

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biochemie

Bedeutung tumorstammzellassoziierter Gene für die  
Chemotherapieresistenz und Prognose beim Magenkarzinom

Lukas Michael Maximilian Bauer

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

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Groll
2. apl. Prof. Dr. G. Keller

Die Dissertation wurde am 28.08.2013 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie  
am 06.11.2013 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	IV
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Anatomie und Histologie des Magens .....	1
1.2 Das Magenkarzinom .....	3
1.2.1 Epidemiologie.....	3
1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	3
1.2.3 Klassifizierung von Magenkarzinomen .....	4
1.2.4 Die neoadjuvante Chemotherapie des lokal fortgeschrittenen Magenkarzinoms .....	5
1.3 Theorien der Tumorentwicklung und -organisation .....	7
1.3.1 Das Modell der klonalen Evolution .....	7
1.3.2 Das Tumorstammzellmodell.....	7
1.3.3 Plastizität des Tumorstammzellmodells und integrierte Tumormodelle .....	9
1.3.4 Therapeutische Konsequenzen des Tumorstammzellmodells .....	11
1.3.5 Tumorstammzellen beim Magenkarzinom .....	13
1.4 Identifikation und Charakterisierung von Tumorstammzellen .....	14
1.4.1 Oberflächenmarker .....	14
1.4.2 Transkriptionsfaktoren.....	15
1.4.3 Signalwege.....	16
1.4.3.1 Der Wnt-Signalweg	
1.4.3.2 Der Notch-Signalweg	
1.4.3.3 Der Hedgehog-Signalweg	
1.4.4 Andere Tumorstammzellmarker .....	18
1.4.5 Nachweis und Anreicherung von Tumorstammzellen.....	18
1.4.5.1 Xenotransplantation	
1.4.5.2 <i>Side-populations</i>	
1.4.5.3 Tumorsphäroide	
1.5 Fragestellung.....	20
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>21</b>
2.1 Patienten und Tumoren.....	21
2.2 Zelllinien.....	26
2.3 Materialien.....	29
2.3.1 <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Low Density Arrays</i> .....	29
2.3.1.1 Kriterien für die Auswahl von <i>Assays</i> für TLDA-basierte Genexpressionsanalysen	
2.3.1.2 Genexpressionsassays für die Auswahl von Referenzgenen	
2.3.1.3 Genexpressionsassays für TLDA-basierte Analysen	
2.3.2 Primersysteme.....	32
2.3.2.1 Primer für die qRT-PCR basierte Quantifizierung der <i>NOTCH1</i> - und <i>NOTCH2</i> -Expression	
2.3.2.2 Primer für die Detektion von Mykoplasmenkontaminationen in der Zellkultur	
2.3.2.3 Primer für die cDNA-Synthese	
2.3.2.4 Primer für die Überprüfung der cDNA-Reinheit	

2.3.3	DNA-Konstrukte für den <i>NOTCH1</i> - und <i>NOTCH2-Knockdown</i> .....	34
2.3.4	Antikörper.....	35
2.3.5	Chemikalien.....	36
2.3.6	Zellkulturmedien.....	37
2.3.7	Enzyme und Inhibitoren.....	37
2.3.8	Puffer und Lösungen.....	37
2.3.9	Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen .....	39
2.3.10	Verbrauchsmaterialien .....	40
2.3.11	Geräte.....	41
2.3.12	Software.....	42
2.4	Methoden .....	43
2.4.1	Molekularbiologische Methoden .....	43
2.4.1.1	RNA-Extraktion	
2.4.1.2	cDNA-Synthese	
2.4.1.3	Genexpressionsanalysen mit <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Low Density Arrays</i>	
2.4.1.4	Nested-PCR zum Ausschluss von Mykoplasmenkontaminationen in der Zellkultur	
2.4.1.5	SYBR Green-basierte qRT-PCR	
2.4.2	Proteinbiochemische Methoden.....	49
2.4.2.1	Immunhistochemie	
2.4.2.2	Western-Blot	
2.4.3	Zellkultur .....	52
2.4.3.1	Allgemeines	
2.4.3.2	Wachstums- und Chemosensitivitätsanalysen	
2.4.3.3	Sphäroidbildung	
2.4.3.4	Zellzyklusanalysen	
2.4.3.5	<i>Side-population</i> -Analysen	
2.4.3.6	Herunterregulation der <i>NOTCH1</i> - und <i>NOTCH2</i> -Expression in Magenkarzinomzelllinien	
2.4.4	Statistik .....	60
2.4.5	Nutzung öffentlicher Datenbanken.....	61
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>63</b>
3.1	Genexpressionsanalysen in Tumoren.....	63
3.1.1	Ermittlung geeigneter Referenzgene.....	63
3.1.2	Analyse tumorstammzellassoziierter Gene in residualen Magenkarzinomzellen nach neoadjuvanter Chemotherapie.....	65
3.1.2.1	Korrelation der Expression zwischen den einzelnen Genen	
3.1.2.2	Assoziation der Genexpression mit klinischen und pathologischen Parametern	
3.1.2.3	Assoziation der Genexpression mit dem Überleben der Patienten	
3.1.3	Analyse öffentlich zugänglicher Genexpressionsdaten .....	77
3.1.4	Vergleichende Genexpressionsanalyse zwischen korrespondierenden prä- und posttherapeutischen Tumorproben mit qRT-PCR.....	79
3.2	Immunhistochemischer Nachweis der Notch1- und Notch2-Expression .....	81
3.2.1	Vergleichende Analysen der Notch1- und Notch2-Proteinexpression zwischen korrespondierenden Biopsien und Resektaten .....	82
3.2.2	Notch1- und Notch2-Proteinexpression und Überleben .....	84
3.2.3	Notch1- und Notch2-Proteinexpression und klinisch-pathologische Parameter .....	86
3.2.4	Korrelation der mRNA- und Proteinexpression .....	87

3.3	Etablierung und Charakterisierung eines Tumorstammzellmodells aus Magenkarzinomzelllinien .....	88
3.3.1	<i>Side-populations</i> .....	88
3.3.2	Tumorsphäroide .....	92
3.4	Herunterregulation der <i>NOTCH1</i> - und <i>NOTCH2</i> -Expression in Magenkarzinomzelllinien .....	93
3.4.1	Feststellung der intrinsischen Puromycinresistenz .....	93
3.4.2	Überprüfung der <i>Knockdown</i> -Effizienz .....	94
3.4.2.1	Nachweis der Genexpression mittels qRT-PCR	
3.4.2.2	Nachweis der Proteinexpression mittels Western-Blot	
3.4.3	Auswirkungen der Herunterregulation der <i>NOTCH1</i> - und <i>NOTCH2</i> -Expression auf MKN28-Magenkarzinomzellen .....	97
3.4.3.1	Auswirkungen auf die Morphologie und das Wachstum	
3.4.3.2	Auswirkungen auf die Chemosensitivität	
3.4.3.3	Auswirkungen auf die Sphäroidbildung	
3.4.3.4	Auswirkungen auf die Zellzyklusverteilung	
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>103</b>
4.1	Überlegungen zur Vergleichbarkeit von Expressionsstudien .....	104
4.2	Assoziation der Genexpression mit dem Überleben und klinisch-pathologischen Parametern .....	105
4.2.1	Assoziationen mit dem Überleben .....	105
4.2.2	Die prognostische Signatur .....	109
4.2.3	Analyse öffentlicher Datenbanken .....	110
4.2.4	Assoziationen mit weiteren klinisch-pathologischen Parametern .....	111
4.3	Evaluation der Genexpressionsanalysen unter dem Gesichtspunkt der Tumorstammzellhypothese .....	114
4.3.1	Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene .....	114
4.3.2	Expressionsanalysen auf Proteinebene .....	119
4.4	Bedeutung von Notch1 und Notch2 für die Chemotherapieresistenz und Tumorstammzeleigenschaften von Magenkarzinomzelllinien .....	121
4.5	Fazit und Ausblick .....	127
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>128</b>
	Abkürzungsverzeichnis .....	139
	Abbildungsverzeichnis .....	143
	Tabellenverzeichnis .....	144
	Publikationen .....	146
	Anhang .....	147
	Danksagungen .....	153

## Zusammenfassung

Magenkarzinome werden meist spät diagnostiziert und sind daher oft lokal fortgeschritten. Vor einer Operation dieser Tumoren wird oft eine neoadjuvante Chemotherapie eingesetzt, um den Tumor zu verkleinern und die Prognose zu verbessern. Dennoch verbleiben in den meisten Fällen erhebliche Mengen residualer Tumorzellen, was sich negativ auf die Prognose für die Patienten auswirkt.

Als potentielle Tumorstammzellen werden Tumorzellen bezeichnet, die durch ihr Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzial das Tumorstammwachstum aufrechterhalten können. Weiterhin sollen Tumorstammzellen eine erhöhte Chemotherapieresistenz aufweisen und für das Auftreten von Rezidiven verantwortlich sein.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, die klinische und prognostische Relevanz der Expression tumorstammzellassoziierter Gene in Magenkarzinomzellen nach neoadjuvanter Chemotherapie zu untersuchen. Dabei sollte nach Hinweisen für eine Anreicherung von chemotherapieresistenten, potentiellen Tumorstammzellen im Residualtumor gesucht werden. Weiterhin sollte die chemotherapeutische Relevanz ausgewählter Gene, sowie deren Einfluss auf Tumorstammzeleigenschaften *in vitro* charakterisiert werden.

Durch Expressionsanalysen an Magenkarzinomen mit 10 bis 50 % Residualtumor nach der Chemotherapie konnten Assoziationen der Expression tumorstammzellassoziierter Gene mit dem Überleben der Patienten oder den klinisch-pathologischen Parametern gezeigt werden. Dabei wurde eine prognostisch signifikante Genexpressionssignatur aus hoher *GSK3B*-, hoher *CTNNB1*- und niedriger *NOTCH2*-Expression identifiziert, die eine Patientengruppe mit sehr guter Prognose beschreibt ( $p < 0,001$ ). Die prognostische Wertigkeit dieser Signatur wurde durch ihre Anwendbarkeit in einem unabhängigen, nicht chemotherapierten Patientenkollektiv aus einer öffentlich zugänglichen Datenbank unterstrichen ( $p = 0,017$ ). Dies deutete auf eine generelle prognostische Relevanz der Signatur für lokal fortgeschrittene Magenkarzinome hin und könnte weiterführende therapeutische Entscheidungen unterstützen.

Vergleichende Genexpressionsanalysen zwischen zusammengehörenden prätherapeutischen Biopsien und posttherapeutischen Resektaten zeigten eine erhöhte *LGR5*- und *POU5F1*-Expression nach der Chemotherapie. Dies deutete auf eine Anreicherung potentieller Tumorstammzellen in residualen Tumoren hin, was durch weiterführende, immunhistochemische Analysen zu untermauern wäre. Auch die *NOTCH2*-Expression war in den Residualtumoren erhöht, während für *NOTCH1*, *JAG1* und *HES1* eine Abnahme der Expression festgestellt wurde. Die immunhistochemischen Analysen wiesen dabei eher auf

eine chemotherapieabhängige Regulation der Notch2-Expression als auf eine Anreicherung Notch2-exprimierender Zellen hin. Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass der Notch-Signalweg eine Rolle für die Chemoresistenz spielt und möglicherweise divergente Funktionen der Notch-Rezeptorparaloge im Magenkarzinom vorliegen.

Um die Rolle der Notch-Rezeptoren für die Chemotherapieresistenz näher zu charakterisieren, wurden *in vitro* Versuche mit *NOTCH1*- und *NOTCH2-Knockdown*-Zelllinien einer Magenkarzinomzelllinie (MKN28) durchgeführt. Der *NOTCH1-Knockdown* führte zu einer signifikant verringerten Sensitivität gegenüber Cisplatin in einem Zellproliferationstest (XTT-Test) und im Koloniebildungsassay. Gleichzeitig nahm die Sensitivität gegenüber 5-Fluorouracil im Koloniebildungsassay zu. Der *NOTCH2-Knockdown* führte zu ähnlichen Veränderungen der Chemosensitivität gegen 5-Fluorouracil, jedoch war die Cisplatinsensitivität nur im XTT-Test verringert. Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *NOTCH1* und *NOTCH2* den Chemosensitivitätsstatus der Tumorzellen beeinflusst. Zusammen mit der in den Tumorresektaten beobachteten schlechten Prognose bei hoher *NOTCH2*-Expression weisen diese Ergebnisse auf den Notch-Signalweg als eine potentielle therapeutische Zielstruktur hin. Im Sphäroidassay konnten keine Anhaltspunkte dafür gefunden werden, dass der Notch-Signalweg neben der Chemotherapieresistenz noch weitere Tumorstammzelleigenschaften bestimmt.

Zusammenfassend konnte durch Expressionsanalysen an residualen Tumorzellen im Magenkarzinom nach neoadjuvanter Chemotherapie eine prognostische Expressionssignatur identifiziert werden, die für eine Risikostratifizierung der Patienten angewandt werden könnte. Vergleichende Analysen zwischen prätherapeutischen Biopsien und posttherapeutischen Resektaten zeigten Expressionsveränderungen, die mit der Anreicherung potentieller Tumorstammzellen vereinbar wären. Zusammen mit immunhistochemischen Analysen und *in vitro*-Untersuchungen wurde dem Notch-Signalweg eine Bedeutung für die Chemosensitivität beim neoadjuvant behandelten Magenkarzinom zugewiesen. Die vorliegenden Daten weisen jedoch auf divergierende Funktionen der Rezeptorparaloge hin, die eine genauere Charakterisierung erfordern.



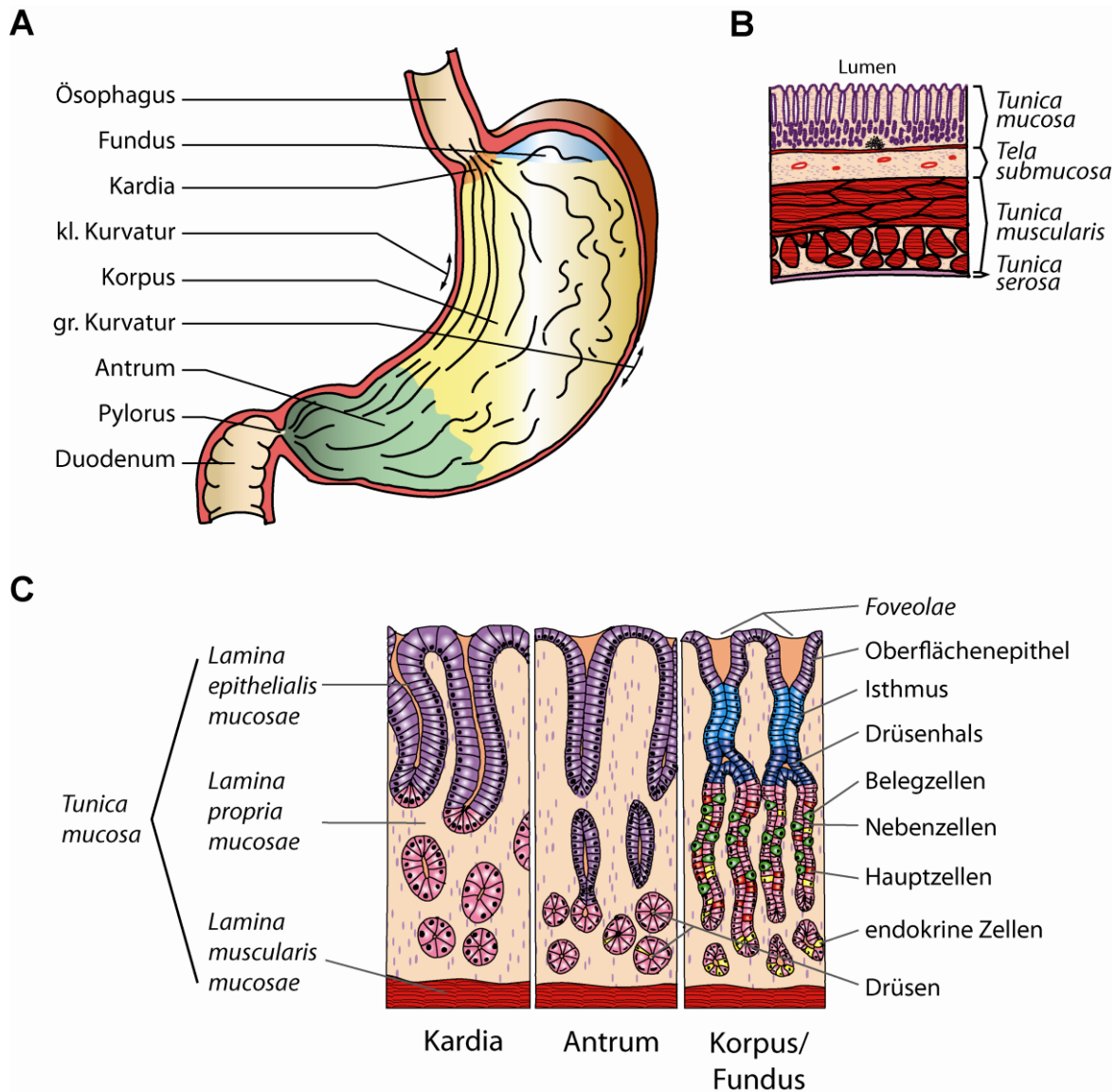


# 1. Einleitung

## 1.1 Anatomie und Histologie des Magens

Der Magen ist ein J-förmiges Hohlorgan, das der mechanischen und enzymatischen Zerkleinerung und Durchmischung der Nahrung dient, um diese für die Verdauungsprozesse im Darm vorzubereiten. Weiterhin ist der Magen mit seinem stark sauren Milieu eine wichtige Infektionsbarriere und ist durch endokrine Sekretion der Hormone Ghrelin, Gastrin und Somatostatin an der Regulation von Appetit und Verdauungsprozessen beteiligt <sup>(1)</sup>.

Der Magen wird anatomisch und histologisch in vier Zonen untergliedert, die sich zum Teil auch im Schleimhautaufbau unterscheiden (Abb. 1A und C). Im direkten Anschluss an den Ösophagus sphinkter befindet sich die etwa 1 bis 2 cm breite Kardiazone. Die angrenzende Korpuszone nimmt den größten Teil des Magens ein, sie zieht sich von der Kardiazone entlang bis zum Ende der kleinen Kurvatur. Der Bereich des Magens, der oberhalb der Ösophagusmündung eine Aussackung bildet, wird als Fundus bezeichnet. Der distale Abschnitt zwischen dem Ende der kleinen Kurvatur und dem Pylorus, welcher den Magen vom Duodenum abtrennt, wird als Antrum bezeichnet <sup>(2)</sup>. Die Wandschichtung des Gastrointestinaltrakts besteht luminal aus einer Schleimhaut, bestehend aus einer Drüsenepithelschicht, Bindegewebe und glatter Muskulatur. Darunter liegt eine gefäßführende Bindegewebsschicht, eine Muskelschicht und eine zum Bauchraum abgrenzende Serosa <sup>(3)</sup> (Abb. 1B).



**Abb. 1:** **Anatomie und Histologie des Magens.** **A)** Makroskopie: der Magen befindet sich im Gastrointestinaltrakt zwischen Ösophagus und Duodenum. Er wird in vier anatomisch und histologisch differenzierte Bereiche eingeteilt: Kardie, Fundus, Korpus und Antrum. **B)** Aufbau der Magenwand: Luminal liegt die Schleimhaut (*Tunica mucosa*) gefolgt von einer gefäßführenden Bindegewebsschicht (*Tela submucosa*), einer Muskelschicht (*Tunica muscularis*) und einer zum Bauchraum abgrenzenden Serosa (*Tunica serosa*). **C)** Die Schleimhaut gliedert sich in eine Drüsenepithelschicht (*Lamina epithelialis mucosae*), Bindegewebe (*Lamina propria mucosae*) und glatte Muskulatur (*Lamina muscularis mucosae*). Das Drüsenepithel unterscheidet sich in den verschiedenen anatomischen Zonen. Die Kardie ist durch ein muzinproduzierendes Drüsenepithel mit Gruben (*Foveolae*) und langen, gewundenen Drüsen gekennzeichnet. Die Antrumdrüsen ähneln histologisch den Kardiadrüsen, jedoch mit tiefen Gruben und kurzen gewundenen Drüsen. Hier befinden sich hauptsächlich schleimproduzierende und endokrine Zellen. Fundus und Korpus haben den gleichen Aufbau mit tiefen, geraden Drüsengängen, die sich in Basis, Hals und Isthmus aufteilen und in flachen Gruben münden. Im Gruben- und Isthmusbereich befinden sich verschiedene schleimbildende Zellen, welche einen alkalischen Schleim absondern, der dem Schutz des Epithels vor Pepsin und Säure dient. Im Drüsenhals befinden sich schnell proliferierende Zellen, welche der Erneuerung der Magenschleimhaut dienen. Hier werden auch die Stammzellen der Magenschleimhaut vermutet. Hauptsächlich in der Basis befinden sich die säureproduzierenden Parietalzellen, pepsinogenproduzierende Hauptzellen, sowie endokrine Zellen<sup>(2,3)</sup> (Abbildung: ©Lukas Bauer, 2013).

## 1.2 Das Magenkarzinom

### 1.2.1 Epidemiologie

Magenkarzinome sind in Deutschland die sechsthäufigste Krebserkrankung bei Männern (3,7 % der Krebsneuerkrankungen in Deutschland) und achthäufigste bei Frauen (3,0 %). Insgesamt gab es im Jahr 2008 etwa 15800 Neuerkrankungen. Obwohl die Zahl der Neuerkrankungen seit Jahren rückläufig ist, sind Magenkarzinome noch immer die fünf-beziehungsweise sechsthäufigste krebsassoziierte Todesursache in Deutschland. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit bei etwa 30 %<sup>(4)</sup>. Weltweit liegen Magenkarzinome sogar an vierter Stelle der häufigsten Krebserkrankungen (7,8 % der Krebsneuerkrankungen) und sind die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache (9,7 %)<sup>(5)</sup>. Es gibt große Ungleichmäßigkeiten in der weltweiten Verteilung der Magenkarzinomerkrankungen. Besonders hohe Inzidenzraten werden in Japan (bis 70 Fälle je 10<sup>5</sup> Einwohner (EW)) und anderen ostasiatischen Ländern sowie in Osteuropa und Südamerika erreicht. Niedrig sind die Inzidenzraten dagegen in Nordamerika, Australien und in Teilen Afrikas (weniger als 10 Fälle je 10<sup>5</sup> EW)<sup>(6)</sup>.

### 1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Als wichtigster Risikofaktor für Magenkarzinome gilt die chronische Infektion mit *Helicobacter pylori*-Bakterien. Diese induziert eine chronische Gastritis, welche die Entstehung von Magenkarzinomen begünstigt<sup>(7)</sup>. Die Infektion mit diesem Bakterium erhöht besonders das Risiko für Nichtkardiakarzinome, wie eine Metaanalyse von zwölf prospektiven, epidemiologischen Studien ergab<sup>(8)</sup>. Die *H. pylori*-Durchseuchung der Bevölkerung scheint zudem einer ähnlichen Verteilung zu unterliegen wie die Verteilung der Magenkarzinominzidenz und könnte mit ursächlich für diese sein<sup>(6)</sup>.

Als weitere Risikofaktoren, besonders für proximal lokalisierte Adenokarzinome, gelten Rauchen und Übergewicht<sup>(9-11)</sup>. Weiterhin erhöhen eine salz- und nitratreiche Ernährung sowie die Unterversorgung mit frischem Obst und Gemüse das Risiko für Magenkarzinome<sup>(12-14)</sup>. Erhöhter Alkoholkonsum scheint in Kombination mit Tabakkonsum ebenfalls zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko zu führen<sup>(15)</sup>.

Etwa 10 % der Magenkarzinomerkrankungen treten familiär gehäuft auf<sup>(16)</sup> und etwa 1-3 % werden als hereditär eingestuft. Unter diesen ist die wichtigste bekannte Ursache eine heterozygote Keimbahnmutation im *CDH1*-Gen (E-Cadherin-Gen), die 25 bis 30 % der hereditären Magenkarzinomerkrankungen ausmacht<sup>(17)</sup>. Diese genetische Disposition führt mit einer Penetranz von etwa 80 % zur Entstehung von Magenkarzinomen vom diffusen

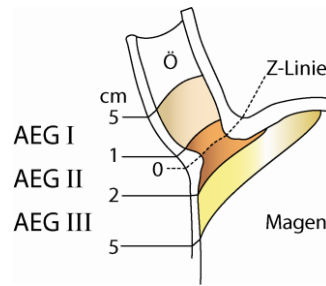
histologischen Subtyp. Weibliche Mutationsträger haben zusätzlich ein stark erhöhtes Risiko an einem lobulären Mammakarzinom zu erkranken<sup>(18,19)</sup>. Das Magenkarzinom entsteht in diesen Fällen als Folge eines somatischen Funktionsverlusts des zweiten *CDHI*-Allels durch Promotermethylierung, Verlust der Heterozygotität oder eine weitere Mutation<sup>(20,21)</sup>. Mutationen im *CDHI*-Gen sind auch in sporadischen Karzinomen häufig (ca. 50 % der diffusen Magenkarzinome)<sup>(22)</sup>. Daneben werden bei weiteren hereditären Tumorsyndromen vermehrt Magenkarzinome beobachtet. Zu diesen gehören das Lynch-Syndrom (hauptsächlich *MLH1*- oder *MSH2*-Keimbahnmutation) mit einem vierfach erhöhtem Erkrankungsrisiko und niedrigerem Diagnosealter<sup>(23,24)</sup>, das Peutz-Jeghers-Syndrom (*STK11*-Keimbahnmutation, 29 % Penetranz für Magenkarzinome)<sup>(25)</sup> sowie seltener das Li-Fraumeni-Syndrom (*TP53*-Keimbahnmutation)<sup>(26)</sup>.

### 1.2.3 Klassifizierung von Magenkarzinomen

Adenokarzinome machen über 90 % der Tumorerkrankungen des Magens aus. Die übrigen Tumorerkrankungen sind hauptsächlich gastrointestinale Stromatumoren (GIST) oder Lymphome<sup>(27)</sup>. Adenokarzinome des Magens werden nach drei Hauptkriterien eingeordnet: histologischer Subtyp, Tumorstadium und Lokalisation. .

Bezüglich der Lokalisation erfolgt die Einteilung primär in proximal oder distal. Proximale Karzinome liegen im Bereich des ösophagogastralen Übergangs und werden zusätzlich nach Siewert in drei AEG-Typen (*adenocarcinoma of the esophagogastric junction*) unterteilt (Abb. 2). AEG Typ I umfasst Tumoren des distalen Ösophagus die auch in den Magen infiltrieren können und demnach keine echten Magenkarzinome sind. AEG Typ II sind echte Kardiakarzinome und AEG Typ III sind subkardiale Magenkarzinome, welche den ösophagogastralen Übergang infiltrieren<sup>(28)</sup>. Diese Klassifizierung nach anatomischen Gesichtspunkten korreliert mit Unterschieden in Pathogenese, Tumorausbreitung und Prognose und erfordert unterschiedliche Therapiemodalitäten<sup>(29)</sup>.

Die Stadieneinteilung zur Bewertung der Tumorausbreitung erfolgt anhand der TNM-Klassifikation entsprechend der UICC-Leitlinien. Diese beschreibt die lokale Tiefenausdehnung des Primärtumors in die Wandschichten (T1 bis T4), die Anzahl befallener Lymphknoten (N0 bis N3) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M0 oder M1). Anhand der individuellen TNM-Klassifikation erfolgt die prognostisch wichtige Stadieneinteilung, welche eine Grundlage für die Therapieentscheidung ist<sup>(30,31)</sup>.



**Abb. 2:** Einteilung von Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs (AEG) nach der Lokalisation bezüglich der Z-Linie. Diese stellt den Übergang vom Plattenepithel des Ösophagus (Ö) zum Zylinderepithel des Magens dar. Ausschlaggebend für die Einteilung ist die Entfernung des Ursprungs des Tumors von der Z-Linie nach proximal oder distal in cm. Adaptiert nach Siewert *et. al.* (1999) <sup>(28)</sup>.

Histologisch werden Magenkarzinome hauptsächlich nach der Laurén-Einteilung in diffuse und intestinale Subtypen sowie nach den WHO-Kriterien in vier histologische Subgruppen (papilläre, tubuläre, muzinöse und Siegelringzell-Karzinome) eingeteilt. Daneben gibt es noch einige seltenere Formen sowie Mischtypen. Der intestinale Typ nach Laurén zeichnet sich durch einen mittleren bis hohen Differenzierungsgrad aus und bildet drüsenartige Zellverbände, die relativ kompakt infiltrieren. Der diffuse Typ ist schlecht differenziert und die Zellen bilden keine oder nur lockere Verbände, die ein diffus infiltrierendes Wachstumsmuster zeigen <sup>(32,33)</sup>.

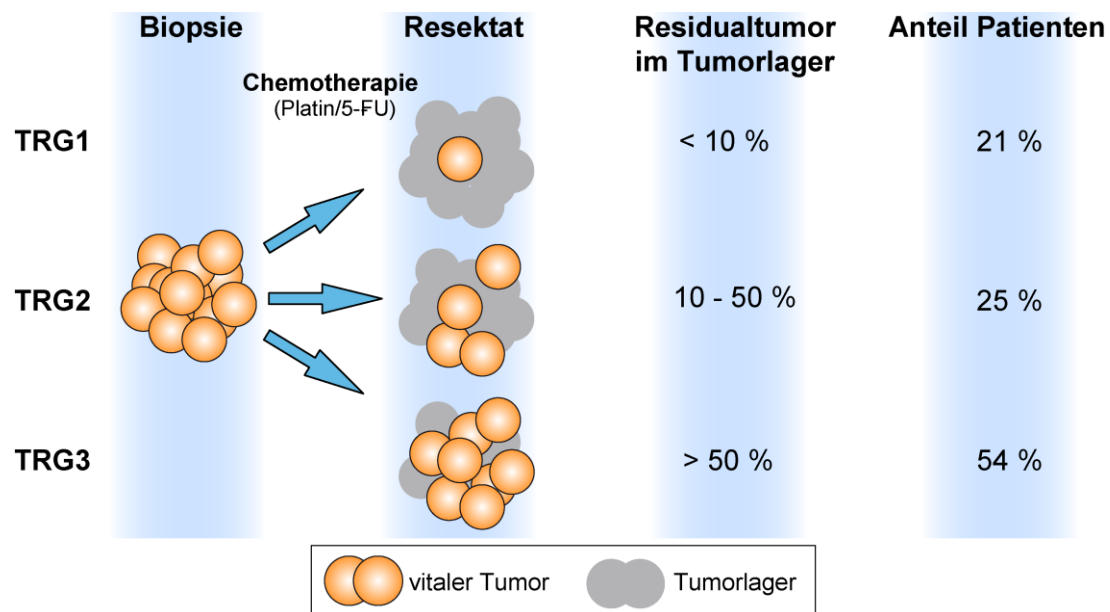
## 1.2.4 Die neoadjuvante Chemotherapie des lokal fortgeschrittenen Magenkarzinoms

Bis zu 80 % der Erstdiagnosen von Magenkarzinomen und Karzinomen des gastroösophagealen Übergangs erfolgen bei lokal fortgeschrittenem Tumorwachstum <sup>(4,34,35)</sup>.

