protein expression in colorectal neoplasia. *Br J Cancer* (2004), 90(10):1955-1960

Lee and Tannock, 1998. Lee AH and Tannock IF, Heterogeneity of intracellular pH and of mechanisms that regulate intracellular pH in populations of cultured cells. *Cancer Research* (1998), 9:1901-1908

Li R and Murray AW, 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* (1991), 66:519-531

Li et al., 1997. Li Y, Gorbea C, Mahaffey D, Rechsteiner M and Benezra R. MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc Natl Acad Sci* (1997), 94:12431-12436

Li et al., 2002. Li X, Alvarez B, Casey JR, Reithmeier RA, Fliegel L. Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na⁺, H⁺ exchanger. *J Biol Chem* (2002), 277:36085-91

Liu et al., 2002. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg G, Tan Y, Zhang Z, Lin X and He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* (2002), 108:837-847

Luongo et al., 1994. Luongo C, Moser AR, Geldhill S and Dove WF. Loss of APC⁺ in intestinal adenomas from Min mice. *Cancer Res* (1994), 54(22):5947-5952

Lustig et al., 2002. Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag M, Birchmeier W and Behrens J. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* (2002), 22:1184-93

Mann et al., 1999. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ and Hanski C. Target genes of beta-catenin-T-cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999), 96:1603-1608

Manoukian AS and Woodgett JR, 2002. Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways. *Adv. Cancer Res* (2002), 84:203-229

Marra G and Boland CR, 1995. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* (1995), 87:1114-1125

- Meek DW, 2004. The p53 response to DNA damage. *DNA Repair*. Amst (2004), 3(8-9):1049-56
- Michel et al., 2001. Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, Kirchwegger R, Pasche B, Gerald W, Dobles M, Sorger PK, Murty VV and Benezra R. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* (2001), 409:355-359
- Miwa et al., 2000. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y and Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* (2000), 12:469-474
- Montcourrier et al., 1997. Montcourrier P, Silver I, Farnoud R, Bird I and Rochefort H. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clinical and Experimental Metastasis* 4 (1997), pp. 382-392
- Mori et al., 1993. Mori M, Staniunas RJ, Barnard GF, Jessup JM, Steele GD Jr and Chen LB, The significance of carbonic anhydrase expression in human colorectal cancer. *Gastroenterology* (1993)
- Morin et al., 1996a. Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW, Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* (1996), 93:7950
- Morin et al., 1996b. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B and Kinzler KW. Activation of beta-Catenin-Tcf Signaling in colon cancer by mutations in beta-Catenin or APC. *Science* (1996), 275:1787-1790
- Nishisho et al., 1991. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S and Hedge P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal patients. *Science* (1991), 253(5020):665-669
- O'Connell MJ, 2001. North Central Cancer Treatment Group- Mayo Clinic trials in colon cancer. *Semin Oncol* (2001), 28(1 Suppl 1):4-8
- O'Regan A and Berman JS, 200. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation, Immunohistochemical demonstration of human carbonic anhydrase isoenzyme II in brain tumours. *Int J Exp Pathol* (2000), 81(6):373-390
- Ohshima et al., 2002. Ohshima S, Yamaguchi N, Nishioka K, Mima T, Ishii T, Umeshita-Sasai M, Kobayashi H, Shimizu M, Katada Y, Wakitani S, Murata N, Nomura S, Matsuno H, Katayama R, Kon S, Inobe M, Ude T, Kawasw I and Saeki Y. Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints. *J Rheumatol* (2002), 29:2061-2067
- Parkkila et al., 1994. Parkkila S, Parkkila AK, Juvonen T and Rajaniemi H. Distribution of carbonic anhydrase isoenzymes I, II and VI in the human alimentary tract. *Gut* 5 (1994), pp. 646-650

Parkkila et al., 1995a. Parkkila AK, Herva R, Parkkila S and Rajaniemi H. Immunohistochemical demonstration of human carbonic anhydrase isoenzyme II in brain tumours. *Histochemical Journal* 12 (1995), pp. 282-974

Parkkila et al., 1995b. Parkkila S, Parkkila AK, Juvonen T, Lehto VP and Rajaniemi H. Immunohistochemical demonstration of the carbonic anhydrase I and II in pancreatic tumours. *Histochemical Journal* 2 (1995), pp. 133-138

Parkkila S and Parkkila AK, 1996. Gastrointestinal carbonic anhydrases. *Duodecim* (1996), 112:2383-8

Percy et al., 2000. Percy MJ, Myrie KA, Neeley CK, Azim JN, Ethier SP and Petty EM. Expression and mutational analyses of the human MAD2L1 gene in breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* (2000), 29:356-362

Petrow et al., 2000. Petrow PK, Hummel KM, Schedel J, Franz JK, Klein CL, Muller-Landner U, Kriegsmann J, Chang PL, Prince CW, Gay RE and Gay S. Expression of osteopontin messenger RNA and protein in rheumatoid arthritis: effects of osteopontin on the release of collagenase 1 from articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* (2000), 43:1597-1605