Eine für diese Tumoren häufig angewendete Therapie ist die neoadjuvante Chemotherapie mit einem platinbasierten Chemotherapeutikum (Cisplatin, Oxaliplatin) in Kombination mit 5-Fluorouracil <sup>(36-38)</sup>. Als neoadjuvant wird eine Chemotherapie bezeichnet, die vor der chirurgischen Entfernung des Tumors eingesetzt wird. In Kombination mit einer weiteren Chemotherapie nach der Operation (adjuvante Chemotherapie) spricht man von perioperativer Chemotherapie <sup>(36)</sup>.

Die neoadjuvante Chemotherapie verfolgt mehrere Ziele: durch die Therapie kann es zur Schrumpfung oder Eliminierung der Haupttumormasse (Tumorregression) und von Lymphknotenmetastasen kommen. Durch dieses so genannte *downstaging* wird die Rate der potentiell kurativen vollständigen Resektionen (R<sub>0</sub>-Resektion) gegenüber einer primären chirurgischen Intervention erhöht. Weiterhin können bei lokal fortgeschrittenen Tumoren bereits Fernmetastasen oder Mikrometastasen vorliegen. Durch die neoadjuvante

Chemotherapie besteht die Möglichkeit diese sehr viel früher zu behandeln als mit einer konventionellen adjuvanten Chemotherapie, da nicht erst eine Erholung des Patienten nach der Operation abgewartet werden muss<sup>(39,40)</sup>.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der histopathologischen Regressionsgraduierung von neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen nach Becker<sup>(41)</sup>. Durch die Platin/5-Fluorouracil (5-FU)-basierte Chemotherapie werden Tumorzellen zerstört und es verbleibt Narbengewebe im Tumorklumpen. Der Anteil der verbleibenden Tumorzellen in Relation zu der Gesamtausdehnung des Tumorklumpens wird histologisch quantifiziert und den drei Tumorregressionsgraden (TRG) zugeordnet<sup>(41)</sup>.

Zwei randomisierte klinische Studien mit über 700 Patienten zeigten, dass durch eine neoadjuvante oder perioperative Chemotherapie das 5-Jahres-Gesamtüberleben der Patienten von ca. 24 % auf bis zu 38 % erhöht werden konnte, wobei es zu deutlichen Reduktionen der T- und N-Stadien in den chemotherapierten Patientengruppen gegenüber den nicht-chemotherapierten Patienten kam<sup>(39,42)</sup>. Trotz der verbesserten Prognose für die Patienten durch die neoadjuvante Therapie ist die Zahl der Tumoren, welche durch eine neoadjuvante Chemotherapie erheblich verkleinert werden oder in eine komplette Remission gehen mit ca. 20 bis 40 % gering<sup>(36,41)</sup>. In einem Großteil der Fälle verbleiben demnach erhebliche Mengen residualer Tumorzellen nach der Chemotherapie. Das histopathologische Ansprechen auf die Chemotherapie wird anhand der relativen Menge dieser residualen Tumormasse bezogen auf das Tumorklumpen in drei Tumorregressionsgrade (TRG) eingeteilt (Abb. 3). Dabei ergibt sich eine starke Assoziation zwischen dem Tumorregressionsgrad und dem Gesamtüberleben der Patienten, wobei nur Patienten mit TRG1 (weniger als 10 % Residualtumor) eine deutlich bessere Prognose haben<sup>(41)</sup>.

## 1.3 Theorien der Tumorentwicklung und -organisation

### 1.3.1 Das Modell der klonalen Evolution

Für die Entwicklung und Organisation von Tumoren gibt es zwei wichtige Modelle: das Modell der Tumorstammzellen und das Modell der klonalen Expansion<sup>(43)</sup>. Das Modell der klonalen Expansion geht von einer entarteten Zelle aus, die zunächst durch Expansion zu einem Tumor heranwächst. Durch genomische Instabilität der Tumorzellen kommt es zu weiteren, zufälligen Mutationsereignissen, welche zum Fortschreiten der Tumorentwicklung führen. Welche Mutationen in einem Tumor das Wachstum begünstigen, wird durch den jeweils vorherrschenden Selektionsdruck durch zelleigene (Zellzykluskontrolle, Apoptose-induktion), körpereigene (Immunsystem, Wachstumsfaktoren, Nährstoffangebot) und externe Faktoren (therapeutischer Druck) bestimmt<sup>(43)</sup> (Abb. 4A). Damit kann durch das klonale Modell sowohl die Tumorheterogenität, als auch das wiederkehrende Auftreten typischer Mutationsmuster und -reihenfolgen in bestimmten Tumoren erklärt werden. Als klassisches Beispiel sei hier die Adenom-Karzinom-Sequenz bei der Entstehung des Kolonkarzinoms genannt, bei der bestimmte Gene (*APC*, *KRAS*, *TP53* u. a.) regelmäßig und in einem hohen Prozentsatz der Tumoren in Abhängigkeit des Stadiums der Tumorentstehung mutiert sind<sup>(44)</sup>.

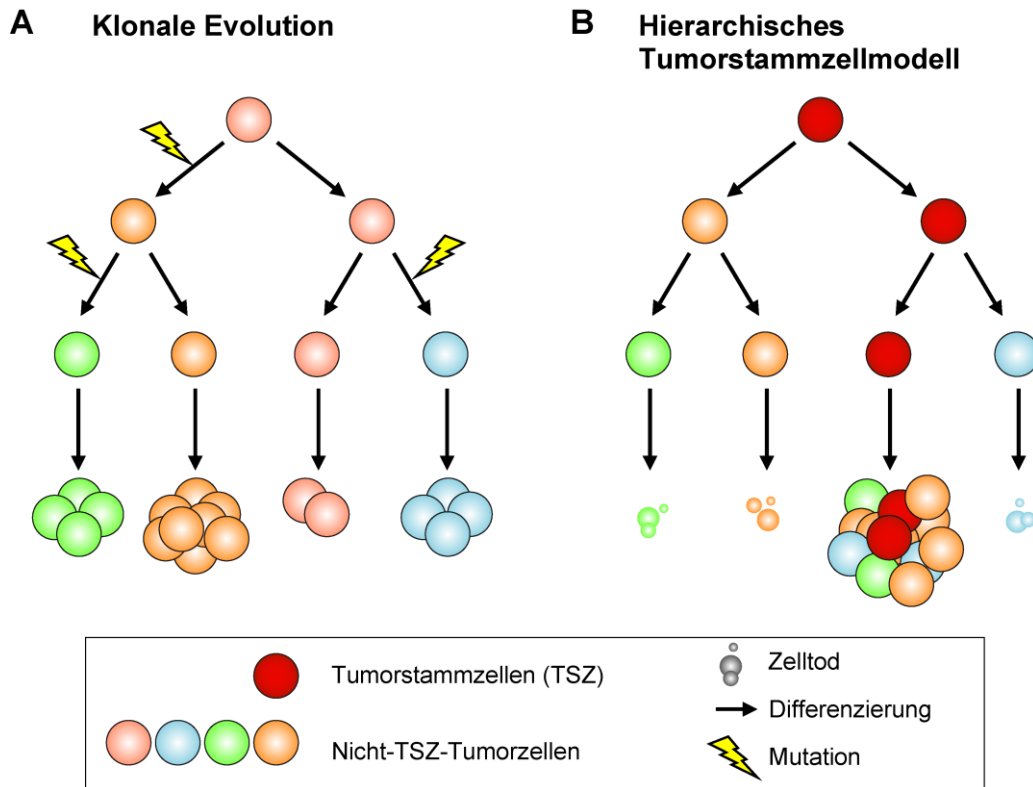
### 1.3.2 Das Tumorstammzellmodell

Das Tumorstammzellmodell geht im Gegensatz zum Modell der klonalen Expansion von einer gewissen hierarchischen Organisation des Tumors in Anlehnung an normale Gewebe aus<sup>(45)</sup> (Abb. 4B).

Zur Entwicklung des Tumorstammzellmodells führte unter anderem die Beobachtung von Pierce *et al.* (1971), dass die radioaktive Thymidin- $H^3$ -Markierung von undifferenzierten Tumorzellen in Ratten mit Plattenepithelkarzinomen eine Ausbreitung des Signals auf die besser differenzierten Tumorbereiche nach sich zog. Damit wurde gezeigt, dass eine Tumorzellpopulation durch Differenzierung eine andere Population hervorbringen kann (Hierarchie)<sup>(46)</sup>.

Bei normalen Geweben steht eine gewebsspezifische Stammzelle an der Spitze der Hierarchie. Diese kann durch asymmetrische Teilung sich selbst erneuern und differenzierte Tochterzellen hervorbringen. Diese Tochterzellen können bereits den endgültig differenzierten Zelltyp des Gewebes darstellen oder als *transit amplifying cell* („Übergangsver-

stärkerzelle“) limitierte Vorläuferzellen sein, die durch rasche symmetrische Teilungen in der Lage sind eine große Anzahl von Tochterzellen zu generieren, welche anschließend zu einem oder mehreren verschiedenen Zelltypen ausdifferenzieren. Im Gegensatz zu den Gewebstammzellen sind die *transit amplifying cells* nicht unendlich teilungsfähig und daher keine Stammzellen. Sehr gut untersucht sind diese Hierarchien im hämatopoetischen System<sup>(47)</sup> sowie im Intestinaltrakt<sup>(48)</sup>.



**Abb. 4:** Vergleich des Modells der klonalen Evolution und des hierarchischen Tumorstammzellmodells. **A)** Im Modell der klonalen Evolution kommt es durch Mutationsereignisse zur Bildung neuer, klonaler Linien, die alle das Tumorstammzellwachstum vorantreiben können und einen heterogenen Tumor bilden. Je nach Mutation können einzelne Klone aggressiver wachsen als andere oder werden durch Umweltbedingungen (z.B. Chemotherapie) selektiert. **B)** Im hierarchischen Tumorstammzellmodell steht eine Stammzellpopulation mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung an der Spitze der Tumorchierarchie. Nur die Tumorstammzellen können den Tumor dauerhaft erhalten. Die Nichttumorstammzellen bilden die Hauptmasse des Tumors, haben aber eine begrenzte Lebensdauer und müssen ständig erneuert werden. Adaptiert aus Sugihara *et al.* (2012)<sup>(52)</sup>.

Im Tumorstammzellmodell steht in gleicher Weise eine Population von Tumorstammzellen an der Spitze der Hierarchie und bringt schnell aber limitiert proliferierende Tochterzellen hervor, welche die Hauptmasse des Tumors ausmachen (Abb. 4B). Nur die Tumorstammzellen sollten demnach in der Lage sein, das Tumorstammzellwachstum auf Dauer aufrecht zu erhalten. Im Jahr 2006 wurde auf dem *AACR Cancer Stem Cells Workshop* eine Konsensdefinition für Tumorstammzellen eingeführt. Demnach müssen Tumorstammzellen um als Tumorstammzellen zu gelten in der Lage sein sich durch symmetrische oder asymmetrische Zellteilung selbst zu erneuern und durch Differenzierung alle heterogenen Zelltypen eines



Tumors hervorzubringen<sup>(49)</sup>. Unter Umständen geht diese Differenzierungsfähigkeit sogar über den eigentlichen Tumor hinaus. So konnte gezeigt werden, dass einige Glioblastomzellen sogar in der Lage sind zu funktionalen Endothelien zu differenzieren und somit die Vaskularisierung und Versorgung des Tumors zu verbessern<sup>(50,51)</sup>.

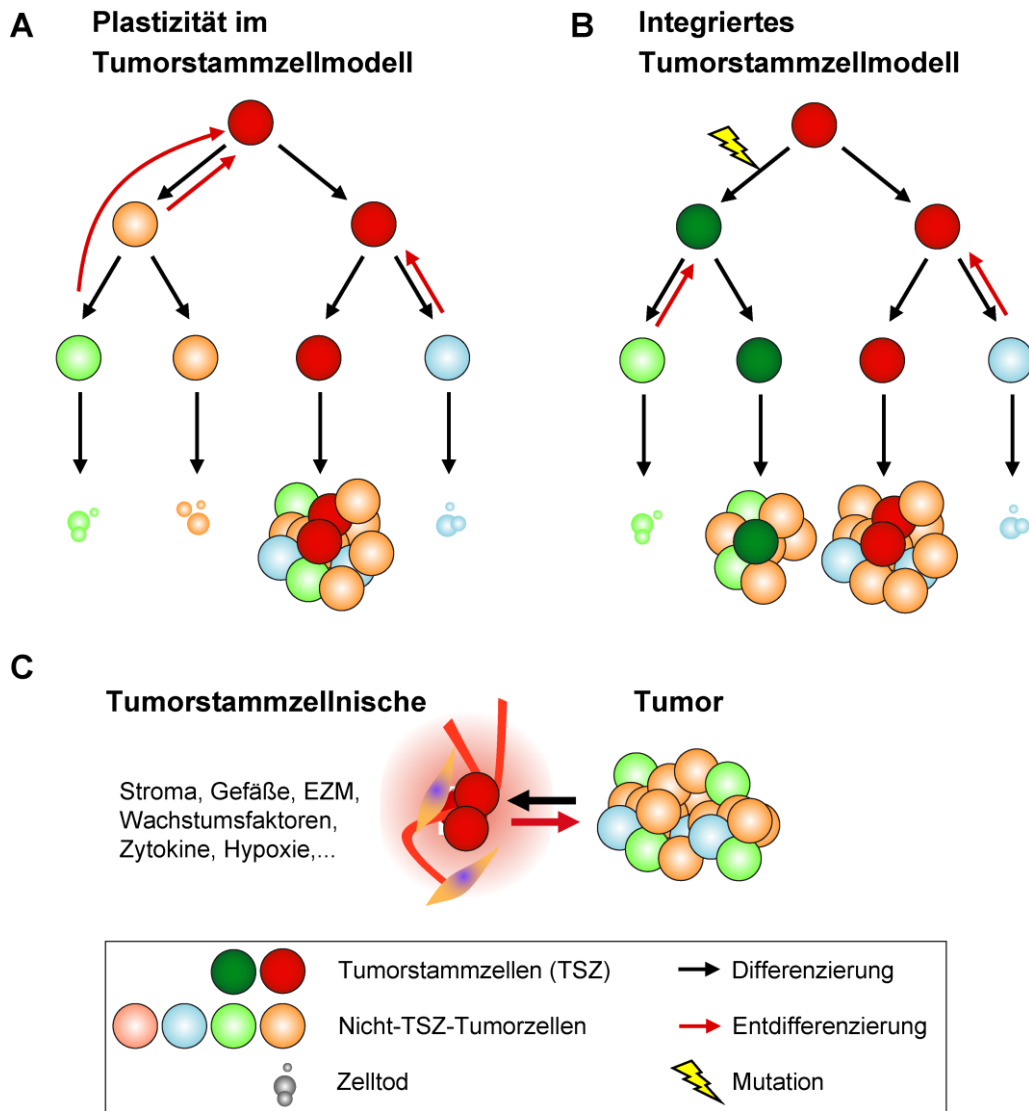
Neben diesen grundlegenden Parametern werden für Tumorstammzellen noch weitere wichtige Eigenschaften postuliert. Zum einen sollen sie sich in einem Zustand der Dormanz oder verlangsamten Proliferation befinden<sup>(45)</sup>. So konnten mit einer Expressionssignatur aus langsam proliferierenden normalen Bruststammzellen Brustkrebszellen isoliert werden, die eine erhöhte Tumorinitiationsrate zeigten<sup>(53)</sup>. Diese Dormanz könnte einen Schutz vor Zytostatika bieten und durch Wiederaufnahme des Zellzyklus ein erneutes Tumorwachstum hervorrufen. Damit weisen Tumorstammzellen auf eine Erklärung für späte, lokale Rezidive nach erfolgreicher Chemotherapie hin. Zum anderen sollen Tumorstammzellen weitere intrinsische Mechanismen der Chemoresistenz aufweisen, welche es ihnen ermöglichen die Chemotherapie zu überleben. So konnte gezeigt werden, dass durch neoadjuvante Chemotherapie beim Brustkrebs eine Anreicherung von tumorinitiierenden Zellen erfolgte<sup>(54)</sup> und in einem Glioblastom-Mausmodell ging das Rezidivwachstum von einer stammzellartigen Subpopulation der Tumoren aus<sup>(55)</sup>. Weitere Untersucher isolierten potentielle Tumorstammzellen und wiesen eine erhöhte Chemoresistenz parallel zu einer erhöhten tumorinduktiven Kompetenz dieser Zellen nach<sup>(56)</sup>.

Das Tumorstammzellmodell ist unabhängig von der Frage nach der „Ursprungszelle“ des Tumors. Ob diese Zelle eine durch Mutationen entartete normale Stammzelle sein muss oder ob eine differenzierte Zelle zu einem Stammzellphänotyp zurückgewandelt wird, wird durch das Tumorstammzellmodell nicht beantwortet sondern muss separat untersucht werden<sup>(57,58)</sup>.

Eine gute Übersicht und kritische Auseinandersetzung mit dem Tumorstammzellmodell bieten die Übersichtsarbeiten von Clevers (2011)<sup>(45)</sup> und Shackleton *et al.* (2009)<sup>(59)</sup>.

### 1.3.3 Plastizität des Tumorstammzellmodells und integrierte Tumormodelle

Die strikten Hierarchien, wie sie im Tumorstammzellmodell postuliert wurden und in normalen Geweben angenommen werden, wurden in den vergangenen Jahren zunehmend in Frage gestellt. Zwei bahnbrechende Arbeiten belegten, dass durch die Neuexpression von jeweils nur vier Transkriptionsfaktoren (*POU5F1*, *SOX2*, *NANOG* und *LIN28* beziehungsweise *POU5F1*, *SOX2*, *KLF4* und *MYC*) in differenzierten Fibroblasten Stammzeleigenschaften wiederhergestellt werden können<sup>(60,61)</sup>.



**Abb. 5:** Weiterentwicklung des Tumorstammzellmodells. **A)** Das plastische Tumorstammzellmodell basiert auf dem hierarchischen Modell. Dabei wird die strikte Hierarchie aufgelöst und postuliert, dass differenzierte Tumorzellen die Möglichkeit haben durch Entdifferenzierung einen Tumorstammzellphänotyp anzunehmen. **B)** Durch Zusammenlegung des plastischen Tumorstammzellmodells und des Modells der klonalen Evolution entsteht ein integriertes Tumorstammzellmodell, welches sowohl die Heterogenität der Tumorinitiationsfähigkeit als auch die genomische Heterogenität von Tumorzellen und Tumorstammzellen des gleichen Tumors berücksichtigt. **C)** Die Tumorstammzellnische dient der Regulation des Tumorstammzellkompartiments und setzt sich aus einer Vielzahl von Faktoren zusammen. Zu diesen gehören die Stromazellen, die Blutversorgung, die extrazelluläre Matrix (EZM) sowie Hormone, Zytokine und andere Faktoren, die auf das Wachstum, die Proliferation und Differenzierung der Tumorstammzellen Einfluss nehmen können. Durch die regulativen Eigenschaften der Nische könnten auch Nicht-tumorstammzellen einen Tumorstammzellphänotyp annehmen. Adaptiert aus Sugihara *et al.* (2012) <sup>(52)</sup>.

Dass auch im Tumor eine differenzierte Tumorzelle einen Tumorstammzellphänotyp annehmen kann, wurde von Roesch *et al.* (2010) an Melanomen gezeigt. Sie konnten die Histondemethylase JARID1B zunächst erfolgreich als Biomarker für langsam proliferierende Tumorstammzellen, die essentiell für die Erhaltung des Tumors waren, nutzen. Sie stellten aber auch fest, dass die Expression von JARID1B über die Zeit dynamisch ist und auch

JARID1B-negative Zellen mit einiger Verzögerung einen JARID1B-positiven Tumorstammzellphänotyp erlangen. Als Konsequenz formulierten sie ein Modell der dynamischen Stammzellen, bei dem alle differenzierten Zelltypen des Tumors bei geeigneten Umweltbedingungen zu einem Tumorstammzellphänotyp zurückkehren können <sup>(62)</sup> (Abb. 5A).

Auch in weiteren Studien an Kolonkarzinomen <sup>(63)</sup> und Brustkrebs <sup>(64-66)</sup> wurden entsprechende Beobachtungen gemacht. Für die Regulation dieser Dynamik wurde eine „Stammzellnische“ postuliert, die durch eine spezielle Komposition von Faktoren (Blutversorgung, Stromazellen, extrazelluläre Matrix, Wachstumsfaktoren, Zytokine) für die Initiation und den Erhalt der Tumorstammzellen notwendig ist <sup>(67)</sup> (Abb. 5C).

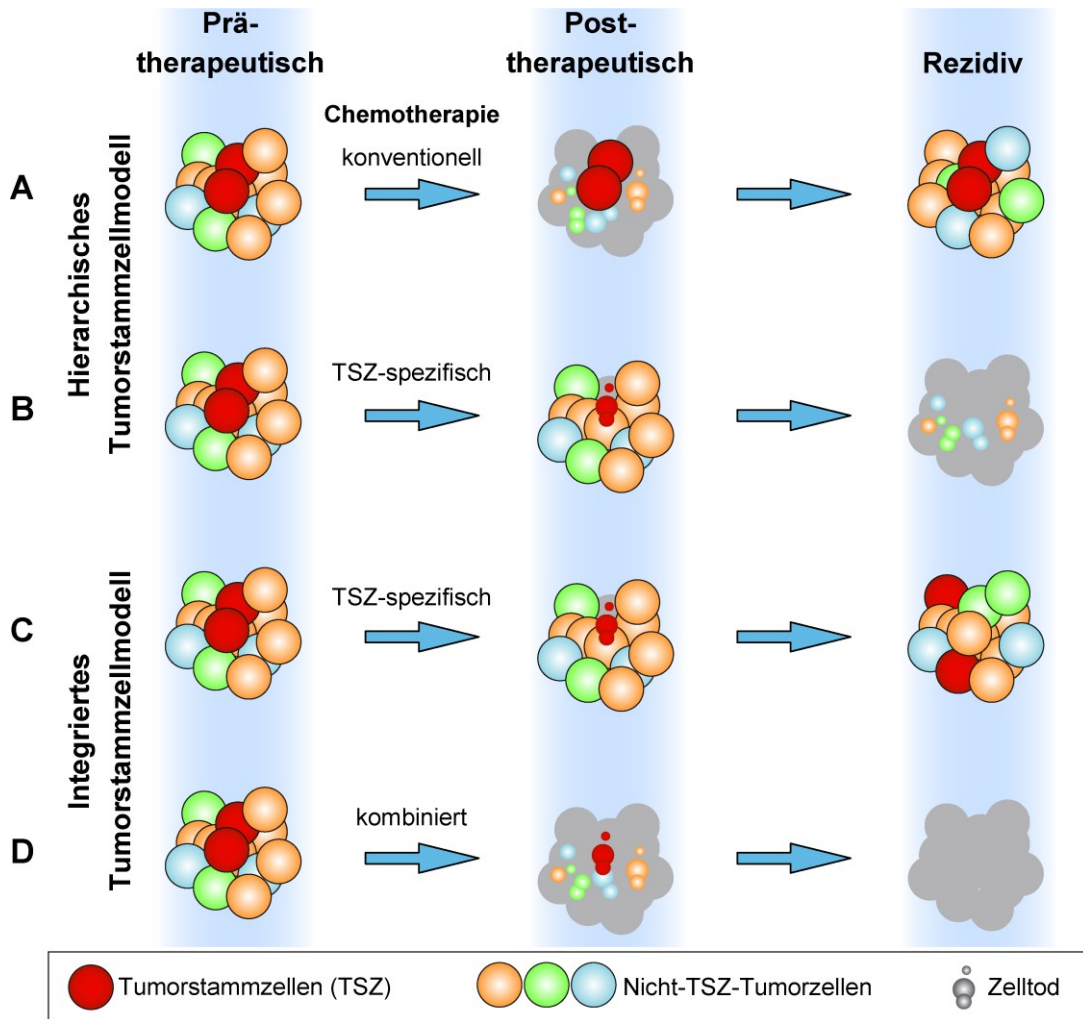
Das Tumorstammzellmodell ist auch unter Berücksichtigung der Plastizität nicht in der Lage allumfassend die Tumorbiologie zu erklären. So können heterogene Verteilungsmuster von somatischen Mutationen in Tumoren <sup>(68)</sup> sowie das Auftreten von genetisch unterschiedlichen Tumorstammzellpopulationen <sup>(69)</sup> am besten mit Hilfe des Modells der klonalen Evolution erklärt werden. Daher geht man mittlerweile von kombinierten Modellen aus, welche die Ansätze des hierarchischen und des plastischen Tumorstammzellmodells sowie des Modells der klonalen Evolution integrieren <sup>(52,70)</sup> (Abb. 5B).

### 1.3.4 Therapeutische Konsequenzen des Tumorstammzellmodells

Unter der Annahme des klassischen Tumorstammzellmodells würde eine Chemotherapie, welche schnell teilende Zellen durch DNA-Schädigung tötet (mit Cisplatin, 5-Fluorouracil, Taxol und anderen Agenzien) zwar den Großteil der Tumorzellen zerstören, jedoch nicht die sich langsam teilenden, resistenten Tumorstammzellen (Abb. 6A). Diese müssten mit alternativen Therapieansätzen, welche spezifisch auf Tumorstammzellen wirken, angegriffen werden <sup>(45,71)</sup>. Da die Tumorstammzellen essentiell für den Erhalt des Tumorwachstums sind, würde es nach dem strikt hierarchischen Modell ausreichen, allein die Tumorstammzellen zu zerstören und somit dem Tumor seine Regenerationsfähigkeit zu nehmen, wodurch er einginge (Abb. 6B).

Durch die erweiterten Modelle, die eine Plastizität des Tumorstammzellkompartiments beschreiben, wird jedoch nahe gelegt, dass auch Nichttumorstammzellen zu Tumorstammzellen wandelbar sind und so die verlorene Population ersetzbar ist. Die unmittelbare Konsequenz aus diesen flexiblen Modellen ist, dass eine erfolgreiche Therapie sowohl eine klassische, auf schnell teilende Tumorzellen ausgerichtete, als auch eine gegen die Tumorstammzellen gerichtete Komponente enthalten muss <sup>(52,66,70)</sup> (Abb. 6C und D). In beiden Fällen ist es nötig, eine gezielte Therapieoption für Tumorstammzellen zu entwickeln,

die zusammen mit der klassischen Chemotherapie eingesetzt werden kann. Dazu müssen Identifikationsmarker und Zielstrukturen für Tumorstammzellen, die von der klassischen Chemotherapie ausgespart werden, gefunden werden.



**Abb. 6:** Implikationen der Tumorstammzellhypothese für die Chemotherapie. **A)** Durch eine konventionelle Chemotherapie, die schnell teilende Zellen zerstört, wird die Hauptmasse der Tumorzellen getroffen aber die Tumorstammzellen (TSZ) überleben und führen zum Rezidiv. **B)** Unter Annahme des hierarchischen Tumorstammzellmodells genügt die gezielte Zerstörung der Tumorstammzellen um den Tumor seiner Regenerationsfähigkeit zu berauben. In der Folge geht der Tumor zugrunde. **C)** Durch das integrierte Tumorstammzellmodell wird impliziert, dass bei alleiniger Zerstörung der Tumorstammzellen sich diese aus den verbleibenden Tumorzellen regenerieren und so der Tumor fortbesteht. **D)** Um unter diesen Bedingungen eine erfolgreiche Therapie durchführen zu können, müssen kombinierte Therapiekonzepte erarbeitet werden, die sowohl die differenzierten Tumorzellen als auch die Tumorstammzellen treffen. Adaptiert aus Vermeulen *et al.* (2012)<sup>(71)</sup>.

### 1.3.5 Tumorstammzellen beim Magenkarzinom

Die Identität der normalen Gewebstammzellen der Magenschleimhaut ist noch unklar. Die gängige Theorie, dass diese in der Isthmusregion zwischen den sich schnell teilenden *transit amplifying cells* residieren<sup>(72)</sup> wurde für die Pylorus- und Antrumregion zunächst in Frage gestellt, da in einem Mausmodell alle Zellen der Magenschleimhaut direkte Nachfahren von sich dauerhaft teilenden LGR5-positive Stammzellen des Drüsengrunds waren. Daneben gibt es jedoch auch ruhende Stammzellen, die Nachfahren dieser LGR5-positiven Zellen zu sein scheinen und bei Verletzung reaktiviert werden, um möglicherweise die LGR5-positiven Stammzellen zu erneuern<sup>(58)</sup>. Für das intestinale LGR5-Stammzellkompartiment wurde ein solcher „Reserve-Stammzell“-Mechanismus kürzlich beschrieben<sup>(73)</sup>.

LGR5-positive Stammzellen könnten auch der Ursprung von Tumorstammzellen des Magenkarzinoms im Antrum sein<sup>(74)</sup>, aber auch eingewanderte Knochenmarksstammzellen wurden im Mausmodell als möglicher Ursprung von Magentumoren identifiziert<sup>(75)</sup>.

Versuche zur Identifizierung von Tumorstammzellen des Magens lieferten unterschiedliche, teils widersprüchliche Ergebnisse. In Magenkarzinomzelllinien wurden CD44-positive Zellen als potentielle Tumorstammzellpopulation identifiziert. In der gleichen Studie waren CD133, CD24 und andere Marker nicht geeignet<sup>(76)</sup>. Zhang *et al.* (2011) identifizierten eine CD44- und CD24-doppeltpositive potentielle Tumorstammzellpopulation in einer Magenkarzinomzelllinie und in humanen Tumoren<sup>(77)</sup>. Der Eignung von CD44 und CD133 als Marker für Magenkarzinom-Tumorstammzellen widerspricht eine Studie an primären Magenkarzinomzellen<sup>(78)</sup>. In einem aktuellen Review werden insgesamt 22 potentielle Marker und Markerkombinationen für normale Stammzellen und Tumorstammzellen des Magens genannt<sup>(79)</sup>. Die Frage nach den (Tumor-) Stammzellen des Magens bleibt daher noch ungelöst.

## 1.4 Identifikation und Charakterisierung von Tumorstammzellen

### 1.4.1 Oberflächenmarker

Bei der Suche nach geeigneten Markern für Tumorstammzellen wurden besonders Oberflächenmarker untersucht, da sie eine FACS-basierte Expressionsquantifizierung und Sortierung von vitalen Zellen ermöglichen. Diese potentiellen Tumorstammzellmarker wurden vorrangig danach ausgesucht, wie gut sie die Tumorzellen in tumorinitiierende und nichttumorinitiierende Zellpopulationen einteilen (Surrogatmarker) und nicht funktionell bewertet. Der Oberflächenmarker CD133 zum Beispiel wird seit 2003 als Tumorstammzellmarker in vielen Untersuchungen eingesetzt<sup>(80)</sup>, jedoch wurden erst 2012 direkte Funktionen (Interaktionen mit dem Wachstumsfaktor VEGF) für dieses Protein bestimmt<sup>(81)</sup>. Im Magenkarzinom scheint dieser Marker nach neuesten Erkenntnissen nicht geeignet zu sein um Tumorstammzellen zu identifizieren<sup>(78)</sup>, ist aber mit dem Differenzierungsgrad des Tumors assoziiert<sup>(82)</sup>. Dies verdeutlicht, dass Surrogatmarker für den jeweiligen Tumortyp, für den sie gefunden wurden gut einsetzbar sind um tumorinitiierende Zellen zu identifizieren, gleichzeitig ist ihre Übertragbarkeit auf andere Tumorentitäten oder sogar auf andere Patientenkollektive innerhalb einer Tumorgruppe sehr limitiert<sup>(83)</sup>.

Andere für die Analyse von Tumorstammzellen wichtige Oberflächenmarker sind CD44 und CD24. CD44 ist ein transmembranäres Glykoprotein und dient als Rezeptor für Hyaluronsäure und andere extrazelluläre Matrixbestandteile<sup>(84)</sup>. Die CD44-Proteinexpression wurde für viele Tumorerkrankungen, darunter Brust- und Magenkarzinome, als Tumorstammzellmarker eingesetzt, oft in Kombination mit anderen Markern wie CD24<sup>(76,85,86)</sup>. Es gibt jedoch gewebs- und tumorspezifische Unterschiede, ob eine hohe oder eine niedrige Expression von CD24 die potentiellen Tumorstammzellen charakterisiert<sup>(86,87)</sup>. Funktionell hat CD44 Einfluss auf die Chemotherapieresistenz, Metastasierung und Proliferation von Tumorzellen. Aufgrund der vielfältigen Modifikationen und Spleißvarianten von CD44 sind diese Funktionen jedoch zum Teil gewebs- oder tumorspezifisch. CD24 ist in vielen Tumoren stark exprimiert und kann unter anderem als Ligand für P-Selektin dienen, wodurch die Extravasation von metastasierenden Tumorzellen erleichtert wird<sup>(86,87)</sup>.

CD34-Positivität bei gleichzeitiger CD38-Negativität (CD34<sup>positiv</sup>/CD38<sup>negativ</sup>) wurde bereits 1994 als Marker für hämatoonkologische Tumorstammzellen beschrieben<sup>(88)</sup>. Diese Markerkombination ist für die Anreicherung von Tumorstammzellen in der akuten myeloischen Leukämie (AML) weitestgehend akzeptiert, es werden jedoch noch weitere, verfeinerte

Markerkombinationen untersucht<sup>(89)</sup>. CD34 wird auch in Endothelien exprimiert und die Expression in Tumorgefäßen ist mit der Progression von Magenkarzinomen verknüpft<sup>(90)</sup>.

## 1.4.2 Transkriptionsfaktoren

Einen wichtigen Ansatz zur Identifikation von potentiellen Tumorstammzellen bietet die Auswahl anhand der Expression von Markern, die exklusiv in Stammzellen des jeweiligen Normalgewebes exprimiert werden oder an Signalwegen beteiligt sind, welche für die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften oder für die embryonale Differenzierung notwendig sind.

Die Transkriptionsfaktoren POU5F1, Nanog und SOX2 sind gemeinsam für die Regulation dieser Prozesse in embryonalen Stammzellen von herausragender Bedeutung<sup>(61,91)</sup>. POU5F1 wird fast ausschließlich in Stammzellen während der Entwicklung exprimiert und reguliert die Pluripotenz von Stammzellen<sup>(60,61,92)</sup>. Im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom und im Adenokarzinom der Lunge waren die Tumorstammzeleigenschaften von CD133-positiven Zellen abhängig von der *POU5F1*-Expression<sup>(93,94)</sup>. Als direkter Marker für potentielle Tumorstammzellen wurde POU5F1 in Ovarialkarzinommodellen eingesetzt<sup>(95)</sup>.

Nanog hemmt die Differenzierung von Stammzellen und spielt somit eine wichtige Rolle in der Embryogenese<sup>(96)</sup>. Im Prostatakarzinom wird Nanog verstärkt in potentiellen Tumorstammzellen exprimiert und ist für die Tumorbildung von Prostata-, Brust- und Kolonkarzinomzellen von Bedeutung<sup>(97)</sup>.

SOX2 ist als Transkriptionsfaktor auch an der Expressionsregulation von POU5F1 beteiligt. Die Expressionshöhe dieser Gene zusammen bestimmt die Differenzierung von embryonalen Stammzellen<sup>(92)</sup>. Ein vergleichbarer regulativer Einfluss wurde für potentielle Tumorstammzellen im Adenokarzinom der Lunge beschrieben. Hier bildeten POU5F1,  $\beta$ -Catenin und SOX2 einen Komplex, der essentiell für den Erhalt des onkogenen Potentials ist<sup>(94)</sup>. Auch in potentiellen Tumorstammzellen des Magens wurde eine erhöhte *SOX2*-Genexpression festgestellt<sup>(98)</sup>.

Neben den drei genannten sind noch eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren mit der Regulation von (Tumor-) Stammzellen assoziiert. Zu diesen gehören LIN28<sup>(61)</sup>, BMI1<sup>(99)</sup>, KLF4 und MYC<sup>(60)</sup>.

### 1.4.3 Signalwege

Für die Regulation von Wachstum und Differenzierung von Stammzellen sind drei Signalwege von zentraler Bedeutung: der Wnt-Signalweg<sup>(100,101)</sup>, der Notch-Signalweg<sup>(102)</sup> und der Hedgehog-Signalweg<sup>(103,104)</sup>.

#### 1.4.3.1 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg scheint in besonderem Maße für die gastrointestinale Stammzellfunktion bedeutsam zu sein<sup>(105)</sup> und auch andere Stammzellkompartimente werden Wnt-abhängig reguliert<sup>(106)</sup>. Störungen im Wnt-Signalweg führen zu veränderter Wachstumsregulation und können Tumorstadium hervorrufen<sup>(100)</sup>. Die membrangebundenen Rezeptoren des Signalwegs sind die *Frizzled*-Proteine (FZD). Eine vermehrte Expression von *FZD1* wurde in chemoresistenten Neuroblastomzellen gefunden und damit eine Verbindung zwischen dem Wnt-Signalweg und Chemoresistenz hergestellt<sup>(107)</sup>. Extrazelluläre negative Regulatoren des Wnt-Signalwegs sind *Secreted frizzled-related proteins* (SFRP) sowie die *Dickkopf-homologue* (DKK)-Proteine. Sie inhibieren den Wnt-Signalweg durch kompetitive Bindung der Liganden beziehungsweise durch Inhibition und Internalisierung der Korezeptoren (*Low-density lipoprotein receptor-related proteins*, LRP). Besonders DKK3 scheint wichtige Funktionen als Tumorsuppressor auszuüben<sup>(104,108)</sup>. Die intrazelluläre Regulation des Wnt-Signalwegs erfolgt über den  $\beta$ -Catenin-Zerstörungskomplex, welcher im Wesentlichen aus dem Gerüstprotein Axin, den Tumorsuppressoren APC und WTX und den Serin/Threonin-Kinasen GSK3A/B und CK1 $\alpha/\delta$  besteht<sup>(100)</sup>. Die Funktionsweise dieses Komplexes besteht darin, dass der zentrale Transkriptionsfaktor  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma an den Komplex gebunden wird und durch Phosphorylierung in einem Degradationsmotiv zum proteasomalen Abbau geführt wird<sup>(100)</sup>. Durch Aktivierung des Wnt-Signalwegs wird der Zerstörungskomplex aufgelöst und es kommt zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin, welches sich frei im Zytoplasma akkumuliert und in den Kern transloziert. Dort wirkt  $\beta$ -Catenin auf die Expression von verschiedenen relevanten Zielgenen, wie den Zellzyklusregulatoren Cyclin D1 und den Transkriptionsfaktor MYC, welche als Onkogene bekannt sind<sup>(60,109)</sup>. Weitere Proteine, deren Expression durch den Wnt-Signalweg gesteuert wird, sind ASCL2 und LGR5. ASCL2 ist ein Differenzierungsregulator von intestinalen Stammzellen<sup>(110)</sup>. LGR5 ist ein zuverlässiger Marker für gastrointestinale Stammzellen<sup>(101)</sup> und LGR5-positive Zellen könnten die Ursprungszellen für intestinale Karzinome sein<sup>(111)</sup>. Gleichzeitig wirken LGR5 und das strukturell ähnliche LGR4 als Rezeptoren für R-Spondin aktivierend auf den Wnt-Signalweg ein<sup>(112)</sup>.



### 1.4.3.2 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg spielt in der Embryonalentwicklung, Proliferationsregulation, Differenzierung und Apoptose eine entscheidende Rolle. Da bei diesem Signalweg sowohl die Liganden (*Jagged*, JAG und *Delta-like*, DLL) als auch die Rezeptoren (*Neurogenic locus notch homolog protein*, Notch) membrangebunden vorliegen wird der Signalweg nur bei direkten Zell-Zell-Interaktionen aktiviert. Nach der Ligandenbindung wird die extrazelluläre Domäne des Rezeptors durch ADAM10/ADAM17 abgespalten. Das in der Membran verankerte Teilstück NEXT (*Notch extracellular truncation*) wird durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex erneut gespalten, wodurch die *Notch intracellular domain* (NICD) freigesetzt wird. NICD transloziert in den Nukleus und wirkt dort als Transkriptionsfaktor zusammen mit einer Reihe anderer Faktoren direkt auf die Expression der Notch-Zielgene ein<sup>(102,113)</sup>. Notch-Signale tragen gemeinsam mit dem Wnt-Signalweg zur Aufrechterhaltung des Stammzellkompartiments und der normalen Zusammensetzung des intestinalen Epithels bei. In intestinalen Epithelien führt die Inhibition des Notch-Signalwegs zur vollständigen Differenzierung aller Epithelzellen zu sekretorischen Becherzellen<sup>(114)</sup>. In der Embryonalentwicklung werden über Notch-Signale wichtige Segmentierungsprozesse gesteuert<sup>(115)</sup>.

In einer Reihe von Tumorerkrankungen ist die Aktivität oder Expression von Komponenten des Notch-Signalwegs mit einer Chemotherapieresistenz assoziiert, unter anderem bei der Behandlung von Kolonkarzinomen mit platinbasierten Chemotherapeutika<sup>(116,117)</sup> (für eine Übersicht, siehe Wang *et al.* (2010)<sup>(118)</sup>). Weiterhin sind Notch-Signale, insbesondere durch die Aktivierung von Notch2, für die Progression von pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) zu duktalem Pankreaskarzinomen (PDAC) notwendig<sup>(119)</sup>. Diese und weitere ähnliche Beobachtungen haben dazu geführt, dass der Notch-Signalweg sich auch im Hinblick auf mögliche Tumorstammzellen zu einer interessanten therapeutischen Zielstruktur entwickelt<sup>(120)</sup>.

### 1.4.3.3 Der Hedgehog-Signalweg

Der Hedgehog-Signalweg wird durch Bindung von *Sonic-* (SHH), *Indian-* (IHH) oder *Desert-hedgehog* (DHH) an einen *Patched*-Rezeptor (PTCH1/2) aktiviert. Dadurch wird der Signaltransduktor *Smoothed* (SMO) freigesetzt und dieser aktiviert über die Serin/Threonin-Kinase 36 die Gli-Transkriptionsfaktoren (GLI1/2/3). *GLI1*, *PTCH1* und der Notch-Ligand *JAG2* sind Zielgene des Hedgehog-Signalwegs. Durch Expression von Zellzykluspromotoren wie *CCND2* und *FOXMI* führt die Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs zur Proliferation der betroffenen Zellen<sup>(104)</sup>. Die Deregulation des Hedgehog-Signalwegs oder seiner Komponenten wird in vielen Tumorerkrankungen beschrieben. Zu diesen gehören

Brust-<sup>(121)</sup>, Pankreas-<sup>(122)</sup> und Magenkarzinome<sup>(123)</sup>. Außerdem wird Hedgehog eine zentrale Bedeutung für die Proliferation und den Erhalt von Tumorstammzellen zugeschrieben<sup>(124,125)</sup>.

#### 1.4.4 Andere Tumorstammzellmarker

Als funktionelle Tumorstammzellmarker gelten ALDH1 und ABCG2. ALDH1A1 ist eine Isoform der Aldehyddehydrogenase 1, welche Retinol zu Retinolsäure umwandelt und besonders in hämatopoetischen Stammzellen hoch exprimiert wird. Die katalytische Eigenschaft von ALDH1A1 wird für einen fluoreszenzbasierten Nachweis genutzt und konnte in mehreren Studien zur Isolation von Tumorstammzellen eingesetzt werden<sup>(86,126)</sup>. Eine Studie an akuter myeloischer Leukämie (AML) kam jedoch zu dem Schluss, dass eine Gruppe von CD34<sup>positiv</sup>/CD38<sup>negativ</sup>-Zellen mit einer intermediären ALDH-Aktivität die Tumorstammzellen beschrieb, während eine hohe Aktivität den normalen hämatopoetischen Stammzellen vorbehalten war<sup>(89)</sup>.

Die 48 bekannten *ATP-binding cassette* (ABC)-Transporter sind für den aktiven zellulären Export von verschiedenen endogenen und exogenen Substanzen verantwortlich. Zu den Substraten gehören auch viele Chemotherapeutika, die besonders von ABCB1, ABCC1 und ABCG2 exportiert werden, so dass die Expression dieser ABC-Transporter in Tumoren einen *multidrug-resistance* (MDR)-Phänotyp verursacht<sup>(127,128)</sup>. Besonders ABCG2 wird oft mit anderen Tumorstammzellmarkern koexprimiert und ist für den Export von Hoechst33342 in der Analyse von *side-populations* mitverantwortlich (siehe Abschnitt 1.4.5.2)<sup>(129)</sup>.

#### 1.4.5 Nachweis und Anreicherung von Tumorstammzellen

##### 1.4.5.1 Xenotransplantation

Als Standard für die Überprüfung der Tumorinitiationsfähigkeit gilt die Xenotransplantation von potentiellen Tumorstammzellen in immundefiziente *non obese diabetic/severe combined immunodeficiency* (NOD/SCID)-Mäuse im Vergleich mit Nichttumorstammzellen. Die potentiellen Tumorstammzellen werden dann als solche angesehen, wenn die Anzahl der Zellen, die benötigt wird um Tumorwachstum hervorzurufen erheblich kleiner ist, als die benötigte Anzahl der übrigen Zellen des Tumors (Nichttumorstammzellen)<sup>(59,83)</sup>. Außerdem sollte der entstehende Tumor die Heterogenität des Ausgangstumors widerspiegeln. Dies wird oft mit der erneuten Ungleichverteilung der eingesetzten Tumorstammzellmarker belegt, wobei Shackleton *et al.* (2009) anmerken, dass genetische und epigenetische Heterogenität bisher nicht berücksichtigt wurden<sup>(59)</sup>. Insgesamt wird die Tumorinitiation nach Xenotransplantation als Tumorstammzelltest zunehmend kritisch gesehen, da Unterschiede in

der Tumorumgebung zwischen Transplantat und Ursprungstumor nicht vorhersehbar sind. Auch existieren verschiedene Protokolle, die zu abweichenden Ergebnissen führen können. So besitzen auch NOD/SCID-Mäuse noch eine Restimmunaktivität, welche das Wachstum der Tumorzellen inhibieren kann und zu einer erheblichen Unterschätzung der Tumorinitiationsfähigkeit führen kann<sup>(130)</sup>. Außerdem sind Wachstumsfaktoren und -rezeptoren zwischen Maus und Mensch nur bedingt kompatibel und müssen unter Umständen zugegeben werden<sup>(131,132)</sup>.

#### 1.4.5.2 *Side-populations*

*Side-population* (SP)-Zellen werden dadurch charakterisiert, dass sie in der Lage sind einen DNA-Farbstoff (Hoechst33342) mit Hilfe von ABC-Transportern auszuschleusen, wodurch sie im Durchflusszytometer von den nicht-SP-Zellen differenzierbar sind. Ursprünglich wurde beobachtet, dass Knochenmarks-SP-Zellen von Mäusen ein ca. 1000-fach höheres Potential für die Wiederherstellung des Knochenmarks von bestrahlten Mäusen aufwiesen als nicht-SP-Zellen. Damit konnte gezeigt werden, dass hämatopoetische Stammzellen zu den SP-Zellen gehören<sup>(133)</sup>. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass SP-Zellen von verschiedenen Tumoren Tumorstammzeleigenschaften aufweisen. Die für den SP-Phänotyp verantwortlichen Transportproteine sind auch für die Ausprägung der putativen Tumorstammzeleigenschaft „erhöhte Chemoresistenz“ mitverantwortlich<sup>(56,134-137)</sup>. Durch die Vielzahl der Transporter der ABC-Familie, welche für den SP-Phänotyp verantwortlich sein können, ist die Anreicherung von Tumorstammzellen über diese Methode breit einsetzbar<sup>(86)</sup>.

#### 1.4.5.3 Tumorsphäroide

Tumorsphäroide sind dreidimensionale, adhärenzfreie *in vitro*-Kulturmodelle für Tumorzellen. Sie wurden entwickelt um eine bessere Annäherung der Kulturbedingungen an den lebenden Organismus zu erreichen, um so zum Beispiel bessere Vorhersagen über die Wirksamkeit von Chemotherapeutika treffen zu können<sup>(138)</sup>. Tumorsphäroide werden mit verschiedenen Techniken hergestellt. Zum Beispiel mechanisch durch kreisende Bewegungen der Kulturschalen oder mit spezifischen Mediumszusätzen wie EGF (*epithelial growth factor*) und bFGF (*basal fibroblast growth factor*), welche eine spontane Formation der Sphäroide bewirken können<sup>(139)</sup>. Im Zusammenhang mit dem Tumorstammzellmodell werden Tumorsphäroide genutzt, um die Tumorinitiationsfähigkeit von Zellen zu überprüfen ohne auf ein Tiermodell zurückzugreifen. Nur ein geringer Anteil der Tumorzellen, nämlich die Tumorstammzellen, sollten demnach zur Sphäroidbildung fähig sein, während die übrigen Zellen in den adhärenzfreien Bedingungen nicht oder nur beschränkt proliferieren<sup>(139)</sup>.

## 1.5 Fragestellung

Neoadjuvante Behandlungsschemata, wie sie beim lokal fortgeschrittenen Magenkarzinom eingesetzt werden, bieten die einzigartige Möglichkeit Tumorzellen vor und nach einer Chemotherapie zu untersuchen. Nicht alle Patienten profitieren in der gleichen Weise von der Therapie und es verbleiben unterschiedlich große Anteile von Resttumorzellen.

Das Tumorstammzellmodell geht davon aus, dass eine Subpopulation der Tumorzellen, die sich durch ihr Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzial sowie erhöhte Chemo-resistenz auszeichnet, das Tumorwachstum aufrechterhält. Entsprechend sollte

- 1) eine höhere Expression von tumorstammzellassozierten Genen im Residualtumor mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einhergehen und
- 2) Tumorstammzellen in den Residualtumoren gegenüber dem prätherapeutischen Tumor angereichert sein.

Die vorliegende Arbeit hatte die molekulare Charakterisierung dieser Aspekte der Tumorstammzellhypothese in neoadjuvant chemotherapierten Magenkarzinomen zum Ziel:

- 1) Expressionsanalyse tumorstammzellassoziierter Gene in den residualen Tumorzellen, um mögliche Zusammenhänge zwischen der Expression dieser Gene und den klinisch-pathologischen Daten der untersuchten Patienten zu finden.
- 2) Vergleichende Expressionsanalysen in korrespondierenden prä- und posttherapeutischen Tumorproben, die auf eine Anreicherung von Tumorstammzellen in den residualen Tumorzellen hindeuten könnten.

Die Befunde aus den *in vivo*-Untersuchungen sollten *in vitro* auf Hinweise für funktionelle Zusammenhänge überprüft werden:

- 3) Etablierung und Anwendung geeigneter Testsysteme für die Untersuchung von Tumorstammzeleigenschaften in Magenkarzinomzelllinien
- 4) Überprüfung des Einflusses ausgewählter Gene auf die Chemosensitivität von Magenkarzinomzelllinien durch RNA-Interferenz-basierte Herunterregulation der Genexpression.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patienten und Tumoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Tumorproben von neoadjuvant chemotherapierten Magenkarzinomen stammen aus einem Gesamtkollektiv von 480 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Magenkarzinom. Die Patienten wurden in den Jahren von 1991 bis 2007 im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München mit einem Platin/5-Fluorouracil-basierten, neoadjuvanten Chemotherapieprotokoll behandelt. Das histopathologische Ansprechen der Tumoren auf die Therapie (Tumorregression) wurde nach einem standardisierten Protokoll evaluiert und anhand des Anteils residueller Tumorzellen im Tumorknoten in drei Tumorregressionsgrade (TRG) eingeteilt<sup>(37,41,140)</sup>. TRG3 umfasste Tumoren mit mehr als 50 % Residualtumor, Tumoren mit 10 bis 50 % Residualtumor wurden als TRG2 und Tumoren mit weniger als 10 % Residualtumor im Tumorknoten wurden als TRG1b eingestuft. Tumoren mit totaler Tumorregression (kein Residualtumor) wurden mit TRG1a bezeichnet.

Insgesamt 129 der 480 Patienten wiesen Tumoren mit TRG2 auf. Die posttherapeutischen Resektate von 63 dieser Patienten wurden in dieser Arbeit im Rahmen eines Genexpressions-*screenings* untersucht (Tab. 1). Haupteinschlusskriterien waren die Verfügbarkeit von genügend Tumormaterial, sowie der Abschluss von mindestens 50 % der geplanten Chemotherapie. Der Vergleich der klinischen Parameter vor der Chemotherapie zwischen den 63 untersuchten und 66 nicht untersuchten Patienten ergab keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von Geschlecht, Alter, Tumorlokalisation und histologischem Subtyp nach Laurén (Tab. 2).

**Tab. 1: Patientencharakteristika und Behandlungsschemata der Patienten mit Tumoren mit TRG2, welche in der Screening-Analyse untersucht wurden**

Variable	Kategorie	n (%)
<b>Patienten</b>		63 (100)
<b>Alter [a]</b>	Median	57,6
	Spanne	35,0 – 73,0
<b>Geschlecht</b>	Weiblich	16 (25)
	Männlich	47 (74)
<b>Lokalisation</b>	Proximal	43 (68)
	Medial	12 (19)
	Distal	7 (11)
	Gesamter Magen	1 (1)
<b>Laurén-Klassifikation</b>	Intestinal	24 (38)
	Nichtintestinal	39 (61)
<b>Differenzierungsgrad</b>	G1+2	5 (7)
	G3	58 (92)
<b>Neoadjuvante Chemotherapie</b>	PLF <sup>1</sup>	48 (76)
	OLF <sup>2</sup>	3 (4)
	E-PLF <sup>3</sup>	4 (6)
	T-PLF <sup>4</sup>	8 (12)
<b>Resektionskategorie</b>	R0	53 (84)
	R1	10 (15)
<b>ypT Kategorie <sup>5</sup></b>	ypT0-2	46 (73)
	ypT3+4	17 (27)
<b>ypN Kategorie <sup>5</sup></b>	ypN0	24 (38)
	ypN1-3	39 (61)
<b>ypM Kategorie <sup>5</sup></b>	ypM0	52 (82)
	ypM1	11 (17)

<sup>1</sup> Präoperatives Chemotherapie-Protokoll *Platin-Leucovorin-Fluorouracil*: zwei Zyklen, jeweils bestehend aus Cisplatin (50 mg/m<sup>2</sup>Körperoberfläche (m<sup>2</sup>KO)) in Woche 1, 3 und 5 und sowohl Leucovorin (500 mg/m<sup>2</sup>KO) als auch 5-Fluorouracil (2000 mg/m<sup>2</sup>KO) in Woche 1 bis 6; <sup>2</sup> *Oxaliplatin-Leucovorin-Fluorouracil*: Oxaliplatin (85 mg/m<sup>2</sup>KO) ersetzt Cisplatin in PLF; <sup>3</sup> PLF mit zusätzlicher Epirubicin-Behandlung (30 mg/m<sup>2</sup>KO) in Woche 2, 4, und 6; <sup>4</sup> PLF mit zusätzlicher Paclitaxel- (85 mg/m<sup>2</sup>KO) oder Docetaxel-Behandlung (40 bis 50 mg/m<sup>2</sup>KO) in Woche 1, 3, und 5; <sup>5</sup> *TNM Classification of Malignant Tumors*, 6th Edition, UICC

Die Zeiträume der Nachsorge und des Überlebens, als klinischer Endpunkt der Studie, wurden ab dem Beginn der Chemotherapie bis zum letzten Kontakt mit dem Patienten beziehungsweise bis zum Todesdatum (alle Ursachen) berechnet. Die mediane Nachsorgezeit betrug 77,1 Monate (mo) (Spanne: 28,5 - 08,5), das mediane Gesamtüberleben betrug 50,9 mo (Spanne: 4,5 - 108,5, 95 % KI: 25,6 - 76,3). 37 von 63 Patienten waren zum Ende der Nachsorgezeit verstorben. Diese Fallzahl und Anzahl der Ereignisse waren ausreichend groß um die in dieser Arbeit untersuchten Parameter zu schätzen <sup>(141,142)</sup>.

**Tab. 2: Vergleich der untersuchten und nicht untersuchten Patienten mit Tumoren mit TRG2**

Variable	Kategorie	Untersucht	Nicht untersucht	P <sup>1</sup>
		n (%)	n (%)	
<b>Patienten</b>		63 (100)	66 (100)	
<b>Alter [a]</b>	Median	58	58	0,459 <sup>2</sup>
	Spanne	35 – 73	35 – 75	
<b>Geschlecht</b>	Weiblich	16 (25)	20 (30)	0,535
	Männlich	47 (74)	46 (70)	
<b>Tumor Lokalisation</b>	Proximal	43 (68)	34 (52)	0,053
	Andere	20 (32)	32 (48)	
<b>Laurén-Klassifikation</b>	Intestinal	24 (38)	31 (47)	0,308
	Nichtintestinal	39 (61)	35 (53)	

<sup>1</sup>  $\chi^2$ -Test, <sup>2</sup> Mann-Whitney U-Test

Für die vergleichenden qRT-PCR-basierten Analysen wurden korrespondierende prätherapeutische Biopsien und posttherapeutische Resektate von jeweils 22 Patienten mit Tumoren mit TRG2 und TRG3 ausgewählt. Die Resektate der Tumoren mit TRG2 wurden auch in der vorangegangenen *Screening*-Analyse untersucht. Für die folgenden immunhistochemischen Analysen wurden zusätzlich 22 Patienten mit Tumoren mit TRG1b ausgewählt. Als Kontrolle dienten hierbei Biopsien und Resektate von 16 Tumoren, welche primär reseziert wurden (keine Chemotherapie) (Tab. 3). Das Auswahlkriterium war die Verfügbarkeit korrespondierender prä- und posttherapeutischer Tumorproben.

Ein zusätzliches Patientenkollektiv wurde zusammengestellt, um geeignete Referenzgene für die Genexpressionsanalysen zu bestimmen (Tab. 4).

Die Nutzung und Untersuchung der Gewebeproben in dieser Studie wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München zugelassen (Referenznummer: 2158/08) und die Einwilligung der Patienten wurde entsprechend der Institutsregularien eingeholt.