Pfleger et al., 2001. Pfleger CM, Salic A, Lee E and Kirschner MW. Inhibition of Cdh1-APC by the MAD2-related protein MAD2L2: a novel mechanism for regulating Cdh1. *Genes Dev* (2001), 15(14):1759-1764

Rajendran VW and Binder HJ, 2002. Characterization and molecular localization of anion transport in colonic epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* (2000), 915:15-29

Ribic et al., 2003. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French A, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M and Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant therapy for colon cancer. *N Engl J Med* (2003), 349:247-257

Rittling et al., 2002. Rittling SR, Chen Y, Feng F and Wu Y. Tumour-derived osteopontin is soluble, not matrix associated. *J Biol Chem* (2002), 277:9175-9182

Roose et al., 1998. Rosse J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, van de Wetering M, Destree O and Clevers H. The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* (1998), 395(6702):608-612

Rothenberg ML, 2004. Current status of second-line therapy for metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* (2004), 4 Suppl 1:S16-21

Rudland et al., 2002. Rudland P, Platt-Higgins A, El-Tanani M, Rudland S, Baraclough R, Winstanley J, Howit R and West C. Prognostic significance of the metastasis-associated protein Osteopontin in human breast cancer. *Cancer Res* (2002), 62:3417-3427

Ryan et al., 1982. Ryan US, Whitney PL, and Ryan JW. Localization of carbonic anhydrase on pulmonary artery endothelial cells in culture. *J Appl Physio: Respir., Environ. Exerc. Physiol* (1982), pp. 914-919

Shtutman et al., 1999. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R and Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999), 96:5522-5527

Singhal H et al., 1997. Singhal H, Bautista DS, Tonkin KS, O'Malley FP, Tuck AB, Chambers AF and Haris JF. Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res* (1997), 3:605-11

Sly et al., 1983. Sly WS, Hewett-Emmett D, Whyte MP, Yu YSL and Tashian RE. Carbonic anhydrase II deficiency identified as primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl Acad Sci USA* (1983), pp. 2752-2756

Sly and Hu, 1995a. Sly WS and Hu PY. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry* (1995), pp. 375-401

Sly and Hu, 1995b. Sly WS and Hu PY. The carbonic anhydrase II deficiency syndrome: osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Vale S, Editors, *The molecular and Metabolic Bases of Inherited Disease* (7th ed.), McGraw-Hill, New York (1995), pp. 4113- 4124

Stallmach et al., 2002. Stallmach I, Zenklusen P, Komminoth P, Schmid S, Perren A, Roos M, Jianming Z, Heitz PU and Pfaltz M. Loss of heterozygosity at chromosome 6q23-25 correlates with clinical and histologic parameters in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Virchows Arch* (2002), 440(1):77-84

Sterling et al. 2001. Sterling D, Reithmeier RA and Casey JR. A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/ bicarbonate exchangers. *J Biol Chem* (2001), 276:47886-47894

Stone et al., 2002. Stone CD, Chen ZY and Tseng CC. Gut-enriched Kruppel-like factor regulates colonic cell growth through APC/beta-catenin pathway. *FEBS Lett* (2002), 530(1-3):147-152

Takahashi et al., 1999. Takahashi T, Haruki N, Nomoto S, Masuda A, Saji S, Osada H and Takahashi T. Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and p55CDC, in human lung cancers. *Oncogene* (1999), 18:495-4300

Takeichi M, 1993. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol* (1993), 5(5):806-811

Tanaka et al., 2001. Tanaka K, Nishioka J, Kato K, Nakamura A, Mouri T, Miki C, Kusunoki M and Nobori T. Mitotic checkpoint protein hsMAD2 as a marker predicting liver metastasis of human gastric cancers. *Jpn J Cancer Res* (2001), 92(9):952-958

Teicher et al., 1993. Teicher BA, Liu SD, Liu JT, Holden SA and Herman TS. A carbonic anhydrase inhibitor as a potential modulator of cancer therapies. *Anticancer Res* (1993), 13:1549-1556.

Tetsu O and McCormick F, 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* (1999), 398:422-426

Thorstensen L and Lothe RA. The Wnt signaling pathway and its role in human solid tumors. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*

Tirrkonen et al., 1998. Tirrkonen M, Tanner M, Karhu R, Isola J and Kallioniemi OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* (1998), 21(3):177-184

Tuck et al., 1998. Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Harris JF, Tonkin KS, Kervliet N, Saad Z, Doig GS and Chambers AF. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer* (1998), 79:502-8

Tuck et al., 1999. Tuck AB, Arsenault DM, O'Malley FP, Hota C, Ling MC, Wilson SM and Chambers AF. Osteopontin induces invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells. *Oncogene* (1999), 18:4237-46