**Tab. 3: Patientencharakteristika und Behandlungsschemata der Patienten mit Tumoren mit TRG1b, TRG2 und TRG3 sowie primär resezierten Tumoren welche in den differentiellen Expressionsanalysen untersucht wurden**

Variable	Kategorie	TRG1b	TRG2	TRG3	Keine CTx
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Patienten</b>		22 (100)	22 (100)	22 (100)	16 (100)
<b>Alter [a]</b>	Median	60,9	60	61,8	60,5
	Spanne	44,2 – 78,8	39,2 – 73,0	40,3 – 77,6	39,5 – 78,9
<b>Geschlecht</b>	Weiblich	3 (14)	8 (36)	5 (23)	7 (44)
	Männlich	19 (86)	14 (64)	17 (77)	9 (56)
<b>Lokalisation</b>	Proximal	17 (77)	20 (91)	16 (73)	1 (6)
	Medial	2 (9)	1 (5)	3 (14)	8 (50)
	Distal	3 (14)	1 (5)	2 (9)	5 (31)
	Gesamter Magen	0 (0)	0 (0)	1 (5)	2 (13)
<b>Laurén-Klassifikation</b>	Intestinal	13 (59)	8 (36)	10 (45)	2 (13)
	Nichtintestinal	9 (41)	14 (64)	12 (55)	14 (88)
<b>Differenzierungsgrad</b>	G1+2	9 (41)	1 (5)	4 (18)	1 (6)
	G3	13 (59)	21 (95)	18 (82)	15 (94)
<b>Neoadjuvante Chemotherapie</b>	PLF <sup>1</sup>	19 (86)	21 (95)	22 (100)	0 (0)
	OLF <sup>2</sup>	2 (9)	1 (5)	0 (0)	0 (0)
	E-PLF <sup>3</sup>	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	T-PLF <sup>4</sup>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Resektions-Kategorie</b>	R0	20 (91)	18 (82)	16 (73)	11 (69)
	R1	2 (9)	4 (18)	6 (27)	5 (31)
<b>ypT Kategorie <sup>5</sup></b>	ypT0-2	20 (91)	15 (68)	15 (68)	1 (6)
	ypT3+4	2 (9)	7 (32)	7 (32)	15 (94)
<b>ypN Kategorie <sup>5</sup></b>	ypN0	6 (27)	9 (41)	4 (18)	5 (31)
	ypN1-3	16 (73)	13 (59)	18 (82)	10 (63)
	Unbekannt	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6)
<b>ypM Kategorie <sup>5</sup></b>	ypM0	18 (82)	17 (77)	17 (77)	3 (19)
	ypM1	2 (9)	5 (23)	5 (23)	3 (19)
	Unbekannt	2 (9)	0 (0)	0 (0)	10 (63)

<sup>1</sup> Präoperatives Chemotherapie-Protokoll *Platin-Leucovorin-Fluorouracil*: zwei Zyklen, jeweils bestehend aus Cisplatin (50 mg/m<sup>2</sup>KO) in Woche 1, 3 und 5 und sowohl Leucovorin (500 mg/m<sup>2</sup>KO) als auch 5-Fluorouracil (2000 mg/m<sup>2</sup>KO) in Woche 1 bis 6; <sup>2</sup> *Oxaliplatin-Leucovorin-Fluorouracil*: Oxaliplatin (85 mg/m<sup>2</sup>KO) ersetzt Cisplatin in PLF; <sup>3</sup> PLF mit zusätzlicher Epirubicin-Behandlung (30 mg/m<sup>2</sup>KO) in Woche 2, 4, und 6; <sup>4</sup> PLF mit zusätzlicher Paclitaxel- (85 mg/m<sup>2</sup>KO) oder Docetaxel-Behandlung (40 bis 50 mg/m<sup>2</sup>KO) in Woche 1, 3, und 5; <sup>5</sup> TNM Classification of Malignant Tumors, 6th Edition, UICC, **CTx**: Chemotherapie



**Tab. 4: Patientencharakteristika des Kollektivs für die Bestimmung der Referenzgene**

<b>Variable</b>	<b>Kategorie</b>	<b>n (%)</b>
<b>Patienten</b>		8 (100)
<b>Laurén-Klassifikation</b>	Intestinal	3 (38)
	Nichtintestinal	5 (63)
<b>Therapie</b>	Primär reseziert	7 (88)
	Neoadjuvante CTx	1 (13)
<b>Lokalisation</b>	Proximal	4 (50)
	Medial	3 (38)
	Distal	1 (13)
	Gesamter Magen	0 (0)

## 2.2 Zelllinien

Tab. 5: Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Kategorie	Unter-kategorie	Beschreibung
MKN1	Herkunft		RIKEN BioResource Center (RIKEN BRC, Tsukuba, Japan)
	Bestellnummer		RCB1003
	Ursprung	Patient Gewebe	72-jähriger, männlicher Asiat Lymphknotenmetastase eines Magenkarzinoms
	Histologie des Primärtumors		Adenosquamöses Karzinom des Magens
	Morphologie der Zellkultur		Epithelial; adhärent; mehrzipflige Zellen; bildet lockere und unscharf begrenzte Kolonien
	Identitätsprüfung	Bestätigte Mutationen Cell-ID™	<i>PIK3CA</i> Exon 9 (c.1633G>A, p.E545K) <i>TP53</i> Exon 5 (c.428T>C, p.V143A) <sup>(143)</sup> Positiv
KATOIII	Herkunft		European Collection of Cell Culture (ECACC, Port Down, UK)
	Bestellnummer		86093004
	Ursprung	Patient Gewebe	55-jähriger, männlicher Asiat Metastase eines Magenkarzinoms (Pleuraerguss)
	Histologie des Primärtumors		Schlecht differenziertes Siegelringzell-Karzinom des Magens
	Morphologie der Zellkultur		Kugelige Zellen; ca. 70 % adhärent; bildet lockere Zellverbände
	Identitätsprüfung	Bestätigte Mutationen Cell-ID™	<i>CDH1</i> Exon 7 (c.1008G>A; p.E336E) <sup>(143,144)</sup> Positiv
MKN28	Herkunft		Dr. Wacheck, Fachbereich für klinische Pharmakologie (Medizinische Universität Wien, Österreich)
	Bestellnummer		-
	Ursprung	Patient Gewebe	70 jährige, weibliche Kaukasierin Lymphknotenmetastase eines Magenkarzinoms
	Histologie des Primärtumors		Moderat differenziertes, tubuläres Adenokarzinom des Magens
	Morphologie der Zellkultur		Epithelial; adhärent; pflastersteinartig zusammenhängende Zellformationen; bildet dichte, scharf abgegrenzte Kolonien
	Identitätsprüfung	Bestätigte Mutationen Cell-ID™	TP53 Mutation in Exon 7 (c.751A>C; p.I251L) <sup>(143)</sup> Positiv

Zelllinie	Kategorie	Unter-kategorie	Beschreibung
AGS	Herkunft		European Collection of Cell Culture (ECACC, Port Down, UK)
	Bestellnummer		89090402
	Ursprung	Patient Gewebe	54 jährige , weibliche Kaukasierin Primärtumor eines Magenkarzinoms
	Histologie des Primärtumors		Schlecht differenziertes, diffuses Adenokarzinom des Magens
	Morphologie der Zellkultur		Epithelial, adhärent, kantige Zellen, bildet dichte aber unscharf begrenzte Kolonien
	Identitätsprüfung	Bestätigte Mutationen Cell-ID™	<i>KRAS</i> Exon 2 (c.35G>A, p.Gly12Asp) <i>CTNNB1</i> Exon 3 (c.101G>A; p.G34E) <i>CDH1</i> Exon 12(c.1733_1734insC; p.G579fs*9) <sup>(145)</sup> Positiv
SNU5	Herkunft		ATCC
	Bestellnummer		CRL-5973
	Ursprung	Patient Gewebe	33 jährige, weibliche Asiatin Metastase eines chemotherapierten Magenkarzinoms (Aszitesflüssigkeit)
	Histologie des Primärtumors		Schlecht differenziertes Adenokarzinom des Magens
	Morphologie der Zellkultur		Kugelige Zellen, ca. 40 % adhärent, bildet sehr lockere Zellverbände
	Identitätsprüfung	Bestätigte Mutationen Cell-ID™	<i>TP53</i> Intron 3 (c.783-2A>C) <sup>(145)</sup> Positiv
HS746T	Herkunft		ATCC
	Bestellnummer		HTB-135
	Ursprung	Patient Gewebe	74 jähriger, männlicher Kaukasier Muskel-Metastase eines Magenkarzinoms
	Histologie des Primärtumors		Unbekannt
	Morphologie der Zellkultur		Adhärent, mehrzipflige spindelförmige und unregelmäßige Zellformen, hauptsächlich individuelle Zellen, kaum Koloniebildung
	Identitätsprüfung	Bestätigte Mutationen Cell-ID™	Nicht untersucht Positiv

<b>Zelllinie</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Unter- kategorie</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>MKN45</b>	<b>Herkunft</b>		Prof. Ebert, II. Medizinische Abteilung, (Klinikum rechts der Isar, München)
	<b>Bestellnummer</b>		-
	<b>Ursprung</b>	<b>Patient Gewebe</b>	62 jährige, weibliche Asiatin Lebermetastase eines Magenkarzinoms
	<b>Histologie des Primärtumors</b>		Schlecht differenziertes, diffuses Adenokarzinom des Magens
	<b>Morphologie der Zellkultur</b>		Epithelial, adhärent aber leicht ablösbar, kugelig bis spindelförmige Zellen bilden lockere, traubenartige Kolonien
	<b>Identitätsprüfung</b>	<b>Bestätigte Mutationen</b>	<i>CDH1</i> Exon 6 (c.821_832del12; p.G273_P276del) <sup>(143,144)</sup>
		<b>Cell-ID™</b>	Positiv
<b>HEK293T</b>	<b>Herkunft</b>		Natalia Pellegata, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg
	<b>Bestellnummer</b>		12022001 (ECACC)
	<b>Ursprung</b>	<b>Patient Gewebe</b>	Gesunder humaner Fötus Nierengewebe
	<b>Molekular- biologische Veränderungen</b>		Transformiert mit SV40 großes T-Antigen-Expressionsvektor <sup>(146)</sup> und DNA-Bruchstücken von Adenovirus 5 <sup>(147)</sup>
	<b>Morphologie der Zellkultur</b>		Adhärent, netzartig verzweigtes Wachstum
	<b>Identitätsprüfung</b>	<b>Bestätigte Mutationen</b>	Nicht untersucht
		<b>Cell-ID™</b>	Nicht durchgeführt

<sup>1</sup> System zur Authentisierung humaner Zelllinien von Promega (Mannheim)

## 2.3 Materialien

### 2.3.1 *TaqMan*<sup>®</sup> *Low Density Arrays*

*TaqMan*<sup>®</sup>-basierte PCR-Systeme sind eine Variante der quantitativen *real-time*-PCR (qRT-PCR), bei der zwischen den sequenzspezifischen Primern noch eine fluoreszenzmarkierte Sonde an die Matrize bindet. Durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen den Fluorophoren (*Reporter* und *Quencher*) an der intakten Sonde wird die Fluoreszenz unterdrückt. Während der PCR-Reaktion wird die gebundene Sonde durch die Taq-Polymerase degradiert, wodurch die FRET-Wirkung aufgehoben wird. Die Emission der freien *Reporter* kann nach jedem Zyklus gemessen werden und hängt unterhalb eines Sättigungsbereichs proportional von der Menge amplifizierter DNA ab.

*TaqMan*<sup>®</sup> *Low Density Arrays* (TLDA) sind spezielle Reaktionskarten (*Arrays*) für die Durchführung einer großen Anzahl paralleler qRT-PCRs. Jede Karte hat 384 Reaktionskammern von jeweils 1 µl Volumen. Jeweils 48 Reaktionskammern stehen mit einem Füllkanal in Verbindung, der in einer der acht Ladekammern endet. In den Reaktionskammern sind Primer und Sonden für die spezifische Amplifikation und Detektion der cDNAs aufgedampft (*Assays*) und werden gelöst, wenn die mit dem Master-Mix versetzten Proben aus den Ladekammern durch die Kanäle in die Kammern zentrifugiert werden. Durch die variable Zusammenstellung der *Assays* können von 12 verschiedenen *Assays* in Vierfachbestimmung für acht Proben bis zu 384 *Assays* in Einzelbestimmung für eine Probe auf jeder Karte gemessen werden.

#### 2.3.1.1 Kriterien für die Auswahl von *Assays* für TLDA-basierte Genexpressionsanalysen

Alle *Assays* für die Genexpressionsanalysen wurden aus den vorkonzipierten Testsystemen von Applied Biosystems (Darmstadt) zusammengestellt. Standen mehrere Testsysteme für ein Gen zur Verfügung wurden *Assays* ausgewählt, welche die Konsensussequenz des jeweiligen Transkripts und möglichst viele Spleißvarianten der mRNA erfassten. Dabei wurden bevorzugt *Assays* ausgewählt, deren Sonde über eine Exongrenze hinweg bindet (*Assay ID* endet auf „\_m1“). Dadurch wird verhindert, dass Verunreinigungen mit genomischer DNA (gDNA) zu Signalen in der PCR führen. Zweite Wahl waren „\_g1“-*Assays*, welche unter Umständen auch gDNA amplifizieren können, da sie sehr kurze Intronsequenzen überspannen oder ein Primer und die Sonde im gleichen Exon liegen (*NANOG*, *HDAC1*, *POU5F1*). Für einige Gene standen nur „\_s1“-*Assays* zur Verfügung, bei denen beide Primer und die Sonde in dem gleichen Exon liegen und somit keine Diskriminierung zwischen cDNA und gDNA

erfolgt. Dies war der Fall bei den *Assays* für *ASCL2*, *CD24*, *FOXD3*, *FZD1*, *LIN28* und *SOX2*<sup>(148)</sup>.

Für die PCR-basierte Quantifikation von RNA, welche aus formalinfixiertem, paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe extrahiert wurde, liegt die ideale Amplikonlänge aufgrund der zu erwartenden Fragmentierung der RNA bei unter 100 bp. Die Amplifikation von Amplikons bis ca. 180 bp ist jedoch mit geringen Einbußen in der Effizienz auch möglich<sup>(149)</sup>. Daher wurden für alle Gene *Assays* mit möglichst kurzer Amplikonlänge ausgewählt.

### 2.3.1.2 Genexpressionsassays für die Auswahl von Referenzgenen

Für die Auswahl von Referenzgenen für die Normalisierung der TLDA-basierten Genexpressionsanalysen an Tumorproben wurde der *Human Endogenous Control Panel* (HECP)-TLDA von Applied Biosystems (Darmstadt) verwendet. Dieser enthält 16 *Assays* für die Quantifizierung potentieller Referenzgene in Dreifachbestimmung für acht Proben (Tab. 6).

**Tab. 6:** Liste der *Assays* auf dem *Human Endogenous Control Panel-Array*

Gen	Gen-ID <sup>1</sup>	Assay-ID <sup>2</sup>	Amplikonlänge [bp]
<i>GAPDH</i>	2597	Hs99999905_m1	122
<i>18S</i>	HSRRN18S	Hs99999901_s1	187
<i>ACTB</i>	60	Hs99999903_m1	171
<i>B2M</i>	567	Hs99999907_m1	75
<i>GUSB</i>	2990	Hs99999908_m1	81
<i>HMBS</i>	3145	Hs00609297_m1	64
<i>HPRT1</i>	3251	Hs99999909_m1	100
<i>IPO8</i>	10526	Hs00183533_m1	71
<i>PGK1</i>	5230	Hs99999906_m1	75
<i>POLR2A</i>	5430	Hs00172187_m1	61
<i>PPIA</i>	5478	Hs99999904_m1	98
<i>RPLP0</i>	6175	Hs99999902_m1	105
<i>TBP</i>	6908	Hs99999910_m1	127
<i>TFRC</i>	7037	Hs99999911_m1	105
<i>UBC</i>	7316	Hs00824723_m1	71
<i>YWAHZ</i>	7534	Hs00237047_m1	70

<sup>1</sup> www.ncbi.nlm.nih.gov/gene, <sup>2</sup> Applied Biosystems, *ID*: Identifikationsnummer

### 2.3.1.3 Genexpressionsassays für TLDA-basierte Analysen

Für die initiale *Screening*-Analyse wurde ein TLDA mit 48 *Assays* in Einzelbestimmung je Füllkanal zusammengestellt. Dieser umfasste *Assays* für 44 Zielgene sowie drei Referenzgene und eine Produktionskontrolle (*GAPDH*). Die Zusammenstellung der *Assays* beruhte zum einen auf den „Stammzell“-*Arrays* verschiedener Hersteller <sup>(150,151)</sup>, zum anderen auf publizierten Genen, welche mit potentiellen Stammzellen in gastrointestinalen, hämatopoetischen und anderen Geweben und Tumoren assoziiert werden (Tab. 7). Hierzu zählen auch die Wnt-, Notch- und Hedgehog-Signalwege als wichtige Regulatoren von Wachstum und Differenzierung. Eine Liste mit einer kurzer Beschreibung der Gene und den entsprechenden Literaturverweisen befindet sich in Tab. A1 (Anhang). Die *Assays* wurden von Applied Biosystems (Darmstadt) hergestellt.

Für die vergleichenden Analysen zwischen prä- und posttherapeutischen Tumorproben mit TRG2 und TRG3 wurde ein TLDA mit 16 *Assays* in Dreifachbestimmung je Füllkanal zusammengestellt. Hierzu wurden die drei Referenzgene, die Produktionskontrolle sowie neun Zielgene aus den vorangegangenen *Screening*-Analysen ausgewählt (Tab. 7). Zusätzlich wurden *Assays* für den Notch-Liganden *JAG1* (Gen-ID: 182, *Assay*-ID: Hs01070032\_m1, Amplikonlänge: 72 bp) sowie das Notch-Zielgen *HES1* (Gen-ID: 3280, *Assay*-ID: Hs00172878\_m1, Amplikonlänge: 78 bp) ausgewählt.

**Tab. 7: Liste der *Assays* für das Genexpressionscreening an Resektaten von Tumoren mit TRG2**

Gen	Gen-ID <sup>1</sup>	<i>Assay</i> -ID <sup>2</sup>	Amplikonlänge [bp]
<i>ABCB1</i>	5243	Hs00184500_m1	67
<i>ABCG2</i> <sup>5</sup>	9429	Hs01053790_m1	83
<i>ALDH1A1</i>	216	Hs00946916_m1	61
<i>ASCL2</i>	430	Hs00270888_s1	101
<i>ATXN1</i>	6310	Hs00165656_m1	97
<i>AXIN1</i>	8312	Hs00394718_m1	81
<i>BMI1</i>	648	Hs00180411_m1	105
<i>CCND1</i> <sup>5</sup>	595	Hs00765553_m1	57
<i>CD133</i>	8842	Hs01009257_m1	80
<i>CD24</i>	100133941	Hs02379687_s1	140
<i>CD34</i>	947	Hs02576480_m1	63
<i>CD44</i>	960	Hs01075861_m1	70
<i>CDH1</i>	999	Hs01013953_m1	65
<i>CDX2</i>	1045	Hs01078080_m1	81
<i>CHD1</i>	1105	Hs00154405_m1	84
<i>CTNNB1</i> <sup>5</sup>	1499	Hs00355045_m1	86
<i>DKK3</i>	27122	Hs00247426_m1	83
<i>DNMT1</i> <sup>5</sup>	1786	Hs00154749_m1	77

Gen	Gen-ID <sup>1</sup>	Assay-ID <sup>2</sup>	Amplikonlänge [bp]
<i>DNMT3A</i>	1788	Hs01027166_m1	79
<i>DNMT3B</i>	1789	Hs00171876_m1	55
<i>FOXD3</i>	27022	Hs00255287_s1	73
<i>FZD1</i>	8321	Hs00268943_s1	83
<i>GADD45A</i>	1647	Hs00169255_m1	123
<i>GAPDH</i> <sup>3,5</sup>	2597	Hs99999905_m1	122
<i>GLII</i>	2735	Hs00171790_m1	80
<i>GSK3B</i> <sup>5</sup>	2932	Hs00275656_m1	73
<i>HDAC1</i>	3065	Hs00606262_g1	149
<i>HDAC2</i>	3066	Hs00231032_m1	106
<i>IHH</i>	3549	Hs01081801_m1	103
<i>KLF4</i>	9314	Hs00358836_m1	110
<i>LGR4</i>	55366	Hs00173908_m1	68
<i>LGR5</i> <sup>5</sup>	8549	Hs00173664_m1	112
<i>LIN28</i>	79727	Hs00702808_s1	143
<i>MKI67</i>	4288	Hs01032443_m1	66
<i>MYC</i>	4609	Hs00905030_m1	87
<i>NANOG</i>	79923	Hs02387400_g1	109
<i>NOTCH1</i> <sup>5</sup>	4851	Hs01062014_m1	80
<i>NOTCH2</i> <sup>5</sup>	4853	Hs01050719_m1	60
<i>OLFM4</i> <sup>5</sup>	10562	Hs00197437_m1	85
<i>POU5F1</i> <sup>5</sup>	5460	Hs00999632_g1	77
<i>PTCH1</i>	5727	Hs00970979_m1	63
<i>SFRP1</i>	6422	Hs00610060_m1	130
<i>SHH</i>	6469	Hs00179843_m1	70
<i>SMO</i>	6608	Hs01090242_m1	54
<i>SOX2</i>	6657	Hs01053049_s1	91
<i>IPO8</i> <sup>4,5</sup>	10526	Hs00183533_m1	71
<i>POLR2A</i> <sup>4,5</sup>	5430	Hs00172187_m1	61
<i>UBC</i> <sup>4,5</sup>	7316	Hs00824723_m1	71

<sup>1</sup> www.ncbi.nlm.nih.gov/gene; <sup>2</sup> Applied Biosystems; <sup>3</sup> Produktionskontrolle des Herstellers; <sup>4</sup> Referenzgene; <sup>5</sup> Assays, die auch für die vergleichenden Genexpressionsanalysen zwischen prä- und posttherapeutischen Tumorproben eingesetzt wurden.

### 2.3.2 Primersysteme

Alle Primersysteme wurden anhand der Referenzsequenzen der zu analysierenden Gene oder anhand der genannten Literaturquellen entworfen und von Sigma-Aldrich (Hamburg) hergestellt. Die selbst entworfenen Primerpaare (Tab. 8) liegen jeweils auf benachbarten Exons und überspannen die gleiche Exongrenze wie die korrespondierenden *TaqMan*<sup>®</sup>-Assays in Tab. 7. Die lyophilisierten Primer wurden in Reinstwasser (H<sub>2</sub>O p. a.) gelöst und wie angegeben verdünnt.



### 2.3.2.1 Primer für die qRT-PCR basierte Quantifizierung der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression

**Tab. 8:** Primer für die SYBR Green-basierte qRT-PCR <sup>1</sup>

Gen	Orientierung	Sequenz	Primerlänge [bp]	Amplikonlänge [bp]
<i>NOTCH1</i>	Vorwärts	5'-CTGAAGAACGGGGCTAACAA-3'	20	62
	Rückwärts	5'-GCCAGAAACAGGGGTGTC-3'	18	
<i>NOTCH2</i>	Vorwärts	5'-CAAGCGGATGTGAATGCAG-3'	19	77
	Rückwärts	5'-GCCTCCACATTATTGACAGCA-3'	21	
<i>IPO8</i>	Vorwärts	5'-GGGGTTCAGTACTCCACTTGA-3'	21	100
	Rückwärts	5'-GTACCAGGCTGCATCTCGAC-3'	20	
<i>POLR2A</i>	Vorwärts	5'-GAGTCCAGTTCGGAGTCCTG-3'	20	59
	Rückwärts	5'-ACCCTCCGTCACAGACATTC-3'	20	

<sup>1</sup> Konzentration der Gebrauchslösung: 10 µM

### 2.3.2.2 Primer für die Detektion von Mykoplasmenkontaminationen in der Zellkultur

**Tab. 9:** Primer für die PCR zur Detektion von Mykoplasmenkontaminationen <sup>(152)</sup>

	Primer	Sequenz	Konzentration <sup>1</sup> [µM]
<b>Mixtur 1</b>	<b>Myco-F1</b>	5'-ACACCATGGGAGCTGGTAAT-3'	5
	<b>Myco-F1t</b>	5'-ACACCATGGGAGTTGGTAAT-3'	5
	<b>Myco-R1</b>	5'-CTTCATCGACTTTCAGACCCAAGGCAT-3'	2,5
	<b>Myco-R1tt</b>	5'-CTTCTTCGACTTTCAGACCCAAGGCAT-3'	2,5
	<b>Myco-R1cat</b>	5'-CCTCATCGACTTTCAGACCCAAGGCAT-3'	2,5
	<b>Myco-R1ac</b>	5'-CTTCATCGACTTCCAGACCCAAGGCAT-3'	2,5
<b>Mixtur 2</b>	<b>Myco-F2</b>	5'-GTTCTTTGAAAACACTGAAT-3'	2,5
	<b>Myco-F2a</b>	5'-ATTCTTTGAAAACACTGAAT-3'	2,5
	<b>Myco-F2cc</b>	5'-GCTCTTTCAAAAACACTGAAT-3'	2,5
	<b>Myco-R2</b>	5'-GCATCCACCAAAAACACTCT-3'	2,5
	<b>Myco-R2ca</b>	5'-GCATCCACCACAAAACACTCT-3'	2,5
	<b>Myco-R2at</b>	5'-GCATCCACCAATAACTCT-3'	2,5

<sup>1</sup> Konzentration in der Gebrauchslösung (Mixtur)

### 2.3.2.3 Primer für die cDNA-Synthese

Random Primers 200 ng/μl

Invitrogen (Darmstadt)

### 2.3.2.4 Primer für die Überprüfung der cDNA-Reinheit

**Tab. 10:** Primer für die PCR zur Überprüfung der cDNA-Reinheit <sup>1</sup>

Gen	Orientierung	Sequenz	Primerlänge [bp]	Amplikonlänge [bp]
<i>PDHB</i>	Vorwärts	5'-CTTCCACAGCCCTCGACTAA-3'	20	cDNA: 103
	Rückwärts	5'-GGTATGGATGAGGACCTGGA-3'	20	gDNA: 185

<sup>1</sup>Konzentration der Gebrauchslösung: 20 μM

### 2.3.3 DNA-Konstrukte für den *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Knockdown

**Tab. 11:** shRNA-Konstrukte <sup>1</sup> für die RNAi-vermittelte Herunterregulation der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression (*Knockdown*)

Name	Zielgen (Region)	TRC Nummer	Sequenz der shRNA
<b>SH59</b>	<i>NOTCH1</i> (3'UTR)	TRCN0000003359	5'-CCGGCTTTGTTTCAGGTTTCAGTATTCTCGA GAATACTGAACCTGAAACAAAGTTTTT-3'
<b>SH62</b>	<i>NOTCH1</i> (CDS)	TRCN0000003362	5'-CCGGCAAAGACATGACCAGTGGCTACTCG AGTAGCCACTGGTCATGTCTTTGTTTTT-3'
<b>SH94</b>	<i>NOTCH2</i> (3'UTR)	TRCN0000004894	5'-CCGGCCCACTAATAAGTGGTACTATCTCG AGATAGTACCACTTATTAGTGGGTTTTT-3'
<b>SH95</b>	<i>NOTCH2</i> (CDS)	TRCN0000004895	5'-CCGGGCAAGAATTGTCAGACAGTATCTCG AGATACTGTCTGACAATTCTTGCTTTTT-3'
<b>SHC002</b>	-/- (Kontrolle)		5'-CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCG AGTTGGTGCTCTTCATCTTGTGTTTTT-3'

<sup>1</sup>Alle shRNA-Konstrukte lagen inseriert in pLKO.1puro Vektoren (Plasmid) vor und stammten von Sigma-Aldrich (Hamburg). Die verwendeten Verpackungsplasmide pMD2.G und psPAX2 stammten von Addgene (Cambridge, USA) **TRC:** *The RNAi Consortium* (<http://www.broadinstitute.org/rnai/public>) **CDS:** *coding DNA sequence*, **3'UTR:** *3' untranslated region*

## 2.3.4 Antikörper

**Tab. 12: Primärantikörper**

Name	Wirt	Ziel (Spezies)	Anwendung (Verdünnung)	Klonalität	Klon	Lieferant Katalog-No.
<b>anti-Notch1 (DSHB)</b>	Ratte	Notch1-NICD (Mensch)	IHC (1:5) WB (1:100)	mono	bTAN20	DSHB (Iowa City, USA)
<b>anti-Notch1 (SC)</b>	Maus	Notch1-NICD (Maus, Mensch)	WB (1:1000)	mono	mN1A	Santa Cruz (Santa Cruz, USA) sc-32745
<b>anti-Notch2</b>	Ratte	Notch2-NICD (Mensch)	IHC (1:30) WB (1:250)	mono	C651.6DbHN	DSHB (Iowa City, USA)
<b>anti-<math>\beta</math>-Actin</b>	Maus	$\beta$ -Aktin (Mensch)	WB (1:5000)	poly	AC-15	Sigma Aldrich (Hamburg) A5441

*NICD*: intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors; *IHC*: Immunhistochemie; *WB*: Western Blot; *DSHB*: Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa

**Tab. 13: Sekundärantikörper**

Name	Wirt	Ziel (Spezies)	Anwendung (Verdünnung)	Klonalität	Kopplung	Lieferant Katalog-No.
<b>biotinyliert anti-Ratte</b>	Kaninchen	IgG (Ratte)	IHC (1:100)	poly	Biotin	DAKO (Hamburg) (E0468)
<b>HRP anti-Ratte (GE)<sup>1</sup></b>	Ziege	IgG (Ratte)	WB (1:5000)	poly	HRP	GE Healthcare (Freiburg) NA9350
<b>HRP anti-Ratte (CS)<sup>1</sup></b>	Ziege	IgG (Ratte)	WB (1:5000)	poly	HRP	Cell Signaling (Davers, USA) 7077
<b>HRP anti-Maus</b>	Schaf	IgG (Maus)	WB (1:10000)	poly	HRP	GE Healthcare (Freiburg) NA931

<sup>1</sup> Der zur Etablierung der Western-Blots mit anti-Notch1 (DSHB) und anti-Notch2 verwendete Antikörper HRP anti-Ratte (GE) war zwischenzeitlich nicht lieferbar und wurde daher durch HRP anti-Ratte (CS) gleichwertig ersetzt. *IHC*: Immunhistochemie; *WB*: Western Blot; *HRP*: horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)

### 2.3.5 Chemikalien

Acrylamid/Bis Lösung, 40 % (37,5:1)	Bio-Rad (München)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Cisplatin	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Citronensäuremonohydrat	Roth (Karlsruhe)
Dako REAL Antibody Diluent	Dako (Hamburg)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva (Heidelberg)
Epidermal Growth Factor, Recombinant Human (EGF)	Invitrogen (Darmstadt)
Ethanol (70 %, 96 %, absolut)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Eurobio (Les Ulis, Frankreich)
Fibroblast Growth Factor-Basic human (bFGF)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Fötale Kälberserum (FKS), Sera Plus	PAN (Aidenbach)
Formamid	Merck (Darmstadt)
Fumitremorgin C	Alexis Biochemicals (Lörrach)
Gelatine	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Glyzerin	Merck (Darmstadt)
Hoechst33342	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Mayer's Hämalun	Applichem (Darmstadt)
Holzleim Ponal	Henkel (Düsseldorf)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Magermilchpulver	Bio-Rad (München)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Natronlauge (2N)	Roth (Karlsruhe)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Nonidet P40	Roche Diagnostics (Mannheim)
Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 1:1:1:1), je 1,25 mM	Applied Biosystems (Darmstadt)
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween-20)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Puromycin	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Random Primers	Invitrogen (Darmstadt)
Reinstwasser (H <sub>2</sub> O p. a.)	Merck (Darmstadt)
RNase/DNase freies H <sub>2</sub> O	Qiagen (Hilden)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Salzsäure (25 %, 37 %)	Roth (Karlsruhe)
SeaKem LE Agarose	Lonza (Köln)

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris Base)	Merck (Darmstadt)
Trishydroxymethylaminomethan -Hydrochlorid (Tris-HCl)	Merck (Darmstadt)
Verapamil-Hydrochlorid	Alexis Biochemicals(Lörrach)
Wasserstoffperoxid 30%	Roth (Karlsruhe)
Xylol	Merck (Darmstadt)
Ziegenserum, normal	Dako (Hamburg)

### 2.3.6 Zellkulturmedien

RPMI 1640	Gibco/Invitrogen (Darmstadt)
IMDM	Gibco/Invitrogen (Darmstadt)
DMEM	Gibco/Invitrogen (Darmstadt)
Opti-MEM®	Gibco/Invitrogen (Darmstadt)

#### Färbemedium

FKS Sera Plus	2 % (v/v)
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	1 mg/ml
Glutamin	2 mM
HEPES	10 mM
in RPMI 1640	

#### Stammzellmedium

N2 Supplement	1 % (v/v)
B27 Supplement	2 % (v/v)
bFGF	10 ng/ml
EGF	20 ng/ml
Antibiotikum/Antimykotikum in DMEM	1 % (v/v)

### 2.3.7 Enzyme und Inhibitoren

AmpliTaq Gold®	AppliedBiosystems (Darmstadt)
Proteinase K	Roche Diagnostics (Mannheim)
Ribonuklease A	Sigma Aldrich (Hamburg)
RNase Inhibitor RNaseOUT™	Invitrogen (Darmstadt)
Reverse Transkriptase Superscript II™	Invitrogen (Darmstadt)

### 2.3.8 Puffer und Lösungen

#### APS (10 %)

Ammoniumperoxodisulfat in H <sub>2</sub> O	10 % (w/v)
Lagerung bei -20 °C	

**Blockierlösung für Immunhistochemie**

Normales Ziegen Serum in TBS	5 %
------------------------------	-----

**Blockierlösung für Western Blot**

Magermilchpulver in TBST	5 % (w/v)
--------------------------	-----------

**DNA-Ladepuffer (10x) für Agarose-Gelelektrophorese**

Formamid	80 % (v/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
Xylencyanol	0,5 % (v/v)

**DEPC-H<sub>2</sub>O**

Diethylpyrocarbonat	0,1 % (v/v)
---------------------	-------------

12 h Inkubation bei RT, danach autoklavieren

**Laufpuffer für SDS-PAGE**

Tris Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

**Laemmli-Puffer (5x)**

Tris-HCl, pH 6,8	312,5 mM
Glycerin	50 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	25 % (v/v)
SDS	10 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

Lagerung bei -20 °C

**Lysispuffer für Proteinlysate**

T-Per-Puffer	10 ml
Complete Mini Proteaseinhibitor	1 Tablette

Lagerung bei -20 °C

**PCR-Puffer (10x)**

Tris-HCl	100 mM
KCl	500 mM
Gelatine	0,1 % (w/v)
MgCl <sub>2</sub>	20 mM

pH 8,3  
Lagerung bei -20 °C

**Peroxidaseblockierlösung für Immunhistochemie**

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in TBS	3 % (v/v)
--------------------------------------	-----------

**PK-Puffer**

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	0,1 mM
SDS pH 7,3	2 %

**Polylysin-Leim**

Poly-L-Lysin	50 % (v/v)
Holzleim	50 % (v/v)

**Ponceau S-Lösung**

Ponceau-S	0,5 % (w/v)
Essigsäure	1 % (v/v)

**RLN-Puffer**

Tris-HCl, pH 8,0	50 mM
NaCl	140 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Nonidet P-40	0,5 % (v/v)
Lagerung bei 4 °C	

**TBST (Waschpuffer für Western Blot)**

Tris-HCl	20 mM
NaCl	137 mM
Tween-20	0,1 % (v/v)
pH 7,4	

**TBS (Waschpuffer für Immunhistochemie)**

Tris Base	50 mM
NaCl	150 mM
pH 7,6	

**TE-Puffer**

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0 in DEPC-H <sub>2</sub> O	1 mM

**Transferpuffer für Western Blot**

Tris Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)
Lagerung bei 4 °C	

**Zitratpuffer für Immunhistochemie**

Zitronensäuremonohydrat	10 mM
pH 6,0	

## 2.3.9 Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen

Antibiotic-Antimycotic (100X)	Invitrogen (Darmstadt)
B 27 Supplement (50X)	Invitrogen (Darmstadt)
CASYton®	Innovatis (Reutlingen)
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Chemilumineszenzsubstrat ChemiGlow West	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Dako REAL™ Detection System Peroxidase/ DAB+	Dako (Hamburg)
Diff-Quik Färbeset	Medical Solution (Hünenberg, Schweiz)
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 1 M, pH 8,0	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Dithiothreitol (DTT) 0,1 M	Invitrogen (Darmstadt)

Dulbecco's PBS mit Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup>	PAA (Pasching, Österreich)
Dulbecco's PBS ohne Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup>	PAA (Pasching, Österreich)
Human Endogenous Control Panel TLDA	Applied Biosystems (Darmstadt)
Glykogen 20 mg/ml	Roche Diagnostics (Mannheim)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES) 1 M	Gibco/Invitrogen (Darmstadt)
L-Glutamin 200 mM	Gibco/Invitrogen (Darmstadt)
LightCycler <sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master-Mix (2x)	Roche Diagnostics (Mannheim)
LightCycler <sup>®</sup> 480 H <sub>2</sub> O PCR-grade	Roche Diagnostics (Mannheim)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml/ 100 mg/ml)	PAA (Pasching, Österreich)
N2 Supplement (100X)	Invitrogen (Darmstadt)
Natriumlaurylsulfat (SDS) 10 % (w/v), pH 7,3	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad (München)
Protein-Standard II (1,48 mg BSA/ml)	Bio-Rad (München)
QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Reverse Transkriptase-Puffer	Invitrogen (Darmstadt)
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen (Hilden)
T-Per <sup>®</sup> Proteinextraktionspuffer	Fisher Scientific (Schwerte)
TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)
Trishydroxymethylaminomethan- Hydrochlorid (Tris-HCl) 1 M, pH 6,8	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Trishydroxymethylaminomethan- Hydrochlorid (Tris-HCl) 1 M, pH 8,0	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Trypsin/EDTA	PAA (Pasching, Österreich)
Turbofect <sup>™</sup> Transfektionsreagenz	Fermentas (St. Leon-Roth)
UltraPure <sup>™</sup> Phenol:Water (3.75:1, v/v), pH 4,0	Invitrogen (Darmstadt)
UltraPure <sup>™</sup> TBE-Puffer (10x)	Invitrogen (Darmstadt)

### 2.3.10 Verbrauchsmaterialien

96-Well Platten, 6-Well Platten für Zellkultur	Biochrom (Berlin)
24-Well Corning <sup>®</sup> Costar <sup>®</sup> Ultra-Low attachment multiwell plates	Sigma (Deisenhofen)
96-Well PCR White Plates	4titude (Berlin)
Kryoröhrchen	Hartenstein (Würzburg)
Zellsiebe Cell Strainer, 35 µm	BD (Heidelberg)
Deckgläser	Thermo Scientific (Braunschweig)
Discadit II 20 ml Plastikspritze	BD (Heidelberg)
Einmal-Filterhalter Minisart 0,2 µm und 0,45 µm	Hartenstein (Würzburg)
Küvetten	Hartenstein (Würzburg)
Nitrozellulosemembran BA85	Schleicher & Schuell (Dassel)
Objektträger	Thermo Scientific (Braunschweig)
Objektträger Superfrost	Thermo Scientific (Braunschweig)
Parafilm	Brand (Wertheim))
Pasteurpipetten	Hartenstein (Würzburg)
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 0,2 ml)	Biozym (Oldendorf)



Pipettenspitzen	Fisher Scientific (Schwerte)
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym (Oldendorf)
Reaktionsgefäße (1,5, 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	BD (Heidelberg)
Skalpellklingen Nr. 11	Hartenstein (Würzburg)
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturflaschen (25, 75 cm <sup>2</sup> )	Biochrom (Berlin)
Zellkulturschalen (35, 60, 100 mm Ø)	Biochrom (Berlin)
Zellschaber	Biochrom (Berlin)
Zentrifugenröhrchen 50 ml	BD (Heidelberg)
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Neolab (Heidelberg)

### 2.3.11 Geräte

CanoScan 8800F	Canon (Krefeld)
Eismaschine	Scotsman Ice (Vernon Hills, USA)
Expert Plus Photometer	Asys (Eugendorf, Österreich)
Flourchem SP Digital Imaging System	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Gelelektrophoresekammer WVV	
Mini Sub Cell	Bio-Rad (München)
Kippschüttler 3D Rocking Plattform	Stuart Scientific (Oregon, USA)
Kühltruhe Ultra Low Freezer	Sanyo (München)
Kühlzentrifuge 4K15	Sigma-Aldrich (Hamburg)
Laborwaage	Sartorius (Göttingen)
Lichtmakroskop M410	Wild (Heerbrugg, Schweiz)
Lichtmikroskop Axio Vert.A1	Carl Zeiss AG (Jena)
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz (Wetzlar)
Lightcycler <sup>®</sup> 480	Roche Diagnostics (Mannheim)
Mini PROTEAN <sup>®</sup> 3 Cell System	Bio-Rad (München)
Mini Trans-Blot Cell System	Bio-Rad (München)
FACS-System BD FACSCalibur <sup>™</sup>	BD (Heidelberg)
FACS-System MoFlo Cell Sorter	BeckmanCoulter (Krefeld)
MS1 Minishaker	IKA Works (Willmington, USA)
PCR-Gerät 2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems (Darmstadt)
PCR-Gerät Primus 96Plus	MWG-Biotech (Ebersberg)
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss AG (Jena)
pH-Meter (pH 211)	HANNA Instruments Inc. (Woonsocket, USA)
Pipetten Eppendorf Research (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 ml, 200-1000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipette Pipetman (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 ml, 200-1000 µl)	Gilson (Middleton, USA)
Pipetus-akku Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Schnellkochtopf	WMF (Geislingen)
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad (München)
Spektralphotometer Nano Drop 2000c	Peqlab (Erlangen)
Sterilwerkbank Hera Safe Zellkulturhaube	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)

TaqMan® PCR-Gerät ABI Prism 7900 HT  
 Sequence Detector mit 7900HT TaqMan®  
 Low Density Array Hardware Upgrade Kit  
 Thermomixer compact  
 UV-Spektrometer Ultrospec 2000  
 Trockenschrank  
 Wasserbad  
 Zellinkubator Heracell 240i  
 Zellzählgerät Casy1 TT  
 Zentrifuge 5415D  
 Zentrifuge 5417R  
 Zentrifuge Heraeus Multifuge 3R  
 Zählkammer Neubauer Improved

Applied Biosystems (Darmstadt)  
 Eppendorf (Hamburg)  
 Amersham (Braunschweig)  
 Memmert (Schwabach)  
 GFL (Burgwedel)  
 Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)  
 Schärfe Systems (Reutlingen)  
 Eppendorf (Hamburg)  
 Eppendorf (Hamburg)  
 Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)  
 Marienfeld (Lauda-Königshofen)

### 2.3.12 Software

Adobe Photoshop CS3  
 Adobe Illustrator CS3  
 ImageJ v1.42q  
 Microsoft Office 2003  
 SPSS Statistics v18.0-20.0  
 Prism v5  
 R v2.14.1  
  
 Sequence Detections Systems  
 (SDS) v2.3  
 RQ Manager (RQM) v1.2  
 DataAssist (DA) v2.0  
 Cluster v3.0  
  
 Java TreeView v1.1.5r2  
 BRB ArrayTools v4.2.0  
  
 GeNorm v3.5  
 FlowJo v7.6.4  
 Win MDI v2.9  
 Lightcycler 480 SW v1.5.0.39

Adobe Systems (San Jose, USA)  
 Adobe Systems (San Jose, USA)  
 National Institutes of Health (Bethesda)  
 Microsoft (Redmond, USA)  
 SPSS (Chicago, USA)  
 GraphPad Software (La Jolla, USA)  
 R Foundation for Statistical Computing  
 (Wien, Österreich)  
  
 Applied Biosystems (Darmstadt)  
 Applied Biosystems (Darmstadt)  
 Applied Biosystems (Darmstadt)  
[http://bonsai.hgc.jp/  
 ~mdehoon/software/cluster/software.htm](http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm)  
<http://jtreeview.sourceforge.net/>  
[http://linus.nci.nih.gov/  
 BRB-ArrayTools.html](http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html)  
<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>  
 Tree Star (Ashland, USA)  
<http://facs.scripps.edu/software.html>  
 Roche Diagnostics (Mannheim)

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.4.1.1 RNA-Extraktion

##### 2.4.1.1.1 RNA-Extraktion aus Zelllinien

Für die Extraktion von RNA aus Zelllinien wurde das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Maximal  $1 \times 10^6$  Zellen wurden geerntet und mehrmals in eiskalter PBS gewaschen. Nach Sedimentation ( $17900 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) wurden die Zellen zur Lyse in  $175 \mu\text{l}$  kaltem Puffer RLN (nicht im Kit enthalten) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Sedimentation wurde der Überstand mit  $600 \mu\text{l}$  Puffer RLT ohne Mercaptoethanol gemischt und  $430 \mu\text{l}$  96 %iger Ethanol zugegeben. Die weitere Aufbereitung der Proben erfolgte nach dem Herstellerprotokoll unter Berücksichtigung der eingesetzten Volumina. Die RNA wurde in  $50 \mu\text{l}$  RNase/DNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration durch Extinktionsmessung bei  $260 \text{ nm}$  am NanoDrop™ 2000c-Fotometer bestimmt. Alle RNA-Proben wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert und bei Bedarf auf Eis aufgetaut.

##### 2.4.1.1.2 RNA-Extraktion aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe

Für die Genexpressionsanalysen an Tumorproben wurde RNA aus Gewebedünnschnitten von FFPE-Gewebe nach manueller Mikrodisektion extrahiert. Um einen Tumoranteil im extrahierten Gewebe von mindestens 50 % zu erreichen, wurden die zu extrahierenden Tumorareale auf geeigneten HE-gefärbten Gewebedünnschnitten gekennzeichnet und von einem Pathologen (OA Dr. Rupert Langer) überprüft.

Die Extraktion der RNA erfolgte mit einer Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode. Je nach Größe des Tumorareals wurden zwischen drei und 20 Gewebedünnschnitte mit  $8 \mu\text{m}$  Stärke hergestellt. Nach der Trocknung und Anheftung auf den Objektträger bei  $60^\circ\text{C}$  ÜN wurden die Gewebedünnschnitte in Xylol (dreimal 10 min) entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe (Isopropanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol, DEPC- $\text{dH}_2\text{O}$ , je zweimal 5 min) rehydratisiert. Anschließend wurden die Schnitte 30 s mit Hämalaun eingefärbt und nach 2 min „Bläuen“ in Leitungswasser in TE-Puffer überführt.

Mit einem Skalpell wurden die eingezeichneten Tumorareale unter mikroskopischer Sicht von den Objektträgern gekratzt und in Proteinase K (PK)-Puffer überführt. Der Abbau der

Proteine und die Freisetzung der Nukleinsäuren erfolgten nach Zugabe von 500 µg/ml PK bei 60 °C ÜN im Heizschüttler. Nach der Hitzeinaktivierung der Proteinase K (5 min, 95 °C im Heizblock) wurde die Lösung mit 1/10 Vol 2 M Na-Acetat (pH 4) angesäuert und anschließend wurde 1 Vol wassergesättigtes saures Phenol (pH 4) und 1/5 Vol Chloroform zugegeben. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde die wässrige Phase von der organischen Phase durch Zentrifugation getrennt (20 min, 4 °C, 17900 x g). Die RNA-haltige wässrige Phase wurde abgenommen und mit 2 µl Glycogen und 1 Vol Isopropanol versetzt, um die RNA zu fällen. Nach 2 h Inkubation bei -20 °C wurde die RNA sedimentiert (30 min, 4 °C, 17900 x g), mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in 14-20 µl RNase/DNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde durch Extinktionsmessung bei 260 nm am NanoDrop™ 2000c-Fotometer bestimmt. Bei unzureichenden RNA-Mengen (weniger als 2 µg je Probe für die *Screening*-Analyse, beziehungsweise weniger als 1 µg für die vergleichenden Genexpressionsanalysen) wurde zusätzliche RNA aus den entsprechenden Proben extrahiert und mit der ersten Extraktion vereinigt. Alle RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert und bei Bedarf auf Eis aufgetaut.

#### 2.4.1.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese für sämtliche Expressionsanalysen erfolgte nach einem einheitlichen Protokoll. Für jeden Reaktionsansatz wurde 1 µg RNA (Mindestvolumen 1 µl) mit RNase/DNase-freiem Wasser auf 17,5 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 1 µl *random primers* (200 ng/µl) 5 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden 11,5 µl Reverse-Transkriptase-Mix (6 µl Reverse-Transkriptase-Puffer, 3 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl *RNase Out*, 1 µl Reverse Transkriptase) zugegeben und die Proben bei 42 °C für 1 h inkubiert.

Für die *Screening*-Analysen wurden zwei cDNA-Ansätze je Probe nach der Synthese vereinigt und auf 105 µl mit RNase/DNase-freiem Wasser aufgefüllt. Für die vergleichenden Genexpressionsanalysen wurde jeweils ein halber cDNA-Ansatz (15 µl) auf 53 µl mit RNase/DNase-freiem Wasser aufgefüllt. cDNA für die Expressionsquantifizierung mittels SYBR Green-basierter qRT-PCR wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Die Kontrolle der cDNA auf Verunreinigungen mit gDNA wurde aufgrund der limitierten Probenmengen in Form einer Stichprobenkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde cDNA von 3 Proben in eine PCR für *PDHB* eingesetzt<sup>(153)</sup>. Die Primer (Tab. 10) und Amplifikationsbedingungen (Tab. 14 und Tab. 15) dieser PCR waren so gewählt, dass sowohl cDNA als auch gDNA amplifiziert wurden. Durch das im Amplikon liegende Intron hatte das PCR-Produkt der gDNA eine Länge von 185 bp und das Amplikon der cDNA eine Länge von 103 bp. Eine Verunreinigung der RNA-Extraktion mit gDNA hätte demnach eine

Doppelbande in der elektrophoretischen Auftrennung zur Folge. Für die Auswertung der PCR wurden 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 2 % Agarosegel in 1x TBE-Puffer mit Ethidiumbromid für 30 min bei 120 V aufgetrennt.

**Tab. 14: PCR-Zusammensetzung<sup>1</sup> für die PCR zur Überprüfung der cDNA-Reinheit**

Komponente	[µl]
H <sub>2</sub> O p. a.	15,25
10-fach PCR-Puffer (20 mM Mg <sup>2+</sup> )	2,5
dNTPs (je 1,25 mM)	4,0
Primer Vorwärts (20 µM)	0,5
Primer Rückwärts (20 µM)	0,5
AmpliTaq Gold <sup>®</sup>	0,25
Matrize <sup>2</sup>	2

<sup>1</sup> Zusammensetzung für jeweils eine Probe. <sup>2</sup> Unverdünnte cDNA für Proben und genomische DNA (20 µM) als Positivkontrolle, H<sub>2</sub>O p. a. als Negativkontrolle

**Tab. 15: Temperaturverlauf der PCR zur Überprüfung der cDNA-Reinheit**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Zyklen
1	95	10:00	1
2	94	0:30	
3	55	0:30	35
4	72	0:30	
5	72	7:00	1

#### 2.4.1.3 Genexpressionsanalysen mit *TaqMan*<sup>®</sup> *Low Density Arrays*

Die bereits verdünnte cDNA (siehe Abschnitt 2.4.1.2) wurde zu gleichen Teilen mit *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Darmstadt) gemischt und anschließend jeweils 100 µl Probe in die Ladekammern der *Array*-Karte pipettiert. Die Proben für die initiale *Screening*-Analysen wurden dabei auf jeweils zwei Ladekammern aufgeteilt, um eine Doppelbestimmung zu erreichen. Die *Arrays* wurden anschließend nach Herstellerangaben 2 x 1 min bei 331 x g zentrifugiert und versiegelt<sup>(154)</sup>. Die PCR erfolgte nach den Voreinstellungen des Herstellers für den jeweiligen *Array* auf einem ABI PRISM<sup>®</sup> 7900HT-Real-Time-PCR Gerät mit speziellem Heizblock und Halterung für TLDA (Tab. 16).

**Tab. 16:** Temperaturverlauf der *TaqMan*<sup>®</sup>-qRT-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Zyklen
1	50	2:00	1
2	94,5	10:00	
3	97,0	0:30	40
4	59,7	1:00	

Die Amplifikationsdaten wurden mit den Programmen *Sequence Detections Systems* v2,3 (SDS v2.3), *Relative Quantification Manager* v1.2 (RQM v1.2) und *DataAssist* v2.0 (DA v2.0) (Applied Biosystems (Darmstadt)) bearbeitet. Mit SDS v2.3 wurde zunächst die Qualität der Expressionswerte überprüft. *Wells* mit der Fehlermeldung *empty well* (*EW*, leeres *Well*) und *bad passive reference* (*BP*, schlechte Passiv-Referenz-Werte), welche auf technische Ursachen für fehlende Signale hinwiesen, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die Fehlermeldung *non-amplified well* (*NAW*, nichtamplifiziertes *Well*) wurde je nach Anzahl der betroffenen Replikate unterschiedlich behandelt. Waren alle technischen Replikate einer Probe betroffen, so wurden die *Wells* in der Auswertung belassen, da dies auf eine fehlende Expression des Gens hinwies. Bei einem *NAW* wurde der Expressionswert des verbliebenen amplifizierten *Wells* weitergenutzt. Bei Triplikaten mit zwei *NAW* wurde das amplifizierte *Well* ausgeschlossen und das Gen als nicht exprimiert gewertet. Nicht exprimierten Genen wurde ein  $C_T$ -Wert von 40 zugeordnet.

Die Festlegung der Grenzwerte für die Bestimmung des  $C_T$ -Wertes (*cycle of threshold*) für die *Assays* erfolgte mit RQM v1.2. Für die *Human Endogenous Control Panel* (HECP)-*Arrays* zur Bestimmung geeigneter Referenzgene wurden die automatisch generierten Grenzwerte genutzt. Die *Arrays* für das initiale *Screening* wurden in zwei Gruppen zu zehn beziehungsweise sieben *Arrays* ausgewertet, da das Programm maximal zehn *Arrays* simultan bearbeiten kann. Die automatisch generierten Grenzwerte für beide Gruppen wurden verglichen und bei Bedarf einander angepasst, so dass für jeden *Assay* die gleichen Grenzwerte auf alle *Arrays* angewendet wurden. Für die differentielle Genexpressionsanalyse wurden diese Grenzwerte übernommen. Für die *Assays* für *HES1* und *Jag1*, welche nicht mit dem initialen *Screening* erfasst wurden, wurden neue Grenzwerte festgelegt (siehe Anhang Tab. A2).

Die relative Quantifizierung mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode durch Normalisierung auf das geometrische Mittel der ausgewählten Referenzgene und auf jeweils einen Kalibrator, welcher in allen *Assays* eine Amplifikation aufwies, erfolgte mit DA v2.0. Hierzu wurden die Daten entsprechend der Softwareanweisungen aufbereitet.

#### 2.4.1.3.1 Ermittlung geeigneter Referenzgene

Für die Festlegung geeigneter Referenzgene für die Genexpressionsanalysen wurden HECP-*Arrays* eingesetzt. Diese *Arrays* enthalten pro Füllkanal *Assays* für 16 potentielle Referenzgene in Dreifachbestimmung. Es wurden zwei gleiche *Arrays* mit den in Tab. 4 genannten Proben nach dem in Abschnitt 2.4.1.3 angegebenen Protokoll gemessen. Beide Experimente wurden getrennt ausgewertet.

Die Stabilität der Genexpression eines Gens über alle Proben ist eines der wichtigsten Kriterien für die Eignung des Gens als Referenzgen. Um die Genexpressionsstabilität zu erfassen wurden die mittleren  $C_T$ -Werte der technischen Replikate aller Proben gemittelt und dadurch ein durchschnittlicher  $C_T$ -Wert für jeden *Assay* über den gesamten *Array* erhalten. Es wurden die drei Referenzgene ausgewählt, welche die geringste Schwankung über alle Proben aufwiesen. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die *Assays* die genannten Anforderungen für Expressionsanalysen an FFPE-Gewebe erfüllten (Siehe Abschnitt 2.3.1) und in allen Proben amplifiziert wurden.

Die Auswahl der Referenzgene wurde zur Bestätigung nachträglich mit dem GeNorm-Algorithmus<sup>(155)</sup> überprüft. Dieser ermittelt aus den vorhandenen Daten mit einem speziellen Algorithmus die am stabilsten exprimierten Gene durch den sequentiellen Ausschluss der instabilsten Gene anhand des von der Software errechneten Stabilitätswerts  $M$ . Dabei gilt, je kleiner  $M$ , desto stabiler die Expression und umso größer die theoretische Eignung als Referenzgen.

#### 2.4.1.4 Nested-PCR zum Ausschluss von Mykoplasmenkontaminationen in der Zellkultur

Alle Zelllinien, welche neu in Kultur genommen wurden, wurden zunächst auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht. Als Analysesystem für die Detektion von Mykoplasmen wurde ein *nested*-PCR-System genutzt<sup>(152)</sup>. Dieses beruht auf der Detektion von spezifischen Sequenzen in der Zwischensequenz der 16S- und 23S-rRNA von Mykoplasmen. Für die erste PCR wurden hitzeinaktivierte Zellkulturüberstände (5 min, 95 °C) in 1:10-Verdünnung (H<sub>2</sub>O p. a.) beziehungsweise eine Positivkontrolle (Mykoplasmen positiver Zellkulturüberstand, 1:10 verdünnt mit H<sub>2</sub>O p. a.) und eine Negativkontrolle (nur H<sub>2</sub>O p. a.) als Matrize eingesetzt. Für die zweite PCR wurden die Amplifikate der ersten PCR sowie eine zusätzliche Negativkontrolle als Matrize eingesetzt. Die PCR-Zusammensetzung findet sich in Tab. 17.

**Tab. 17: PCR-Zusammensetzung<sup>1</sup> für die *nested*-PCR zur Detektion von Mykoplasmenkontaminationen in Zellkulturüberständen**

	PCR 1 [ $\mu$ l]	PCR 2 [ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O p. a.	12,25	16,75
10-fach PCR-Puffer (20 mM Mg <sup>2+</sup> )	2,5	2,5
dNTPs (je 1,25 mM)	4,0	4,0
Primermixtur (Siehe Tab. 9)	1,0 (Mixtur 1)	1,0 (Mixtur 2)
AmpliTaQ Gold <sup>®</sup>	0,25	0,25
Matrize <sup>2</sup>	5	0,5

<sup>1</sup> Zusammensetzung für jeweils eine Probe. <sup>2</sup> Für PCR 1: Zellkulturüberstände für Proben und Positivkontrolle, H<sub>2</sub>O p. a. für die Negativkontrolle; für PCR 2: Amplifikationsprodukte aus PCR 1 und zusätzliche Negativkontrolle

Die Amplifikation erfolgte im AB 2720 Thermal Cycler mit einer initialen Aktivierung der Taq-Polymerase (10 min, 95 °C) und 35 (PCR 1) beziehungsweise 30 Zyklen (PCR 2) entsprechend dem Protokoll in Tab. 18. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf 4 °C abgekühlt.

**Tab. 18: Temperaturverlauf der *nested*-PCR 1 und 2 zur Mykoplasmandetektion**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Zyklen
1	95	10:00	1
2	94	0:30	
3	55	2:00	35 (PCR 1) / 30 (PCR 2)
4	72	1:00	
5	72	7:00	1

Für die Auswertung der PCR wurden 5  $\mu$ l PCR-Produkte aus der zweiten PCR mit 1  $\mu$ l DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 1 % Agarosegel in 1x TBE-Puffer mit Ethidiumbromid für 20 min bei 120 V aufgetrennt. In dem Fluoreszenzbild durften nur bei der Positivkontrolle Amplifikate sichtbar werden. Traten in den Proben Amplifikate auf, wurden die entsprechenden Zelllinien als mykoplasmenkontaminiert eingestuft und sofort entsorgt.

#### 2.4.1.5 SYBR Green-basierte qRT-PCR

Die qRT-PCR zur Überprüfung der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression wurde in 10  $\mu$ l Reaktionsvolumen in 96-Well-Platten auf einem LightCycler<sup>®</sup> 480 qRT-PCR-Gerät durchgeführt (Tab. 19 und Tab. 20). Mit dem gleichen System wurde die Expression der Referenzgene *IPO8* und *POLR2A* in den Proben gemessen und das geometrische Mittel der Expression dieser Gene für die Normalisierung und relative Quantifizierung der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode eingesetzt. Durch die Mitführung eines



Kalibrators und einer Referenzprobe (cDNA von Gesamt-mRNA-Extrakten der Zelllinie MKN1, 1:25 verdünnt) sowie den Einsatz von externen Referenzkurven (Verdünnungskurve der Referenzprobe: unverdünnt, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125 und 1:9375) wurden Unterschiede zwischen verschiedenen Messungen sowie Abweichungen der PCR-Effizienzen ausgeglichen (Tab. 21). Alle Berechnungen sowie die automatisierte Integration der externen Referenzkurven erfolgten mit der LightCycler® 480 Software v1.5.0.39.