Tuck AB and Chambers AF, 2001. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies. *J of Mammary Gland Biology and Neoplasia* (2001), 4:419-429

Tuveson et al, 2004. Tuveson DA, Shaw AT, Willis NA, Silver DP, Jackson EL, Chang S, Mercer KL, Grochow R, Hock H, Crowley D, Hingorani SR, Zaks T, King C, Jacobetz MA, Wang L, Bronson RT, Orkin SH, De Pinho RA and Jacks T. Endogenous oncogenic K-ras (g12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell* (2004), 5(4):375-387

Vogelstein B and Kinzler KW, 1998. The genetic basis of human cancer. Vogelstein Bert and Kinzler Kenneth W., Editors, McGraw-Hill Companies, Inc., 1998, 31:569

Wang et al., 2000. Wang X, Jin DY, Wong YC, Cheung AL, Chun AC, Lo AK, Liu Y and Tsao SW. Correlation of defective mitotic checkpoint with aberrantly reduced expression of MAD2 protein in nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis* (2000), 21(12):2293-2297

Wang et al., 2002. Wang X, Jin DY, Raymond WM Ng, Feng H, Wong YC, Cheung ALM and Tsao SW. Significance of MAD2 Expression to Mitotic Checkpoint Control in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research* (2002), 62:1662-1668

Webb et al., 1999. Webb SD, Sherratt JA and Fish RG. Mathematical modelling tumour acidity: Regulation of intracellular pH. *J theor Biol* (1999), 196:237-250

Webb et al., 2001. Webb SD, Sherratt JA and Fish RG. Modelling tumour acidity and invasion. *Novartis Found Symp* 2001, 240:169-181; discussion 181-5

Wielenga et al., 1999. Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H and Pals ST. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* (1999), 154:515-523

Willert K and Nusse R, 1998. Beta-catenin—a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* (1998), 8:95-102

Yan et al., 2001. Yan D, Wiesmann M, Rohan M, Can V, Jefferson AB, Guo L, Sakamoto D, Caothien RH, Fuller JH, Reinhard C, Garca PD, Randazzo FM, Escobedo J, Fantl WJ and Williams LT. Elevated expression of axin2 and hnkcd mRNA provides evidence that Wnt/beta-catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* (2001), 98:1473-1478

Yoshitake et al., 1999. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT and Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999), 96:10944

Zeller et al., 2003. Zeller C, Hinzmann B, Seitz S, Prokoph H, Burkhard-Goettges E, Fischer J, Jandrig B, Schwarz LE, Rosenthal A and Scherneck S. SASH1: a candidate tumour suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer. *Oncogene* (2003), 22:2972-2983

Zumbrunn et al., 2001. Zumbrunn J, Kinoshita K, Hyman AA and Nathke IS. Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr Biol* (2001), 11(1):44-49

10 Danksagung

Allen, die am Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt an dieser Stelle mein herzlicher Dank:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jörg Rüdiger Siewert, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit der Erstellung dieser Dissertationsarbeit im Rahmen meiner klinischen Tätigkeit sowie für die kontinuierliche klinische Ausbildung.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Holzmann, Leiter der chirurgischen Forschergruppe Sepsis der Chirurgischen Klinik, für die Bereitstellung des Themas sowie für die intensive wissenschaftliche Betreuung und stetige Unterstützung.

Herrn PD Dr. med. Hjalmar Nekarda, Leiter des chirurgisch-onkologischen Labors der Chirurgischen Klinik, für die intensive wissenschaftliche Betreuung, die Bereitstellung der Gewebeproben und der Datenbank, die immunhistochemische Beurteilung der untersuchten Gewebe, die Unterstützung bei der statistischen Auswertung, die Inspiration und Motivation, die Förderung meines wissenschaftlichen Interesses, den allumfassenden „Informationsaustausch“, die kontinuierliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Klaus-Peter Janssen, Leiter der Projektgruppe Molekulare Tumorbologie der chirurgischen Forschergruppe Sepsis der Chirurgischen Klinik, für die intensive wissenschaftliche Betreuung, die Einführung in die molekulargenetische Methodik und die gute Zusammenarbeit.

Herrn PD Dr. med. Jörg Theisen für die Anleitung bei der statistischen Auswertung, die kompetente und umfangreiche Unterstützung, die kritischen Diskussionen, die Motivation und 1000 deadlines.

Herrn Dr. med. Robert Rosenberg für die kontinuierliche Unterstützung und Betreuung sowie für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. K. Ulm für die Überprüfung der statistischen Berechnung.

Besonderer Dank gilt der medizinisch technischen Assistentin Frau Carmen Marthen für die Bereitstellung der Gewebeschnitte und den Zugriff zur Datenbank sowie für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen, wie auch der medizintechnischen Assistentin Frau Daniela Mayr für die fachliche Mitbetreuung.

Allen Mitarbeiterinnen des Holzmannlabors danke ich für die nette Integration und die gute Zusammenarbeit.