**Tab. 19: PCR-Zusammensetzung<sup>1</sup> für die SYBR Green-basierte qRT-PCR**

	[ $\mu$ l]
LightCycler® 480 SYBR Green I Master-Mix (2x)	5
Primer vorwärts (10 $\mu$ M)	0,5
Primer rückwärts (10 $\mu$ M)	0,5
LightCycler® 480 H <sub>2</sub> O PCR-grade	2
Matrize <sup>2</sup>	2

<sup>1</sup> Zusammensetzung für jeweils eine Messung, <sup>2</sup> Proben-cDNA 1:10, Referenz- und Kalibrator-cDNA 1:25, H<sub>2</sub>O für Negativkontrollen

**Tab. 20: Temperaturverlauf der SYBR Green-basierten qRT-PCR**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Rampe [°C/s]	Zyklen
1	95	5:00	4,4	1
2	95	0:10	4,4	45
3	60	0:17	2,2	
4	72	0:10	4,4	

**Tab. 21: Daten der Referenzkurven für die relative Quantifizierung der Genexpression in Zelllinien**

Gen	Effizienz	Fehler	Anstieg	Ordinatenabschnitt
<i>NOTCH1</i>	1,839	0,00734	-3,778	25,39
<i>NOTCH2</i>	1,949	0,0205	-3,451	20,85
<i>IPO8</i>	1,919	0,0263	-3,533	19,24
<i>POLR2A</i>	1,924	0,0425	-3,520	23,86

## 2.4.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.2.1 Immunhistochemie

Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 12 und Tab. 13 gelistet. Für die immunhistochemische Färbung von Notch1 und Notch2 wurden 2  $\mu$ m Gewebeschnitte mit Polylysin-

Leim-Verklebung auf Superfrost-Plus Objektträgern zunächst 2 x 10 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert (je 2 x 5 min Isopropanol, 96 %iger und 70 %iger Ethanol sowie dH<sub>2</sub>O). Danach erfolgte ein Waschschrift in TBS (*Tris buffered saline*, Waschpuffer, 50 mM Tris, 0,9 % w/v NaCl, pH 7,6) und die hitzeinduzierte Antigendemaskierung im Schnellkochtopf (7 min kochen in 10 mM Zitratpuffer, pH 6). Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch 10 min Inkubation in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS blockiert. Unspezifische Antikörperbindungen wurden durch 30 min Vorinkubation mit 5 % normalem Ziegenserum blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 h bei RT (Ratte anti-Notch1 1:5, Ratte anti-Notch2 1:30) in der feuchten Kammer. Nach gründlichem Waschen in TBS erfolgte eine 30 min Inkubation mit einem biotinylierten Kaninchen anti-Ratte Antikörper (1:100). Die weitere Streptavidin-Peroxidase-basierte Detektion erfolgte mit dem *Dako REAL™ Detection System Peroxidase/DAB+ kit*, wobei eine Inkubationszeit von 5 min mit dem DAB-Substrat strikt eingehalten wurde. Als Gegenfärbung wurde Mayer's Hämalaun angewendet (1 min, RT mit anschließendem Bläuen in Leitungswasser). Alle Seren und Antikörper wurden in *Dako REAL™ Antibody Diluent* verdünnt.

Bei jeder Färbung wurde ein geeigneter Gewebeschnitt als Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Schnitt des gleichen Tumors, bei dem kein Primärantikörper im Färbeprozess eingesetzt wurde. Die Färbung von korrespondierenden Biopsien und Resektaten eines Patienten erfolgte immer im gleichen Färbeansatz, um konstante Färbebedingungen zu gewährleisten.

Die mikroskopische Auswertung der Färbung erfolgte in Anlehnung an den *Remmele-Score*<sup>(156)</sup>. Dieser sieht eine Bewertung des Anteils der gefärbten Zellen sowie der Intensität der Färbung und die Bildung eines kombinierten Immunreaktivitäts-Scores (IRS) vor. Die Intensität der Färbung wurde auf einer vierstufigen Bewertungsskala mit 0 (negativ), 1 (schwach positiv), 2 (mittel) oder 3 (stark positiv) eingestuft. Die prozentualen Anteile der gefärbten Tumorzellen wurden mit 0 (negativ), 1 (<10 %), 2 (10 bis <50 %), 3 (50 bis <80 %) beziehungsweise 4 (≥80 %) bewertet. Der IRS wurde durch Multiplikation der Einzelbewertungen gebildet und konnte dementsprechend die Werte 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 oder 12 annehmen. Die zytoplasmatische Färbung wurde jeweils getrennt von der nukleären Färbung bewertet. Bei inhomogener Färbung waren die am intensivsten gefärbten Zellen entscheidend für die Bewertung von Intensität und prozentualem Anteil.

Alle gefärbten Gewebeschnitte wurden durch jeweils zwei unabhängige Untersucher (Notch1: Lukas Bauer und Dr. Julia Slotta-Huspenina, Notch2: Lukas Bauer und OA Dr. Rupert Langer) bewertet. Fälle mit diskrepanten Bewertungen wurden anschließend gemeinsam am Diskussionsmikroskop entschieden.

### 2.4.2.2 Western-Blot

Die Western-Blot-Analysen mit den gleichen Antikörpern, welche auch für die Immunhistochemie verwendet wurden, dienten der Überprüfung der Antikörperspezifität und der Kontrolle der *Knockdown*-Effizienz.

Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in 10 cm-Durchmesser-Zellkulturschalen ausgesät und nach 48 bis 72 h bei Erreichen einer 90 %igen Konfluenz geerntet. Dazu wurden die Zellen zunächst auf Eis mit kalter PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und in 100 bis 150  $\mu\text{l}$  Lysispuffer mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Nach 20 min Inkubation auf Eis mit mehrmaligem vortexen wurden ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation entfernt (20 min, 4 °C, 16000 x g). Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mit der Bradford-Methode<sup>(157)</sup> unter Verwendung von *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* und *Protein-Standard II* (1,48 mg BSA/ml) bestimmt und die Lysate anschließend mit 1/4 Vol 5x Laemmli-Puffer versetzt. Nach einer Hitzebehandlung zur Denaturierung der Proteine (5 min, 95°C) wurden die Proben aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

**Tab. 22: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen für die Proteingelelektrophorese**

Komponente	Sammelgel 3,5 %	Trenngel 5 %	Trenngel 10%
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4,9 ml	9,2 ml	7,33 ml
<b>0,5 M Tris-HCl, pH 6,8</b>	1,9 ml	-	-
<b>1 M Tris-HCl, pH 8,8</b>	-	3,75 ml	3,75 ml
<b>Acrylamid/Bis 40 % (37,5:1)</b>	630 $\mu\text{l}$	1,87 ml	3,75 ml
<b>20 % SDS</b>	38 $\mu\text{l}$	75 $\mu\text{l}$	75 $\mu\text{l}$
<b>10 % APS</b>	60 $\mu\text{l}$	90 $\mu\text{l}$	90 $\mu\text{l}$
<b>TEMED</b>	6 $\mu\text{l}$	9 $\mu\text{l}$	9 $\mu\text{l}$

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE unter Nutzung des *Mini PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell System* aufgetrennt. Dazu wurden Polyacrylamidgele mit einem 3,5 %igem Sammelgel sowie einem zweischichtigen 5/10 %-Trenngel in 1,5 mm Stärke eingesetzt (Tab. 22). Um die Trenngele herzustellen wurden zuerst 3,5 ml einer 10 %igen Trenngellösung zwischen die Trägerplatten in der Gießvorrichtung gegossen. Diese wurde sofort mit 3,5 ml einer 5 %igen Trenngellösung überschichtet, so dass sich zwei Gelschichten mit einem schmalen Mischbereich bildeten. Nach der Polymerisation der Trenngele wurden Sammelgele gegossen und durch Einsatz eines Kammes die Auftragstaschen geformt.

Die Gele wurden in Elektrophoresekammern mit 1x Laufpuffer eingesetzt und die Lysate (50  $\mu\text{g}$  Protein) sowie 5  $\mu\text{l}$  Größenstandard in die Auftragstaschen pipettiert. Die Elektro-

phorese erfolgte bei konstanter Spannung in zwei Stufen mit 100 V für 30 min gefolgt von 120 V für 1 h.

Die Proteine wurden anschließend im *Wet-Blot*-Verfahren mit dem *Mini Trans-Blot Cell System* auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Dazu wurden Nitrozellulosemembranen in Transferpuffer eingeweicht und dann luftblasenfrei auf die Gele aufgelegt. Auf die Rückseiten der Gele und der Membranen wurden jeweils ein *Whatman*-Filterpapier und ein Schwamm aufgelegt, welche ebenfalls mit Transferpuffer eingeweicht waren. Der gesamte Aufbau wurde in eine Halterung eingespannt und mit der Membran zur Anode orientiert in eine Blotapparatur mit kaltem Transferpuffer eingesetzt. Der Transfer erfolgte über 4 h bei 100 V unter Eiskühlung.

Der Erfolg des Transfers wurde durch eine 30 s Färbung mit Ponceau S-Lösung und anschließender Spülung mit dH<sub>2</sub>O überprüft. Die Membranen wurden anschließend mit TBST (*Tris buffered saline* +0,1 % TWEEN, Waschpuffer) entfärbt und die spezifische Proteindetektion durch Blockierung von unspezifischen Bindungen mit 5 % Magermilchpulver in TBST (Blockierlösung) vorbereitet (1 h, RT). Die Primärantikörper wurden wie in Tab. 12 beschrieben in der Blockierlösung verdünnt und jeweils über Nacht bei 4 °C auf den Membranen inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mehrmals mit TBST gewaschen (insgesamt 30 min, RT), danach wurden die ebenfalls in Blockierlösung verdünnten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tab. 13) für 30 min bei RT auf den Membranen inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Signaldetektion mit *ChemiGlow West* Chemilumineszenzsubstrat und dem *FluorChem SP* System für digitale Bilderfassung.

Die Intensität der spezifischen Banden auf den digitalen Aufnahmen wurden mit ImageJ v1.42q gemessen. Die Intensitäten der Banden der Einzelproben wurden mit der Summe der Intensitäten und der jeweiligen Referenzmessung ( $\beta$ -Aktin) normalisiert.

## 2.4.3 Zellkultur

### 2.4.3.1 Allgemeines

Die Zelllinien AGS, MKN1, MKN28, MKN45, HS746T und KatoIII wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 1 mg/ml Streptomycin kultiviert. Das Medium für die *Knockdown*-Zelllinien enthielt zusätzlich 1  $\mu$ g/ml Puromycin zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks.

Die Zelllinie SNU5 wurde in IMDM-Medium mit 20 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 1 mg/ml Streptomycin kultiviert.

Die Zelllinie HEK293T wurde in DMEM-Medium mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 1 mg/ml Streptomycin kultiviert. Während der Transfektion und der Virusproduktion für den *Knockdown* wurde ein entsprechendes Medium ohne Antibiotikazusätze verwendet.

Die Medien wurde alle 2 bis 3 d gewechselt und die Zellen bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % passagiert. Nach Erreichen der 25. Passage wurden die Zellen entsorgt und neue Stammsuspensionen aufgetaut. Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmenbefall getestet (*nested*-PCR-System<sup>(152)</sup>, siehe Abschnitt 2.4.1.4).

Informationen zu morphologischen und molekularen Eigenschaften sowie Herkunft und Ursprung der Zelllinien finden sich in Tab. 5.

### 2.4.3.2 Wachstums- und Chemosensitivitätsanalysen

#### 2.4.3.2.1 Koloniebildungsassays

Sämtliche Koloniebildungsassays (KBA) wurden in jeweils drei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung in 6-Well-Platten (*Well*-Durchmesser ca. 3,5 cm) wie beschrieben durchgeführt<sup>(158)</sup>.

Für die Chemosensitivitätsanalysen wurden 2000 Zellen/*Well* in je 2 ml Zellkulturmedium ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch Medium mit oder ohne die jeweiligen Wirkstoffe ersetzt. Nach weiteren 72 h erfolgte ein weiterer Mediumwechsel, gegebenenfalls mit erneuter Wirkstoffzugabe. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 120 h mit den Wirkstoffen wurden die Zellen mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und für weitere 24 h mit normalem Zellkulturmedium inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und mit dem *Diff-Quick Färbeset* gefärbt. Dazu wurden die Zellen nacheinander für jeweils 20 s mit 0,5 ml/*Well* der Fixierlösung beziehungsweise den Färbelösungen I und II inkubiert und anschließend mit  $\text{dH}_2\text{O}$  gespült und getrocknet.

Nach der Trocknung wurden die Platten durch Scannen bei 300 dpi als 8 Bit Graustufen-Bilder digitalisiert. Mit Photoshop CS3 wurden die Bilder in der Helligkeit (+10) und im Kontrast (+70) justiert. Für die weitere Bearbeitung und Quantifizierung wurde ImageJ v1.42q verwendet. Die Bilder wurden nach festgelegten Parametern mit dem Makro 1 auf Einzel*wells* zugeschnitten und die Kolonien mit dem Makro 2 durch Kontrastanpassungen und Grenzwertsetzung identifiziert, gezählt und vermessen (Tab. 23). Als Ergebnis wurde von jedem *Well* die Anzahl der als Kolonien gewerteten Flächen und deren durchschnittliche Größe in  $\text{cm}^2$  ausgegeben. Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte der technischen Replikate aus jeweils drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Für die vergleichenden Untersuchungen von *side-population* (SP) und nicht-SP-Zellen (MKN1) wurden 1000 Zellen/*Well* ausgesät und chemotherapeutikafreies Medium bei ansonsten unverändertem Protokoll eingesetzt.

**Tab. 23: Makros<sup>1</sup> für die Quantifizierung von Koloniebildungsassays**

Makro	Funktion	Inhalt
<b>Makro 1</b>	Setzt automatisch einen Rahmen für den Zuschnitt auf 430 x 430 px (3,64 x 3,64 cm)	<code>run("Properties...", "width=484 height=1583 channels=1 depth=1 frames=1 unit=cm pixel_width=0.008467 pixel_height=0.008467 voxel_depth=1.00000 frame=0 origin=0,0"); setTool(11); setTool(0); makeRectangle(4, 124, 430, 430);</code>
<b>Makro2</b>	Setzt kreisförmigen Rahmen (d=316 px) innerhalb dessen mittels Grenzwertsetzung und Flächenanalyse die Kolonien gezählt und vermessen werden	<code>run("Properties...", "width=430 height=430 channels=1 depth=1 frames=1 unit=cm pixel_width=0.008467 pixel_height=0.008467 voxel_depth=1.00000 frame=0 origin=0,0"); run("Subtract Background...", "rolling=2 white"); run("Enhance Contrast", "saturated=0.5"); setAutoThreshold(); //run("Threshold..."); setThreshold(79, 240); run("Threshold", "thresholded remaining black"); makeOval(38, 38, 354, 354); run("Analyze Particles...", "size=0.0002-0.15 circularity=0.00-1.00 show=Masks display exclude include summarize record");</code>

<sup>1</sup> Anzuwenden in ImageJ v1.42q entsprechend der Software-Anleitung an eingescannten Koloniebildungsassays im .tif-Format mit 300 dpi in 8-Bit Graustufen.

#### 2.4.3.2.2 XTT-Tests

Um Dosis-Wirkungs-Kurven für die Ermittlung von Chemotherapeutika-Sensitivitätswerten und Wachstumskurven für die Ermittlung von Wachstumsgeschwindigkeiten zu erstellen wurden XTT-Tests eingesetzt (siehe auch Mutze *et al.* (2011)<sup>(158)</sup>). Diese beruhen auf der Umsetzung des Tetrazoliumsalses XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid) zu einem wasserlöslichen Formazansalz durch mitochondriale Dehydrogenasen. Um die Reaktion zu verstärken wird das vorgewärmte XTT-Reagenz (37 °C) durch Zugabe von 1 µl *electron coupling reagent* (ECR) je 50 µl unmittelbar vor der Benutzung komplettiert. Die Umsetzung des XTT zum Formazansalz führt zu einem Anstieg der Absorption der Lösung zwischen 450 und 500 nm, dessen Stärke direkt mit der metabolischen Aktivität der Zellen korreliert und mit einem entsprechenden Fotometer messbar ist<sup>(159)</sup>.

#### XTT-basierte Chemosensitivitätsanalysen

Die hier beschriebenen Chemosensitivitätsanalysen wurden in Anlehnung an die Protokolle und mit den Berechnungsmethoden des *Developmental Therapeutics Program* des NCI/NIH durchgeführt<sup>(160)</sup>.

Hierzu wurden je 2000 Zellen/*Well* in Dreifachbestimmung für jede zu messende Wirkstoffkonzentration und Kontrolle in 75 µl Medium/*Well* in 96-*Well*-Platten ausgesät. In einer weiteren 96-*Well*-Platte wurden für die Bestimmung des Ausgangswerts drei *Wells* je

Zelllinie in gleicher Weise befüllt. Auf jeder Platte wurden zudem drei *Wells* mit Medium als Leerwert mitgeführt. Nach 24 h wurden 25 µl Medium sowie 50 µl komplettiertes XTT-Reagenz/*Well* in die Platte für die Bestimmung des Ausgangswerts gegeben und es erfolgten 2 h Inkubation bei 37 °C.

**Tab. 24: Für XTT-basierte Chemosensitivitätsanalysen eingesetzte Zytostatikakonzentrationen**

Zytostatikum	Zelllinie	Konzentrationen [µM]
Cisplatin	MKN1 SP- und nicht-SP-Zellen	0, 2,5, 5, 10, 25
	MKN28- <i>Knockdown</i> -Zellen	0, 1, 5, 10, 25, 50
5-Fluorouracil	MKN28- <i>Knockdown</i> -Zellen	0, 1, 5, 10, 25, 50

Die Messung der Extinktion erfolgte anschließend am Fotometer bei 492 nm gegen die Referenz von 620 nm. Gleichzeitig erfolgte die Behandlung der Zellen in der zweiten Platte mit den Chemotherapeutika durch Zugabe der jeweils vierfachen Endkonzentration in 25 µl Medium/*Well* (Tab. 24). Die metabolische Aktivität der behandelten Zellen wurde nach weiteren 48 h durch Zugabe von 50 µl komplettiertem XTT-Reagenz, wie oben beschrieben, gemessen (Endwert).

Die Berechnung der mittleren metabolischen Aktivität der Zelllinien für jede Wirkstoffkonzentration erfolgte mit den leerwertkorrigierten Messwerten bezogen auf die mediane metabolische Aktivität der unbehandelten Referenz gemäß Formel 1. Aus der Auftragung der metabolischen Aktivität über der Wirkstoffkonzentration ergab sich jeweils eine Dosis-Wirkungs-Kurve aus der die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) als Maß für die Chemosensitivität berechnet wurde (Formel 2).

**Formel 1: Berechnung der relativen metabolischen Aktivität als Maß für die Zellviabilität <sup>1</sup>**

$$\text{für } E_1 \geq E_0: \quad \text{Metabolische Aktivität [\%]} = (E_1 - E_0) / (E_K - E_0) \times 100$$

$$\text{für } E_1 < E_0: \quad \text{Metabolische Aktivität [\%]} = (E_1 - E_0) / E_0 \times 100$$

<sup>1</sup> Abgewandelt von <sup>(160)</sup>  $E_0$ : mediane leerwertkorrigierte Extinktion zum Beginn der Behandlung (Ausgangswert),  $E_1$ : leerwertkorrigierte Extinktion der Probe (Einzelwell) am Ende der Behandlungszeit (Endwert),  $E_K$ : mediane leerwertkorrigierte Extinktion der unbehandelten Referenz am Ende der Behandlungszeit. Die mittlere metabolische Aktivität ergibt sich aus dem Mittelwert der metabolischen Aktivitäten der Replikate.

**Formel 2: Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>) als Maß für die Chemosensitivität**

$$\text{Mittlere inhibitorische Konzentration (IC}_{50}\text{)} = ((50 - \text{MA}_1) - (-C_1 \times \beta)) / \beta$$

$$\text{Anstieg } \beta = (\text{MA}_1 - \text{MA}_2) / (C_1 - C_2)$$

$\text{MA}_1$ : kleinste gemessene mittlere metabolische Aktivität größer 50 %,  $\text{MA}_2$ : größte gemessene mittlere metabolische Aktivität kleiner 50 %,  $C_1$ : zu  $\text{MA}_1$  gehörende Konzentration  $C_2$ : zu  $\text{MA}_2$  gehörende Konzentration,  $\beta$ : linearer Anstieg der Dosis-Wirkung-Kurve im Konzentrationsbereich der  $\text{IC}_{50}$

**XTT-basierte Ermittlung von Kolonieverdoppelungszeiten**

Für die Ermittlung von Wachstumsgeschwindigkeiten in Form von mittleren Kolonieverdoppelungszeiten wurden 1000 (SNU5) oder 2000 Zellen (MKN1 und MKN28-*Knockdown*-Zellen) je *Well* in Dreifachbestimmung für jeden Messpunkt in 100  $\mu\text{l}$  Medium/*Well* ausgesät. Dabei wurde für jeden Messzeitpunkt eine separate Platte angelegt, welche zusätzlich drei Leerwerte (Mediumkontrolle) enthielt. Jeweils 24, 48 und 72 h nach der Aussaat wurde ein Messwert durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  komplettiertem XTT-Reagenz/*Well*, 2 h Inkubation bei 37 °C und Messung der Absorption bei 492/620 nm erhoben. Nach Abzug der Leerwerte und Überprüfung der exponentiellen Form der Wachstumskurven wurden die Messwerte der Zeitpunkte  $T_1=24$  h und  $T_2=72$  h zur Berechnung der Verdoppelungszeit in Formel 3 eingesetzt.

**Formel 3: Berechnung der Kolonieverdoppelungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase mit der Zwei-Punkt-Methode als Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit**

$$\text{Kolonieverdoppelungszeit [h]} = (\text{Log}(2) \times (T_2 - T_1)) / (\text{Log}(E_2) - \text{Log}(E_1))$$

$E_1$ : leerwertkorrigierte Extinktion zum Zeitpunkt  $T_1$  [h],  $E_2$ : leerwertkorrigierte Extinktion zum Zeitpunkt  $T_2$  [h], wobei  $T_2 > T_1$  gilt

**2.4.3.3 Sphäroidbildung**

Die Fähigkeit zur Bildung von Sphäroiden unter serum- und anheftungsfreien Wachstumsbedingungen wird als eine Eigenschaft von (Tumor-) Stammzellen angesehen<sup>(139)</sup>. Der Anteil dieser zur Sphäroidbildung fähigen Zellen kann demnach aus der Anzahl der gebildeten Sphäroide je eingesetzter Zellzahl bestimmt werden.

Die hier vorliegenden Versuche wurden in Anlehnung an das Protokoll von Ji *et al.* (2008)<sup>(161)</sup> durchgeführt. Je 2000 Zellen/*Well* wurden in 1 ml Stammzellmedium (SZM, Tab. 25) in 24-*Well*-Platten für anheftungsfreies Wachstum ausgesät. Dabei wurden bereits bei der Aussaat etwaige Zusätze (Cisplatin) zu dem Medium gemischt. Die Zellen wurden 7 d inkubiert und anschließend die Sphäroide unter mikroskopischer Sicht ausgezählt.



Für die lichtmikroskopische Quantifizierung der Sphäroide wurden skalierte Okulare eingesetzt, welche die Abschätzung der Koloniegroße ermöglichten. In Anlehnung an die Mammosphären-Analysen von Pece *et al.* (2010)<sup>(53)</sup> wurde als Mindestgröße 50 µm Durchmesser festgelegt, um eine Kolonie als Sphäroid zu werten.

**Tab. 25: Zusammensetzung des Stammzellmediums (SZM) für die Sphäroidbildungsassays<sup>1</sup>**

Komponente	Endkonzentration
DMEM	96 % (v/v)
N2 Supplement	1 % (v/v)
B27 Supplement	2 % (v/v)
bFGF	10 ng/ml
EGF	20 ng/ml
Antibiotikum/Antimykotikum	1 % (v/v)

<sup>1</sup> Adaptiert aus Ji *et al.* (2008)<sup>(161)</sup>

#### 2.4.3.4 Zellzyklusanalysen

Die Analyse der Zellzyklusphasen erfolgte mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung am fluoreszenzaktivierten Zellsortierer (FACS). Je  $2,5 \times 10^6$  Zellen der zu untersuchenden Zelllinien wurden in 10 cm-Durchmesser-Zellkulturschalen ausgesät, nach 24 h einem Mediumwechsel unterzogen und nach weiteren 24 h für die FACS-Analyse geerntet. Im Zuge des Mediumwechsels wurde ein Teil der Zellen mit 2 µM Cisplatin behandelt. Je  $2 \times 10^6$  Zellen wurden für die FACS-Analysen aufbereitet. Dazu wurden die Zellen für 2 h in 70 % Methanol bei RT fixiert, mehrfach in PBS gewaschen und für 20 min mit 10 µg/ml RNase A bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in eiskalter PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µg/ml PI und kurzer Inkubation wurden die Zellen am BD FACSCalibur™ analysiert. Die Stärke des registrierten PI-Signals (Excitationsmaximum: 535 nm, Emissionsmaximum: 617 nm) wurde als Surrogat für den DNA-Gehalt der Zellen gemessen und anschließend mit der FloJo 7.6.4 Software für die Einteilung der Zellen in diploide Zellen der G1-Phase und die tetraploiden Zellen der G2/M-Phase sowie die dazwischen liegenden Zellen in der S-Phase genutzt. Dabei wurden die in der Software implementierten halbautomatisierten Algorithmen (Watson-Pragmatic-Modell) für die relative Quantifizierung der Zellen in den drei Zellzyklusphasen genutzt.

#### 2.4.3.5 Side-population-Analysen

Die Analyse von *side-populations* (SP) basierte auf den von Goodell *et al.* (1996) entwickelten Methoden<sup>(133)</sup>, welche von Felix Schumacher für dieses Labor etabliert wurden (Masterarbeit Felix Schumacher, 2008). Die Magenkarzinomzelllinien wurden bei einer

Konfluenz von 80 % geerntet und sedimentiert (300 x g, 5 min, RT). Anschließend wurden die Zellen in Färbemedium resuspendiert und auf eine Konzentration von 4 bis  $6 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Für jede Probe und jede zugehörige Verapamil- oder Fumitremorgin C-Kontrolle wurden 5 ml aliquotiert. Die Vorbehandlung der Kontrollen mit 50  $\mu$ M Verapamil oder 4  $\mu$ M Fumitremorgin C erfolgte für 20 min bei 37 °C im Wasserbad. Die übrigen Proben wurden während dieser Zeit ebenfalls im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 zu allen Proben gegeben (Endkonzentration 10  $\mu$ g/ml für SNU5, 2  $\mu$ g/ml für MKN1 und MKN28, 5  $\mu$ g/ml für alle weiteren Zelllinien) und für weitere 90 min unter regelmäßigem Schwenken bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben 5 min auf Eis abgekühlt um den aktuellen Färbezustand zu konservieren. Nach erneuter Sedimentation (300 x g, 5 min, 4 °C) wurden die Proben in 1 ml eiskalter PBS resuspendiert.

Unmittelbar vor der Analyse mit dem MoFlo FACS-Gerät wurden 2  $\mu$ g/ml PI für die Lebend-Tod-Diskrimination der Zellen zugegeben.

Die Excitation erfolgte mit einem Nd:YAG-Laser mit 355 nm/100 mW (JDSU Xcyte CY-355-100). PI fluoresziert rot, Hoechst33342 hat ein rotes und ein blaues Emissionsmaximum (Hoechst-Rot/Blau). Die PI-Intensität wurde wie die Hoechst-Rot-Intensität durch einen  $675 \pm 20$  nm Langpassfilter gemessen, die Hoechst-Blau Emission wurde mit einem 610 nm Kurzpass dichroischem Spiegel abgetrennt und durch einen  $450 \pm 25$  nm Bandpassfilter gemessen. Die geringe Signalintensität von Hoechst-Rot im Vergleich zu PI ermöglicht die simultane Messung durch das gleiche Filtersystem.

Anhand der 2D-Plots von Vorwärts- (FSC) gegen Seitwärtsstreuung (SSC) und PI-Intensität gegen FSC wurden Zelltrümmer (geringe Signalintensität in SSC/FSC) und tote Zellen ( $PI^{\text{positiv}}$ ) aus der Messung ausgegrenzt. Weiterhin wurden zusammenhängende Zellen anhand der größeren Impulsbreite ausgegrenzt. Die in der Messung verbliebenen vitalen Einzelzellen wurden anschließend im 2D-Plot von Hoechst-Rot gegen Hoechst-Blau auf das Vorhandensein von SP-Zellen analysiert. Diese sind *per definitionem* schwächer gefärbt als die Mehrheit der Zellen und weisen eine leichte Verschiebung in den blauen Fluoreszenzbereich auf. Die Zellen der SP-Fraktion wurden separat von der nicht-SP-Fraktion in eiskaltem Zellkulturmedium aufgefangen. Die so separierten Zellpopulationen wurden anschließend in vergleichenden Untersuchungen eingesetzt.

#### 2.4.3.6 Herunterregulation der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression in Magenkarzinomzelllinien

Die Expression von *NOTCH1* und *NOTCH2* wurde in den Zelllinien MKN28 und AGS mittels lentiviral vermittelter RNA-Interferenz (RNAi oder *Knockdown*) herunterreguliert.

Hierzu wurden Plasmide mit vier verschiedenen shRNA-Konstrukten gegen *NOTCH2* an der Zelllinie MKN28 geprüft und die beiden Konstrukte mit der größten *Knockdown*-Effizienz weiter verwendet. Zwei Konstrukte gegen *NOTCH1* wurden auf persönliche Empfehlung von Anja Baumgart ausgewählt<sup>(162)</sup>. Als Kontrolle wurde ein geeignetes Konstrukt mit einer unspezifischen Sequenz eingesetzt (Tab. 11).

Von der Verpackungszelllinie HEK293T wurden jeweils  $1,8 \times 10^6$  Zellen in 6 cm-Durchmesser-Zellkulturschalen in 5 ml DMEM ohne Antibiotika ausgesät. Nach 24 h erfolgte die liposomenvermittelte Transfektion der Verpackungszelllinie mit den jeweiligen shRNA-Plasmiden sowie den Verpackungsplasmiden durch Zugabe von 600  $\mu$ l Transfektionsansatz (Tab. 26). Nach 6 bis 8 h Inkubation wurde das Medium gewechselt.

**Tab. 26: Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes für den lentiviral vermittelten *Knockdown***<sup>1</sup>

Komponente	Lieferant	Menge
Verpackungsvektor pMD2.G	Addgene	4 $\mu$ g
Verpackungsvektor psPAX2	Addgene	4 $\mu$ g
shRNA-Plasmid <sup>2</sup>	Sigma	4 $\mu$ g
Turbofect	ThermoScientific	12 $\mu$ l
Opti-MEM®	Gibco/Invitrogen	ad 600 $\mu$ l

<sup>1</sup> 20 min Inkubation bei RT, danach sofort zu verwenden. <sup>2</sup> Siehe Tab. 11

Nach weiteren 12 h wurde das Medium erneut ersetzt und der abgenommene virushaltige Überstand für die lentivirale Transfektion filtriert (Porengröße 0,45  $\mu$ m) und mit 1 ml RPMI 1640-Medium und 8  $\mu$ g/ml Polybrene auf die 24 h zuvor ausgesäten Zielzellen (MKN28:  $4,5 \times 10^5$  Zellen/6 cm-Durchmesser-Zellkulturschale, AGS:  $1,5 \times 10^5$  Zellen/6 cm-Durchmesser-Zellkulturschale) gegeben. Diese Übertragung des Überstandes wurde noch weitere zwei Mal im Abstand von je 12 h durchgeführt. Nach weiteren 12 h erfolgte der Wechsel auf virusfreies RPMI 1640-Medium (Vollmedium).

Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte mit 2,5  $\mu$ g/ml Puromycin für 10 d, danach wurde auf eine Erhaltungsdosis von 1  $\mu$ g/ml Puromycin umgestellt. Das Puromycin wurde bei jedem Mediumwechsel frisch zugegeben. Die Überprüfung der *Knockdown*-Effizienz erfolgte in regelmäßigen Abständen mittels qRT-PCR.

Alle Arbeiten mit potentiell virushaltigen Überständen und virusproduzierenden Zellen fanden unter S2-Bedingungen statt.

## 2.4.4 Statistik

Für die Auswertung der Genexpressionsdaten des initialen *Screenings* sowie des öffentlich zugänglichen Datensatzes wurden mittels konditionaler Inferenztests optimale Grenzwerte für die Dichotomisierung bezüglich des Überlebens gesucht sowie für maximal selektierte Statistiken geeignete p-Werte berechnet<sup>(163)</sup>. Genexpressionswerte größer oder gleich dem Grenzwert wurden als hohe Expression definiert, Expressionswerte unter dem Grenzwert wurden als niedrig definiert.

Die Abschätzung von Überlebensraten erfolgte mit Kaplan-Meier Kurven, der Vergleich von Überlebensraten zwischen Patientengruppen erfolgte mit Log-Rang-Tests. Die prognostische Relevanz einzelner Faktoren für das Überleben wurde anhand von relativen Risiken in Cox-Regressions-Modellen abgeschätzt. Für die multivariaten Cox-Regressions-Analysen wurde eine schrittweise Vorwärtselektion von Variablen anhand von Wahrscheinlichkeitsquotienten genutzt. Die Anzahl der eingeschlossenen Variablen im finalen Modell wurde auf ein Zehntel der Anzahl der Ereignisse begrenzt<sup>(141)</sup>.

Unterschiede zwischen korrespondierenden Proben in den vergleichenden Genexpressionsanalysen an zusammengehörenden Biopsien und Resektaten wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test untersucht. Für die Vergleiche der immunhistochemischen Färbung zwischen Biopsien und Resektaten wurde die exakte Signifikanz des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet.

Mann-Whitney-U-Tests,  $\chi^2$ -Tests und der Fisher-Yates-Tests wurden für die Beurteilung der Verteilung von klinisch-pathologischen Parametern sowie zur Abschätzung der Verteilung von kategorialen Variablen genutzt.

Hierarchische Cluster-Analysen wurden mit Cluster 3.0<sup>(164)</sup> und Java TreeView Software (v1.1.5r2)<sup>(165)</sup> durchgeführt. Hierzu wurden die relativen Expressionswerte logarithmisch transformiert, am Median zentriert und normalisiert. Anschließend erfolgte die Clustereinteilung mittels absoluter Kopplung (*complete linkage*) anhand einer Pearson-Korrelationsbasierten, unzentrierten Abstandsmatrix.

Für die Erstellung einer Korrelationsmatrix wurden Spearman-Rho-Korrelationsanalysen aller untersuchten Gene durchgeführt. Die p-Werte in der Korrelationsmatrix wurden entsprechend der Bonferroni-Methode zur Korrektur von Fehlern 1. Art mit einem Korrekturfaktor  $k$  multipliziert<sup>(166)</sup>. Dieser entspricht der Anzahl der durchgeführten Tests und wurde für die Korrelationsmatrix anhand von Formel 4 berechnet. Die resultierenden korrigierten p-Wert wurde mit  $p_B$  bezeichnet und ab einem Wert von  $p_B < 0,05$  als signifikant gewertet.

**Formel 4: Berechnung des Bonferroni-Korrekturfaktors  $k$  für die p-Wert-Korrektur in einer Korrelationsmatrix mit  $n$  eingeschlossenen Genen.**

$$k = (n / 2) \times (n - 1)$$

$k$ : Bonferroni-Korrekturfaktor,  $n$ : Anzahl eingeschlossener Gene

Ein auf multivariaten Cox-Regressions-Modellen basierender Risiko-Score wurde in Anlehnung an die von Cho *et al.* (2011)<sup>(167)</sup> beschriebenen Methoden berechnet. Die Erstellung dieses Scores erfolgte im Wesentlichen durch die Bildung der Produkte aus dem Cox-Regressions-Koeffizient (CRK) der eingeschlossenen Gene und ihrer jeweiligen normalisierten relativen Genexpression (RE) und der anschließenden Summation dieser Werte für jeden Patienten (Formel 5). Die Ermittlung von optimalen Grenzwerten für Dichotomisierungen erfolgte mit Log-Rang-Statistiken.

**Formel 5: Allgemeine Formel zur Berechnung individueller Risiko-Scores**

$$\text{Risiko-Score} = (\text{CRK}_1 \times \text{RE}_1) + (\text{CRK}_2 \times \text{RE}_2) + \dots + (\text{CRK}_n \times \text{RE}_n)$$

$\text{CRK}$ : Cox-Regressions-Koeffizient,  $\text{RE}$ : relative Genexpression, für 1 bis  $n$  eingeschlossene Gene

Alle statistischen Tests erfolgten explorativ und zweiseitig auf einem Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0,05 unter Zuhilfenahme von SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und R (R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich). Diese Fallzahlen und Anzahl der Ereignisse waren ausreichend groß, um die in dieser Arbeit untersuchten Parameter zu schätzen<sup>(141,142)</sup>. Die Studie entspricht den Vorgaben der *Reporting Recommendations for Tumour Marker Prognostic Studies* (REMARK Kriterien)<sup>(168)</sup>.

#### 2.4.5 Nutzung öffentlicher Datenbanken

Über die Online-Datenbank von BRB-ArrayTools<sup>(169)</sup> wurde auf einen frei zugänglichen Genexpressionsdatensatz (cDNA *Microarray* für ~33300 Gene) von primär resezierten Magenkarzinomen mit zugehörigen Überlebensdaten zugegriffen<sup>(170)</sup> und mit dem BRB-ArrayTools-Plugin analysiert. Der Datensatz enthielt Expressionswerte für alle Referenz- und Zielgene der initialen *Screening*-Analysen, außer *UBC*. Für die Normalisierung der Genexpressionsdaten wurden von den verfügbaren Referenzgenen (*POLR2A* und *IPO8*) jeweils die Sonden mit dem geringsten Interquartilsabstand (IQR) und möglichst wenigen fehlenden Werten ausgewählt. Nach der Normalisierung wurden die Sonden der Zielgene auf diejenige mit dem jeweils größten IQR und wenigsten fehlenden Werten reduziert.

Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit mit dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv von Tumorsektaten mit TRG2 zu gewährleisten wurden nur Patienten mit lokal fortgeschrittene Magenkarzinomen (T3 und 4) eingeschlossen. Die wichtigsten klinischen Parameter der Patienten in dem öffentlichen Datensatz sind in Tab. 27 zusammengefasst.

**Tab. 27: Charakteristika der Patienten mit lokal fortgeschrittenem Magenkarzinom (T3 und 4) in einem öffentlich zugänglichen Magenkarzinom-Genexpressionsdatensatz**

Variable	Kategorie	n
Patienten		<b>57</b>
Geschlecht	<b>Weiblich</b>	<b>23</b>
	<b>Männlich</b>	<b>34</b>
Lokalisation	<b>Proximal</b>	<b>20</b>
	<b>Andere</b>	<b>37</b>
Laurén	<b>Intestinal</b>	<b>37</b>
	<b>Nichtintestinal</b>	<b>20</b>

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Genexpressionsanalysen in Tumoren

#### 3.1.1 Ermittlung geeigneter Referenzgene

Um eine Genexpressionsanalyse an verschiedenen Proben durchzuführen, müssen die erhobenen Daten durch geeignete Normalisierungsmethoden soweit wie möglich vergleichbar gemacht werden. Das bedeutet, dass möglichst alle technisch und methodisch bedingten Schwankungen durch Normalisierung der Daten auf intrinsisch konstante Eigenschaften, welche nicht von biologischen Unterschieden zwischen den Proben beeinflusst werden, ausgeglichen werden müssen. Dies kann durch Normalisierung auf geeignete Referenzgene geschehen, deren Expression innerhalb des betrachteten Probenkollektivs möglichst geringen Schwankungen unterliegt. Eine mathematische Kombination der Expressionswerte von mehreren Referenzgenen ist dabei der Normalisierung auf ein einzelnes Referenzgen vorzuziehen, da auch die sogenannten *housekeeping*-Gene („Haushaltsgene“, also Gene, deren Expression für die Aufrechterhaltung grundlegender Zellfunktionen benötigt wird und sich daher theoretisch nie verändert) unter Umständen regulativen Prozessen unterworfen sind<sup>(155)</sup>.

Für die Festlegung geeigneter Referenzgene für die Genexpressionsanalysen mit *TaqMan*<sup>®</sup> *Low Density Arrays* (TLDA) wurde ein Testkollektiv aus acht Magenkarzinomen zweimal mit dem *Human Endogenous Control Panel*-TLDA analysiert. Die fünf Gene mit den geringsten Standardabweichungen des  $C_t$ -Wertes für alle analysierten Proben erreichten in beiden Experimenten Abweichungen unter 1,0 (Tab. 28). *TBP* wurde als ungeeignet eingestuft, da das Gen im ersten Experiment in drei von acht Proben nicht oder nur teilweise detektiert wurde. Von den verbliebenen vier potentiellen Referenzgenen wurde *HMBS* aufgrund der im Vergleich größten Schwankungsbreite ausgeschlossen. Die drei verbliebenen Kandidaten *IPO8* (*Importin 8*), *POLR2A* (*Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A*) und *UBC* (*Ubiquitin C*) wurden als Referenzgene für die Genexpressionsanalysen festgelegt.

**Tab. 28: Mittlere  $C_t$ -Werte und Standardabweichungen der potentiellen Referengene**

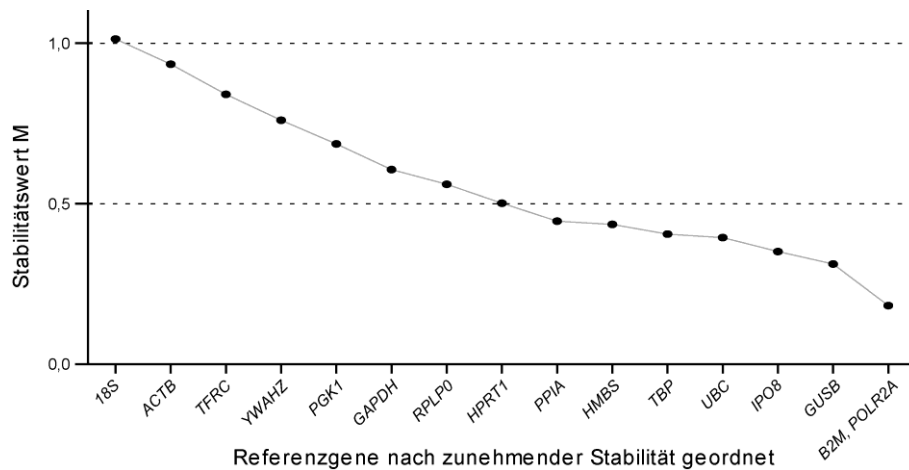
Gen	Experiment 1		Experiment 2	
	MW $C_t$	SA	MW $C_t$	SA
<i>18S</i>	17,1	2,45	18,1	2,39
<i>ACTB</i>	25,7	2,46	27,3	2,56
<i>B2M</i>	21,5	1,02	22,1	0,99
<i>GAPDH</i>	26,3	1,67	26,9	1,65
<i>GUSB</i>	28,5	1,10	29,2	1,07
<i>HMBS</i> <sup>†</sup>	30,0	0,98	30,7	0,95
<i>HPRT1</i>	30,2	1,39	31,3	1,31
<i>IPO8</i> <sup>†</sup>	27,8	0,88	28,5	0,84
<i>PGK1</i>	24,0	1,59	26,5	1,51
<i>POLR2A</i> <sup>†</sup>	23,3	0,83	27,3	0,87
<i>PPIA</i>	22,6	1,08	24,5	1,17
<i>RPLP0</i>	24,6	1,36	25,5	1,32
<i>TBP</i> <sup>†</sup>	29,4	0,79	30,5	0,98
<i>TFRC</i>	28,8	1,82	29,3	1,36
<i>UBC</i> <sup>†</sup>	21,6	0,75	24,2	0,77
<i>YWHAZ</i>	28,9	1,03	30,4	0,72

*MW  $C_t$* : Mittelwert der mittleren  $C_t$ -Werte aller Proben; *SA*: Standardabweichung der mittleren  $C_t$ -Werte über alle Proben; Mit † markierte Gene erreichten in beiden Experimenten eine  $SA < 1,0$ .

Die nachträgliche Überprüfung der Expressionsdaten des Testkollektivs mit einem weiteren Verfahren (GeNorm) anhand der Daten von Experiment 1 ergab *POLR2A* und *B2M* als am stabilsten exprimierte Gene in dem Testkollektiv, gefolgt von *GUSB*, *IPO8* und *UBC* (Abb. 7). Die gleiche Analyse mit den Daten von Experiment 2 zeigte *POLR2A* an 3. Stelle, *IPO8* an 4. und *UBC* an 7. Stelle der Stabilitätswertung (Stabilitätswerte  $M < 0,5$ ).

In allen nachfolgenden Genexpressionsanalysen mit TLDA wurde das geometrische Mittel der Genexpression von *IPO8*, *POLR2A* und *UBC* als Normalisierungsfaktor eingesetzt. Sybr Green-basierte qRT-PCR-Analysen wurden auf das geometrische Mittel von *IPO8* und *POLR2A* normalisiert, ebenso wie die Expressionsdaten aus öffentlich zugänglichen Datenbanken (Vergleich Abschnitt 2.4.5).





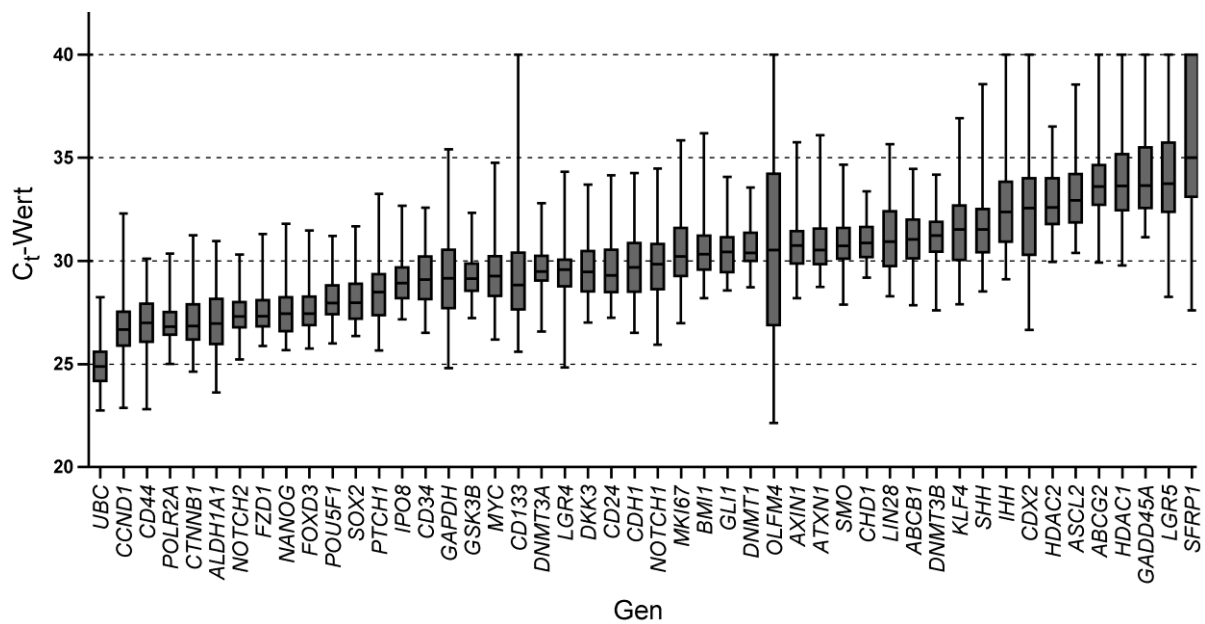
**Abb. 7:** Ermittlung der Genexpressionsstabilität potentieller Referenzgene. Die mit dem GeNorm-Algorithmus ermittelte Stabilitätskurve der potentiellen Referenzgene zeigt die festgelegten Referenzgene *POLR2A*, *IPO8* und *UBC* an 1., 4. und 5. Stelle der Stabilitätswertung.

### 3.1.2 Analyse tumorstammzellassoziierter Gene in residualen Magenkarzinomzellen nach neoadjuvanter Chemotherapie

Die Genexpression von 44 tumorstammzellassozierten Genen und *GAPDH* wurde in 63 Tumoren mit Tumorregressionsgrad (TRG) 2 analysiert. Die Tumoren mit TRG2 wurden für die geplanten Analysen ausgewählt, da sie ein deutliches Therapieansprechen zeigten und trotzdem ausreichend Tumormaterial zur Verfügung stand.

Acht der untersuchten Gene waren in mehr als zehn Proben niedrig oder gar nicht exprimiert ( $C_t$ -Wert  $\geq 35$  beziehungsweise nicht detektierbar). Am schwächsten wurde *SFRP1* exprimiert (36 Proben mit  $C_t$ -Werten  $\geq 35$ , davon 17 nicht detektierbar), gefolgt von *LGR5* (20/7), *GADD45A* (23/2), *HDAC1* (21/5), *ABCG2* (17/2), *OLFM4* (16/4), *CDX2* (15/5) und *HDAC2* (12/0). Drei der übrigen Gene waren in maximal zwei Proben nicht detektierbar (*SHH*, *CD133* und *IHH*). Elf weitere Gene wiesen in mindestens einer Probe (Mittelwert:  $2,1 \pm 2,5$ ) einen  $C_t$ -Wert zwischen 35 und 40 auf (Abb. 8). Die Untersuchung der cDNA-Reinheit bei einer Stichprobe von drei Proben ergab keine Anhaltspunkte für eine Verunreinigung mit gDNA.

Die Messungen verteilten sich auf 17 TLDA. Von 6528 *Wells* wurden 183 (2,8 %) aus verschiedenen Gründen ausgeschlossen. Offensichtliche mechanische Defekte in der Plattenversiegelung von drei Platten verursachten 96 (52 %) der verzeichneten Ausfälle. Die übrigen ausgeschlossenen *Wells* waren hauptsächlich auf niedrig exprimierte Gene zurückzuführen, bei denen ein Duplikat einen hohen  $C_t$ -Wert hatte, während das zweite Duplikat nicht amplifiziert wurde und deshalb entsprechend der Auswertungsrichtlinien ausgeschlossen wurde.



**Abb. 8:** Übersicht über die  $C_t$ -Werte aller untersuchten Gene. Dargestellt sind die Mediane (Mittellinie), 25 bis 75 %-Quartile (Box) sowie der Maximal- und Minimalwert (Whisker) für jedes Gen über alle Proben ( $n=63$ ). Nicht amplifizierte Proben wurden auf einen  $C_t$ -Wert von 40 festgelegt.

### 3.1.2.1 Korrelation der Expression zwischen den einzelnen Genen

Es wurde die Korrelation der Expression aller Gene untereinander analysiert um gemeinsame Expressionsmuster zu erkennen. Alle auf einem Niveau von  $\alpha=0,05$  signifikanten Korrelationen wiesen Spearman-Rho-Korrelationskoeffizienten ( $\rho$ ) von  $\leq -0,49$  (negative Korrelation) oder  $\geq 0,49$  (positive Korrelation) auf. 35 der untersuchten Gene korrelierten in ihrer Expression signifikant mit der Expression mindestens eines anderen Gens. Tab. 29 stellt alle signifikanten, paarweisen Korrelationen dar.

Die stärkste positive Assoziation ergab sich zwischen den Expressionswerten von *LIN28* und *NANOG* ( $\rho=0,91$ ,  $p_B < 0,001$ ). Ebenfalls positiv mit der Expression von *LIN28* und *NANOG* sowie untereinander korrelierten die Expressionswerte von *POU5F1*, *SOX2*, *FZD1*, *ASCL2* und *FOXD3*. Etwas schwächere, teilweise nicht signifikante Assoziationen ergaben sich zwischen den genannten Genen und der Expression von *ATXN1* ( $\rho$  von 0,44 bis 0,61). Die Expression von *CDH1* war mit einigen der genannten Genexpressionen signifikant negativ korreliert: *FOXD3*, *FZD1*, *LIN28* und *NANOG* ( $\rho$  von -0,56 bis -0,50). Die Expression von *CD24* war mit der Expression von *ASCL2*, *LIN28* und *NANOG* signifikant positiv korreliert. Eine weitere Gruppe von Genen mit größtenteils kreuzweise positiv korrelierenden Expressionen stellten *CD34*, *NOTCH2*, *SFRP1* und *SMO* dar. Die Expression von *HDAC1* korrelierte positiv mit der *HDAC2*-Expression. Außerdem waren diese Gene mit *GAPDH* sowie etwas schwächer mit *CTNNB1* und *AXIN1* korreliert. Auch die letztgenannten Gene korrelierten untereinander hochsignifikant in ihrer Expression.

**Tab. 29: Korrelation der Expression einzelner Gene in Tumorresektaten mit TRG2**

Korrelierende Gene		Korrelationskoeffizient <sup>1</sup>	p <sub>B</sub> <sup>2</sup>
<i>LIN28</i>	<i>NANOG</i>	0,91	< 0,001
<i>FOXD3</i>	<i>FZD1</i>	0,88	< 0,001
<i>FOXD3</i>	<i>NANOG</i>	0,86	< 0,001
<i>NANOG</i>	<i>POU5F1</i>	0,85	< 0,001
<i>FOXD3</i>	<i>POU5F1</i>	0,85	< 0,001
<i>FZD1</i>	<i>NANOG</i>	0,84	< 0,001
<i>FZD1</i>	<i>SOX2</i>	0,84	< 0,001
<i>FOXD3</i>	<i>SOX2</i>	0,82	< 0,001
<i>GAPDH</i>	<i>HDAC2</i>	0,81	< 0,001
<i>NANOG</i>	<i>SOX2</i>	0,81	< 0,001
<i>ASCL2</i>	<i>NANOG</i>	0,79	< 0,001
<i>ASCL2</i>	<i>LIN28</i>	0,77	< 0,001
<i>LIN29</i>	<i>POU5F1</i>	0,77	< 0,001
<i>ASCL2</i>	<i>FOXD3</i>	0,77	< 0,001
<i>FOXD3</i>	<i>LIN28</i>	0,77	< 0,001
<i>FZD1</i>	<i>LIN28</i>	0,77	< 0,001
<i>FZD1</i>	<i>POU5F1</i>	0,76	< 0,001
<i>POU5F1</i>	<i>SOX2</i>	0,74	< 0,001
<i>ASCL2</i>	<i>FZD1</i>	0,73	< 0,001
<i>BM11</i>	<i>NOTCH1</i>	0,73	< 0,001
<i>GADD45A</i>	<i>GAPDH</i>	0,72	< 0,001
<i>ASCL2</i>	<i>POU5F1</i>	0,71	< 0,001
<i>LIN30</i>	<i>SOX2</i>	0,71	< 0,001
<i>AXIN1</i>	<i>CTNNB1</i>	0,68	< 0,001
<i>CTNNB1</i>	<i>GAPDH</i>	0,67	< 0,001
<i>ASCL2</i>	<i>SOX2</i>	0,67	< 0,001
<i>CD34</i>	<i>SFRP1</i>	0,66	< 0,001
<i>GAPDH</i>	<i>HDAC1</i>	0,66	< 0,001
<i>AXIN1</i>	<i>GAPDH</i>	0,65	< 0,001
<i>GLI1</i>	<i>PTCH1</i>	0,65	< 0,001
<i>HDAC1</i>	<i>HDAC2</i>	0,65	< 0,001
<i>CD34</i>	<i>NOTCH2</i>	0,61	< 0,001
<i>ASCL2</i>	<i>CD24</i>	0,61	< 0,001
<i>ATXN1</i>	<i>LIN28</i>	0,61	< 0,001
<i>NOTCH2</i>	<i>SMO</i>	0,61	< 0,001
<i>CD34</i>	<i>SMO</i>	0,59	< 0,001
<i>ATXN1</i>	<i>NANOG</i>	0,59	0,001
<i>PTCH1</i>	<i>SMO</i>	0,58	0,001
<i>CTNNB1</i>	<i>MYC</i>	0,58	0,001
<i>ASCL2</i>	<i>ATXN1</i>	0,58	0,001
<i>GADD45A</i>	<i>HDAC2</i>	0,57	0,001
<i>CDH1</i>	<i>NANOG</i>	- 0,56	0,002
<i>CD24</i>	<i>LIN28</i>	0,56	0,002
<i>CDH1</i>	<i>LIN28</i>	- 0,56	0,002
<i>DKK3</i>	<i>NOTCH2</i>	0,56	0,003
<i>ATXN1</i>	<i>GLI1</i>	0,55	0,003
<i>GAPDH</i>	<i>MYC</i>	0,55	0,004
<i>ATXN1</i>	<i>SOX2</i>	0,55	0,004
<i>HDAC1</i>	<i>NOTCH1</i>	0,55	0,004
<i>CTNNB1</i>	<i>HDAC2</i>	0,54	0,005
<i>CDX2</i>	<i>IHH</i>	0,54	0,005

Korrelierende Gene		Korrelationskoeffizient <sup>1</sup>	p <sub>B</sub> <sup>2</sup>
<i>GLII</i>	<i>SMO</i>	0,54	0,006
<i>CTNNB1</i>	<i>HDAC1</i>	0,52	0,012
<i>ATXN1</i>	<i>FZD1</i>	0,52	0,012
<i>AXIN1</i>	<i>IHH</i>	0,52	0,013
<i>AXIN1</i>	<i>HDAC1</i>	0,52	0,016
<i>CD34</i>	<i>GLII</i>	0,52	0,017
<i>CDH1</i>	<i>FOXD3</i>	- 0,52	0,018
<i>CD24</i>	<i>GAPDH</i>	0,51	0,018
<i>IHH</i>	<i>MYC</i>	0,51	0,021
<i>CD24</i>	<i>NANOG</i>	0,51	0,022
<i>AXIN1</i>	<i>MYC</i>	0,51	0,025
<i>DKK3</i>	<i>NOTCH1</i>	0,50	0,028
<i>CHD1</i>	<i>LIN28</i>	0,50	0,032
<i>CHD1</i>	<i>NANOG</i>	0,50	0,033
<i>MKI67</i>	<i>SMO</i>	- 0,50	0,033
<i>CDX2</i>	<i>NOTCH1</i>	0,50	0,037
<i>DNMT3A</i>	<i>DNMT3B</i>	0,50	0,037
<i>CDH1</i>	<i>FZD1</i>	- 0,50	0,040
<i>NOTCH2</i>	<i>SFRP1</i>	0,50	0,040
<i>ABCBI</i>	<i>SMO</i>	0,49	0,047
<i>CDX2</i>	<i>MKI67</i>	0,49	0,047
<i>ABCBI</i>	<i>CD34</i>	0,49	0,049

<sup>1</sup> Spearman-Rho-Korrelation, <sup>2</sup> Signifikanzwert korrigiert nach Bonferroni

### 3.1.2.2 Assoziation der Genexpression mit klinischen und pathologischen Parametern

Die Assoziation der Genexpressionsdaten mit klinischen und pathologischen Parametern wurde mit Kreuztabellenvergleichen untersucht. Hierzu wurden die Patienten jeweils anhand der klinisch-pathologischen Parameter und der Genexpression gruppiert. In Bezug auf die relative Genexpression wurden für die Dichotomisierung die entsprechenden optimalen Grenzwerte für die Assoziation zwischen der Genexpression und dem Gesamtüberleben der Patienten herangezogen (siehe auch Abschnitt 3.1.2.3).

Die Vergleiche der Genexpression mit der lokalen Tumorausdehnung im Resektat nach der Chemotherapie (ypT-Status) zeigten eine signifikante positive Assoziation von höherem ypT-Status (ypT3 oder ypT4) mit einer höheren Expression von *FZD1* (p=0,014), *POU5F1* (p=0,017), *NANOG* (p=0,041) und *GLII* (p=0,045). Eine hohe Expression von *CDH1* oder *LGR5* war dagegen mit einem niedrigeren ypT-Status verknüpft (p=0,014 und 0,017) (Tab. 30).

**Tab. 30: Assoziation der Genexpression mit der lokalen Tumorausdehnung (ypT)**

Gen	Relative Expression <sup>1</sup>	Anzahl der Patienten		p <sup>2</sup>
		ypT0 bis ypT2	ypT3 und ypT4	
<i>FZD1</i>	< 1,59	41	10	0,012 *
	≥ 1,59	5	7	
<i>CDH1</i>	< 2,247	22	14	0,014
	≥ 2,247	24	3	
<i>POU5F1</i>	< 0,897	39	9	0,017 *
	≥ 0,897	7	8	
<i>LGR5</i>	< 0,476	17	12	0,017
	≥ 0,476	29	5	
<i>NANOG</i>	< 1,15	39	10	0,041 *
	≥ 1,15	7	7	
<i>GLI1</i>	< 1,688	34	8	0,045
	≥ 1,688	12	9	

<sup>1</sup>Optimale Grenzwerte für das Überleben, <sup>2</sup> $\chi^2$ -Test mit Freiheitsgrad 1, asymptotische Signifikanz (zweiseitig) nach Pearson, mit \* gekennzeichnete Werte: exakte Signifikanz (zweiseitig) nach Fischer

Eine signifikante inverse Assoziation mit dem Metastasenstatus (ypM) der Patienten konnte für die Expression von *PTCH1*, *LGR5*, *CTNNB1* und *ASCL2* gefunden werden (p=0,004, 0,009, 0,016 und 0,049) (Tab. 31). Bei diesen Genen ging tendenziell eine hohe Expression mit negativem Metastasenstatus einher. Dies traf auch auf die Genexpressionen zu, deren Assoziation mit dem Metastasenstatus keine Signifikanz erreichte. Die Expression von *NOTCH2* bildete hier eine Ausnahme; eine niedrige *NOTCH2*-Expression stand im Zusammenhang mit einem negativen Metastasenstatus.

**Tab. 31: Assoziation der Genexpression mit dem Metastasenstatus (ypM) <sup>1</sup>**

Gen	Relative Expression <sup>1</sup>	Anzahl der Patienten		p <sup>2</sup>
		ypM0	ypM1	
<i>PTCH1</i>	< 1,155	6	6	0,004 *
	≥ 1,155	46	5	
<i>LGR5</i>	< 0,476	20	9	0,009
	≥ 0,476	32	2	
<i>CTNNB1</i>	< 0,9	9	6	0,016 *
	≥ 0,9	43	5	
<i>ASCL2</i>	< 0,21	5	4	0,042 *
	≥ 0,21	47	7	
<i>CDX2</i>	< 3,41	37	11	0,053 *
	≥ 3,41	15	0	
<i>DNMT3A</i>	< 1,416	22	8	0,066
	≥ 1,416	30	3	
<i>PROM1</i>	< 0,096	16	7	0,081 *
	≥ 0,096	36	4	
<i>DNMT3B</i>	< 0,349	4	3	0,095 *
	≥ 0,349	48	8	
<i>NOTCH2</i>	< 0,553	28	3	0,109
	≥ 0,553	24	8	

<sup>1</sup>Optimale Grenzwerte für das Überleben, <sup>2</sup>  $\chi^2$ -Test mit Freiheitsgrad 1, asymptotische Signifikanz (zweiseitig) nach Pearson, mit \* gekennzeichnete Werte: exakte Signifikanz (zweiseitig) nach Fischer

Die Expression von drei Genen war in dieser Untersuchung signifikant mit dem Lymphknotenstatus (ypN) verknüpft: *CCND1*, *POU5F1* und *OLFM4* (p=0,012, 0,024 und 0,034, siehe Tab. 32). Bei den beiden erstgenannten war eine hohe Expression mit einem Lymphknotenbefall assoziiert, während sich die umgekehrte Tendenz bezüglich der Expression von *OLFM4* zeigte.

**Tab. 32: Assoziation der Genexpression mit dem Lymphknotenstatus (ypN)**

Gen	Relative Expression <sup>1</sup>	Anzahl der Patienten		p <sup>2</sup>
		ypN0	ypN1	
<i>CCND1</i>	< 1,24	23	27	0,012 *
	≥ 1,24	1	12	
<i>POU5F1</i>	< 0,897	22	26	0,024
	≥ 0,897	2	13	
<i>OLFM4</i>	< 14,69	17	36	0,034 *
	≥ 14,69	7	3	

<sup>1</sup> Optimale Grenzwerte für das Überleben, <sup>2</sup>  $\chi^2$ -Test mit Freiheitsgrad 1, asymptotische Signifikanz (zweiseitig) nach Pearson, mit \* gekennzeichnete Werte: exakte Signifikanz (zweiseitig) nach Fischer

Eine hohe Expression von *CCND1* war weiterhin mit der Laurén-Klassifikation vom intestinalen Typ assoziiert ( $p=0,003$ ), während eine hohe *SFRP1*-Expression besonders in als nichtintestinal klassifizierten Fällen vorlag ( $p=0,010$ ) (Tab. 33).

**Tab. 33: Assoziation der Genexpression mit der Laurén-Klassifikation<sup>1</sup>**

Gen	Relative Expression <sup>1</sup>	Anzahl der Patienten		p <sup>2</sup>
		Intestinal	Nichtintestinal	
<i>CCND1</i>	< 1,24	14	36	0,003
	≥ 1,24	10	3	
<i>SFRP1</i>	< 12,81	24	29	0,010
	≥ 12,81	0	10	

<sup>1</sup> Optimale Grenzwerte für das Überleben, <sup>2</sup>  $\chi^2$ -Test mit Freiheitsgrad 1, exakte Signifikanz (zweiseitig) nach Fischer

Eine proximale Tumorlokalisation war gegenüber anderen Lokalisationen mit geringerer Expression von *FZD1* und *NANOG* und hoher Expression von *CCND1* assoziiert ( $p=0,040$ ,  $0,047$  und  $0,047$ ) (Tab. 34).

Männliche Patienten hatten tendenziell eine niedrigere Expression von *ALDH1A1* ( $p=0,005$ ) und *SFRP1* ( $p=0,013$ ) als weibliche Patienten (Tab. 35).

**Tab. 34: Assoziation der Genexpression mit der Tumorlokalisation<sup>1</sup>**

Gen	Relative Expression <sup>1</sup>	Anzahl der Patienten		p <sup>2</sup>
		Proximal	Andere	
<i>FZD1</i>	< 1,59	38	13	0,040
	≥ 1,59	5	7	
<i>NANOG</i>	< 1,15	37	12	0,047
	≥ 1,15	6	8	
<i>CCND1</i>	< 1,24	31	19	0,047
	≥ 1,24	12	1	

<sup>1</sup>Optimale Grenzwerte für das Überleben, <sup>2</sup>  $\chi^2$ -Test mit Freiheitsgrad 1, exakte Signifikanz (zweiseitig) nach Fischer

**Tab. 35: Assoziation der Genexpression mit dem Geschlecht der Patienten**

Gen	Relative Expression <sup>1</sup>	Anzahl der Patienten		p <sup>2</sup>
		Männlich	Weiblich	
<i>SFRP1</i>	< 12,81	43	10	0,013
	≥ 12,81	4	6	
<i>ALDH1A1</i>	< 1,034	15	1	0,050
	≥ 1,034	32	15	

<sup>1</sup>Optimale Grenzwerte für das Überleben, <sup>2</sup>  $\chi^2$ -Test mit Freiheitsgrad 1, exakte Signifikanz (zweiseitig) nach Fischer

Mit dem Alter der Patienten, eingeteilt in größer oder kleiner/gleich dem medianen Alter (58 a), gab es keine signifikanten Assoziationen. Für den Differenzierungsgrad (G1 und G2 versus G3) waren aufgrund der geringen Anzahl von Fällen mit hohem Differenzierungsgrad (n=5 in G1 oder G2) ebenfalls keine signifikanten Assoziationen feststellbar.



### 3.1.2.3 Assoziation der Genexpression mit dem Überleben der Patienten

#### 3.1.2.3.1 Konditionale Inferenztests, sowie uni- und multivariate Cox-Regressionsanalysen

Um bei der Vielzahl an untersuchten Genen valide Daten zur Assoziation der Expression einzelner Gene mit dem Überleben zu erhalten wurden konditionale Inferenztests durchgeführt. Diese permutationsbasierten Tests lieferten Signifikanzwerte für die Assoziation zwischen der Genexpression und dem Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) der Patienten, sowie optimale Grenzwerte für die Dichotomisierung der Patientengruppen.

Es zeigte sich, dass eine hohe Expression von *GSK3B*, *DNMT1* und *CTNNB1* jeweils signifikant mit einem besserem Gesamtüberleben der Patienten assoziiert war ( $p=0,006$ ,  $0,041$  und  $0,043$ ). Deutliche Unterschiede im medianen Überleben von Patienten mit hoher und niedriger Expression von *ABCG2*, *OLFM4* und *NOTCH2* wurden beobachtet, obwohl diese nicht signifikant waren ( $p=0,051$ ,  $0,055$  und  $0,071$ ) (Tab. 36). Für alle diese Gene außer *NOTCH2* war eine hohe Expression mit besserem Überleben assoziiert. Die mit konditionalen Inferenztests ermittelten Grenzwerte für alle Gene sowie die zugehörigen Gruppengrößen und p-Werte sind in Tab. A3 (Anhang) zu finden.

**Tab. 36: Assoziation der Genexpression mit dem Überleben**

Gen	Grenzwert der relativen Genexpression <sup>1</sup>	n (<GW)	Medianes ÜL [mo]	n (≥GW)	Medianes ÜL [mo]	p <sup>1</sup>
<i>GSK3B</i>	1,119	40	47,1	23	102,6	0,006
<i>DNMT1</i>	1,299	53	42,1	10	n.e.	0,041
<i>CTNNB1</i>	0,900	15	32,3	48	94,9	0,043
<i>ABCG2</i>	4,240	54	47,1	9	102,6	0,051
<i>OLFM4</i>	14,690	53	40,4	10	n.e.	0,055
<i>NOTCH2</i>	0,553	31	94,9	32	40,4	0,071

<sup>1</sup> Signifikanzwert bestimmt mit konditionalen Inferenztests, **GW**: Grenzwert, **ÜL**: Überleben, **n.e.**: medianes Überleben wurde nicht erreicht

Die univariate Cox-Regressionsanalyse basierend auf den kontinuierlichen Expressionswerten zeigte tendenziell ähnliche Ergebnisse, wobei nur eine höhere *GSK3B*-Expression signifikant mit besserem Überleben assoziiert war (Tab. 37).

**Tab. 37: Univariate Cox Regressionsanalyse<sup>1</sup> und Überleben der Patienten**

Gen	RR	95 % KI	p
<i>GSK3B</i>	0,220	0,064 – 0,756	0,016
<i>DNMT1</i>	0,379	0,138 – 1,042	0,060
<i>CTNNB1</i>	0,567	0,305 – 1,052	0,072
<i>ABCG2</i>	0,851	0,707 – 1,024	0,087
<i>OLFM4</i>	0,987	0,969 – 1,006	0,191
<i>NOTCH2</i>	3,326	0,935 – 11,840	0,064

<sup>1</sup>kontinuierliche Genexpressionswerte, **RR**: relatives Risiko, **95 % KI**: 95 % Konfidenzintervall

Um die prognostische Wertigkeit der gefundenen Assoziationen gemeinsam mit den prognostisch relevanten klinischen Parametern zu untersuchen wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse mit schrittweise vorwärts gerichteter Variablenselektion durchgeführt. Als Variablen wurden die wichtigsten prognostischen, klinisch-pathologischen Parameter (ypT, ypN, ypM und Resektionsstatus) sowie die in den konditionalen Inferenztests signifikant mit dem Überleben assoziierten Genexpressionswerte von *GSK3B*, *DNMT1* und *CTNNB1* eingeschlossen. Die Variablenselektion endete im zweiten Schritt mit der *GSK3B*-Expression als zweiten unabhängigen prognostischen Faktor nach dem Metastasenstatus (p=0,003) (Tab. 38).

**Tab. 38: Multivariate Cox-Regressionsanalyse<sup>1</sup> und Überleben der Patienten**

Rang	Variable	RR	95 % KI	p
1	Fernmetastasen (ypM1)	23,893	8,159 – 69,972	< 0,001
2	<i>GSK3B</i>	0,128	0,033 – 0,492	0,003

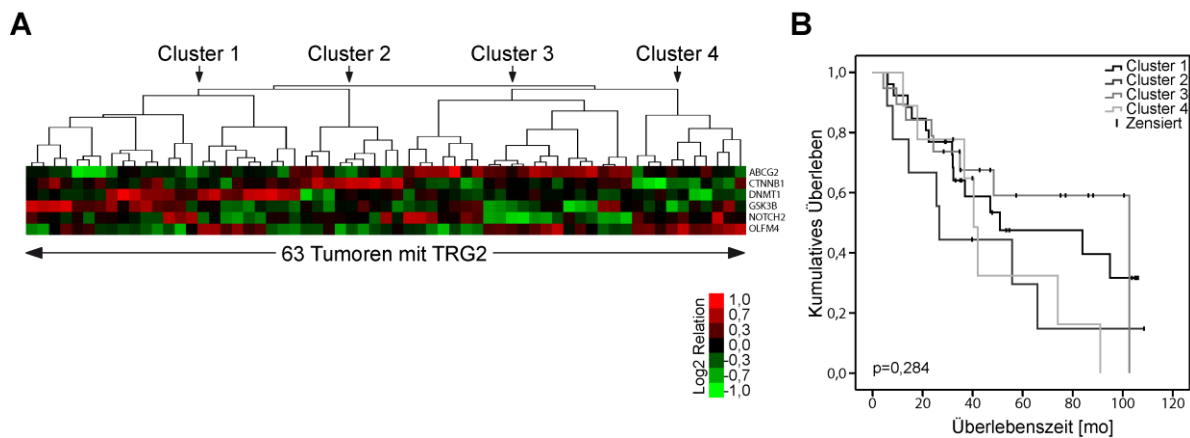
<sup>1</sup>Vorwärtsselektion (Wahrscheinlichkeitsquotient), eingeschlossene Parameter sind die *GSK3B*-, *DNMT1*- und *CTNNB1*-Expression (kontinuierliche Werte), ypT, ypN, ypM und Resektionskategorie. **RR**: relatives Risiko, **95 % KI**: 95 % Konfidenzintervall

### 3.1.2.3.2 Clusteranalysen

Um unabhängig von grenzwertbasierten Methoden weitere Zusammenhänge der gemessenen Genexpression mit dem Überleben der Patienten zu erkennen wurden nichtüberwachte Clusteranalysen (*unsupervised clustering*) mit absoluter Kopplung (*complete linkage*) anhand einer Pearson-Korrelation-basierten, unzentrierten Abstandsmatrix durchgeführt.

Bei einer Clusteranalyse unter Verwendung aller verfügbarer Genexpressionsdaten wurde kein signifikanter Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben nachgewiesen.

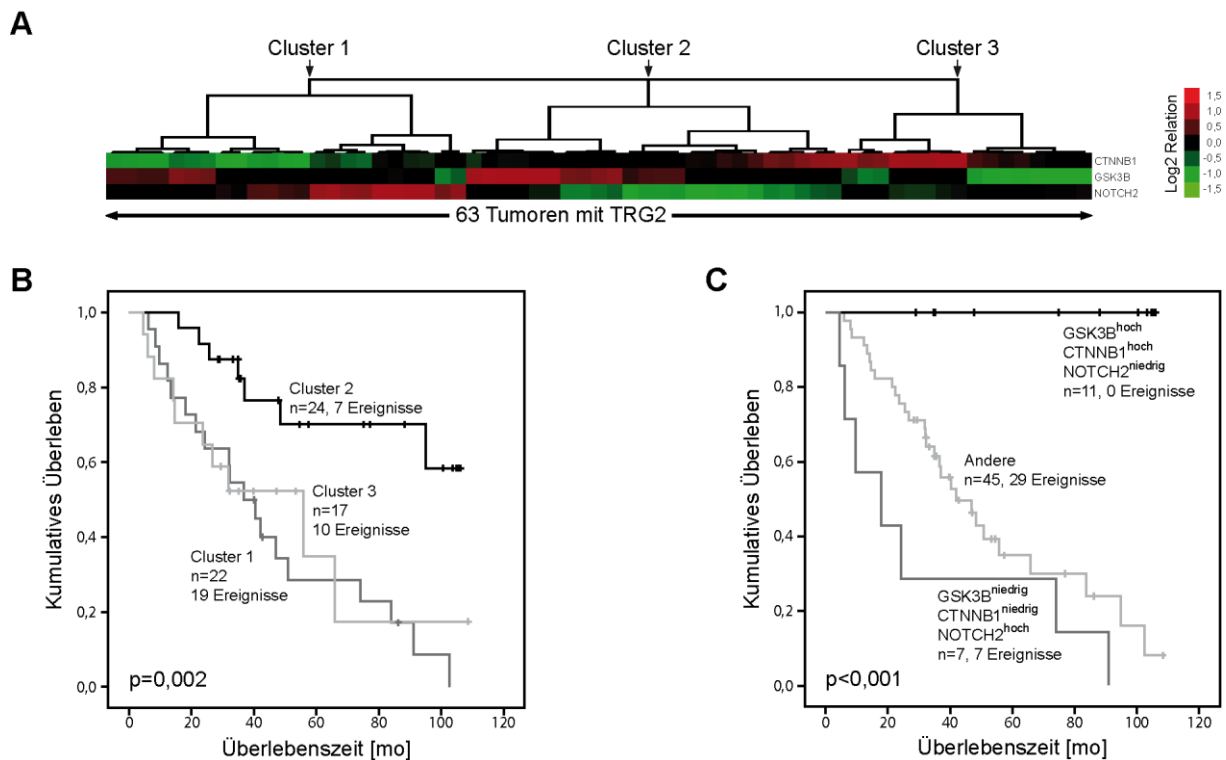
Die gemeinsame Clusteranalyse der Gene, welche die beste Assoziation mit dem Gesamtüberleben im konditionalen Inferenztest zeigten, konnte ebenfalls keine signifikant unterschiedlichen Patientengruppen definieren (Abb. 9).



**Abb. 9:** Clusteranalyse mit Genen, die in der Einzelanalyse eine Assoziation mit dem Überleben zeigten. **A)** Die Unterteilung in Cluster 1 bis 4 entspricht der 2. Unterteilungsebene des Verwandtschaftsbaumes. **B)** Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt keine signifikante Assoziationen mit dem Gesamtüberleben für die Einteilung der Patienten anhand der Cluster 1 bis 4 (Log-Rang-Test).

Die Reduktion der ausgewählten Gene auf Schlüsselgene der Wnt- und Notch-Signalwege (*GSK3B*, *CTNNB1* und *NOTCH2*) führte zur Identifikation einer Patientengruppe mit deutlich besserem Gesamtüberleben ( $p=0,002$ ) (Abb. 10A und B).

Eine genauere Betrachtung der relativen Genexpressionen in diesen Clustern wies darauf hin, dass die Tumoren dieser Patienten eine hohe *GSK3B*- und *CTNNB1*-Expression sowie eine niedrige *NOTCH2*-Expression aufwiesen. Um dies zu überprüfen wurde eine Einteilung der Patienten anhand der kombinierten Kategorisierungen für die drei Gene mit den initial ermittelten optimalen Grenzwerten für die Assoziation mit dem Gesamtüberleben durchgeführt. Die Einteilung erfolgte in eine Gruppe mit *GSK3B*<sup>hoch</sup>-, *CTNNB1*<sup>hoch</sup>- und *NOTCH2*<sup>niedrig</sup>-exprimierenden Tumoren ( $n=11$ ), in eine zweite Gruppe mit dem entgegengesetzten Expressionsmuster (*GSK3B*<sup>niedrig</sup>, *CTNNB1*<sup>niedrig</sup> und *NOTCH2*<sup>hoch</sup>,  $n=7$ ), sowie in eine dritte Gruppe, mit anderen Kombinationen der Expression dieser drei Gene ( $n=45$ , Abb. 10C). Diese Einteilung ergab eine hochsignifikante Trennung der Patienten bezüglich des Gesamtüberlebens ( $p<0,001$ ); keiner der elf Patienten in der *GSK3B*<sup>hoch</sup>, *CTNNB1*<sup>hoch</sup> und *NOTCH2*<sup>niedrig</sup>-Gruppe war im Beobachtungszeitraum verstorben.



**Abb. 10:** Assoziation der Expression von *GSK3B*, *CTNNB1* und *NOTCH2* mit dem Gesamtüberleben (OS). **A**) Clusteranalyse mit der Expression von *GSK3B*, *CTNNB1* und *NOTCH2*. **B**) Die Kaplan-Meier-Kurve des Clusters 2 weist ein deutlich längeres Gesamtüberleben auf als Cluster 1 (medianes OS nicht erreicht versus medianes OS 36,7 mo, 95 % KI 24,4 – 49,1) und Cluster 3 (medianes OS 55,9 mo, 95 % KI 16,7 – 95,0). **C**) Kaplan-Meier-Kurven der Patienten basierend auf der Kategorisierung der Tumoren anhand der optimalen Grenzwerte der Expression für die drei Gene (*GSK3B*<sup>hoch</sup> *CTNNB1*<sup>hoch</sup> *NOTCH2*<sup>niedrig</sup>: medianes OS nicht erreicht; *GSK3B*<sup>niedrig</sup> *CTNNB1*<sup>niedrig</sup> *NOTCH2*<sup>hoch</sup>: medianes OS 18,0 mo, 95 % KI 0 – 39,5; andere: medianes OS 42,1 mo, 95 % KI 28,3 – 55,9). Alle p-Werte wurden mit Log-Rang-Tests ermittelt.

### 3.1.2.3.3 Erstellung eines Risiko-Scores

Die oben angewandte Methode, Patienten anhand der optimierten Grenzwerte der Expression von drei Einzelgenen in Gruppen einzuordnen, bietet nicht die Möglichkeit einen nachträglich analysierten Patienten zuzuordnen. Eine Alternative bieten Risiko-Scores wie sie von Cho *et al.* (2011) angewandt wurden, die sich als Einzelwert aus den individuellen Genexpressionswerten des Patienten und den Cox-Regressionskoeffizienten für die Gene als Gewichtungsfaktor zusammensetzen<sup>(167)</sup>. Dadurch wird jedem Patienten entsprechend des individuellen Genexpressionsmusters ein Wert zugeordnet, der mit einem Grenzwert abgeglichen werden kann, um die Patienten zum Beispiel in eine Hochrisiko-Gruppe oder eine Niedrigrisiko-Gruppe einzuordnen. Dieses Vorgehen bietet den Vorteil, dass ein Grenzwert, der an einem Testkollektiv ermittelt wurde, auf ein Validierungskollektiv mit entsprechender Datenstruktur übertragen werden kann.

**Tab. 39: Multivariate Cox-Regressionsanalyse (Einschluss)**

Gen	Koeffizient	SE	RR	95 % KI
<b>CTNNB1</b>	-0,1913	0,327	0,826	0,435 – 1,569
<b>GSK3B</b>	-1,5684	0,701	0,208	0,053 – 0,823
<b>NOTCH2</b>	1,2036	0,637	3,332	0,956 – 11,615

**SE:** Standardfehler des Koeffizienten, **RR:** relatives Risiko, **95 % KI:** 95 % Konfidenzintervall

In Anlehnung an Cho *et al.* (2011) wurde für jeden Patienten ein individueller Risiko-Score anhand der Expressionswerte von *GSK3B*, *CTNNB1* und *NOTCH2* und den zugehörigen multivariaten Cox-Regressionskoeffizienten erstellt<sup>(167)</sup>. Hierzu wurden die Produkte aus den Regressionskoeffizienten (Tab. 39) und den jeweiligen Genexpressionswerten aufsummiert. Die Patienten wurden anhand der Scores mit einem nach Log-Rang-Statistik optimierten Grenzwert in zwei Gruppen unterteilt ( $Score^{niedrig} \leq -1,3199$ , n=26 und  $Score^{hoch} > -1,3199$ , n=37). Diese unterschieden sich signifikant im 1-, 2-, 3- und 5-Jahres-Überleben, mit deutlich besseren Überlebensraten in der  $Score^{niedrig}$ -Gruppe (Tab. 40).

**Tab. 40: Relative Überlebensraten der Patienten nach Gruppierung anhand des Risiko-Scores<sup>1</sup>**

Überlebenszeitraum	Anzahl lebender Patienten / Gesamtzahl der Patienten im jeweiligen Zeitraum (%)			
	1 Jahr	2 Jahre	3 Jahre	5 Jahre
<b>Risiko-Score <math>\leq -1,3199</math><sup>2</sup></b>	26/26 (100 %)	25/26 (96 %)	16/20 (80 %)	11/17 (65 %)
<b>Risiko-Score <math>&gt; -1,3199</math></b>	31/37 (84 %)	23/37 (62 %)	16/34 (47 %)	5/29 (17 %)
<b>p<sup>3</sup></b>	0,038	0,002	0,017	0,001

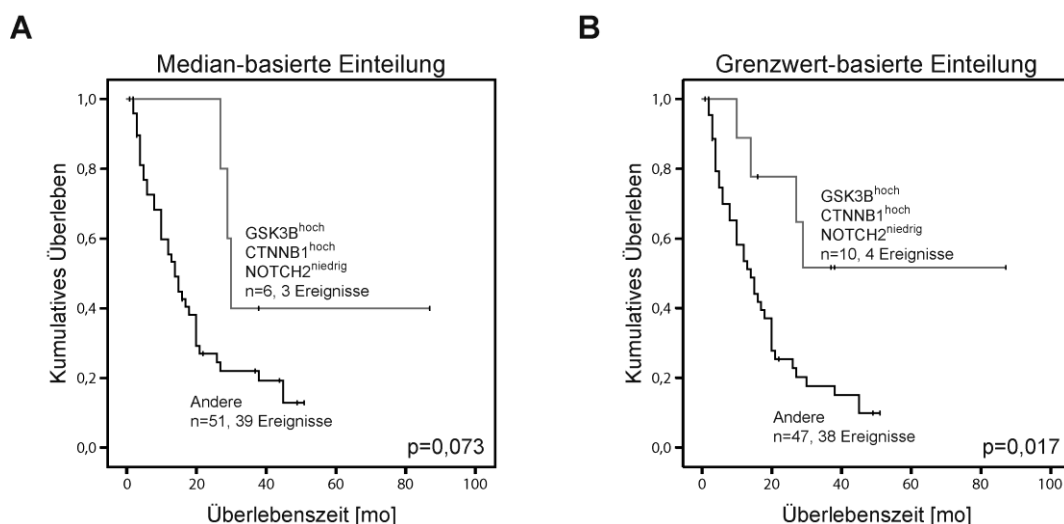
<sup>1</sup>Ermittelt mit den Daten aus Tab. 39 unter Verwendung von Formel 5, <sup>2</sup>optimaler Grenzwert für das Gesamtüberleben nach Log-Rang Statistik, <sup>3</sup>Signifikanzwert nach Pearsons  $\chi^2$  und Fishers Exakt-Test

### 3.1.3 Analyse öffentlich zugänglicher Genexpressionsdaten

Um die generelle prognostische Wertigkeit des gefundenen Expressionsmusters zu untersuchen, wurde ein öffentlich verfügbarer Datensatz mit genomweiten Expressionsdaten von 90 primär resezierten Magenkarzinomen analysiert<sup>(170)</sup>. Um die Vergleichbarkeit mit dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv zu verbessern wurde der öffentliche Datensatz auf 58 lokal fortgeschrittene Fälle eingeschränkt (alle Fälle mit Tumorstadium T3 oder T4) und in gleicher Weise untersucht, wie das zuvor analysierte Kollektiv. Die mediane Nachsorgezeit der Patienten im öffentlichen Datensatz betrug 49 mo (Spanne: 1 – 87), das mediane Gesamtüberleben betrug 16 mo (95 % KI: 11 – 21, 42 Ereignisse) und war signifikant kleiner als das des hier untersuchten Kollektivs (p<0,001). Die weiteren im öffentlichen Datensatz enthaltenen klinisch-pathologische Daten (Geschlecht, Tumorlokal-

isation, histologischer Subtyp nach Laurén) zeigten im Vergleich mehr weibliche Patienten (40 % versus 25 %,  $p=0,081$ ), weniger proximale Tumoren (35 % versus 68 %,  $p<0,001$ ) und mehr Tumoren vom intestinalen Subtyp nach Laurén (65 % versus 38 %,  $p=0,003$ ).

Die Patienten wurden anhand der Mediane der Genexpression von *GSK3B*, *CTNNB1* und *NOTCH2* entsprechend des Expressionsmusters (*GSK3B*<sup>hoch</sup>, *CTNNB1*<sup>hoch</sup>, *NOTCH2*<sup>niedrig</sup>) in zwei Gruppen eingeteilt. Die *GSK3B*<sup>hoch</sup>, *CTNNB1*<sup>hoch</sup> und *NOTCH2*<sup>niedrig</sup>-Gruppe umfasste 6 Patienten mit 3 Ereignissen (50 %) im Beobachtungszeitraum, in der zweiten Gruppe befanden sich 51 Patienten mit 39 Ereignissen (76 %) (Abb. 11A). Diese Trennung war nicht signifikant im Log-Rang-Test ( $p=0,073$ ). Durch Einsatz der optimalen Grenzwerte zur Dichotomisierung konnte eine Gruppe von 10 Patienten identifiziert werden, die sich signifikant im Gesamtüberleben von dem restlichen Kollektiv unterschied ( $p=0,017$ ) (Abb. 11B).



**Abb. 11:** Analyse eines öffentlichen Magenkarzinom-Genexpressionsdatensatzes<sup>(170)</sup> mittels Kaplan-Meier-Kurven. Die Patienten wurden anhand des Medians (A) oder der optimalen Grenzwerte (B) der Genexpression im Tumor dichotomisiert und entsprechend ihres Expressionsmusters von *GSK3B*, *CTNNB1* und *NOTCH2* zugeordnet. **A)** *GSK3B*<sup>hoch</sup> *CTNNB1*<sup>hoch</sup> *NOTCH2*<sup>niedrig</sup>: medianes OS 30 mo, 95 % KI 27,8 – 32,2; andere: medianes OS 14 mo, 95 % KI 10,0 – 18,0, **B)** *GSK3B*<sup>hoch</sup> *CTNNB1*<sup>hoch</sup> *NOTCH2*<sup>niedrig</sup>: medianes OS nicht erreicht; andere: medianes OS 14,6 mo, 95 % KI 8,6 – 19,3. Alle p-Werte wurden mit Log-Rang-Tests ermittelt.

Die Bildung eines Risiko-Scores anhand der Cox-Regressionskoeffizienten der drei Gene (Tab. 41) zeigte bei Teilung nach einem für dieses Kollektiv berechneten optimalen Grenzwert ein leicht verlängertes Überleben der Patienten in der Niedrigrisikogruppe (medianes Überleben 21 versus 13 mo,  $p=0,110$ ). Am deutlichsten wurde der Unterschied der beiden Gruppen im 2-Jahres-Überleben. Hier waren 45 % der Patienten der in der Hochrisikogruppe bereits verstorben, während es in der Niedrigrisikogruppe nur 21 % waren ( $p=0,071$ ) (Tab. 42).

**Tab. 41: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für öffentlich verfügbare Genexpressionsdaten** <sup>(170)</sup>

Gen	Koeffizient <sup>1</sup>	SE	RR	95 % KI
<b>CTNNB1</b>	-0,1496	0,212	0,861	0,527 – 1,305
<b>GSK3B</b>	-0,2009	0,286	0,818	0,473 – 1,446
<b>NOTCH2</b>	0,1005	0,150	1,106	0,824 – 1,483

<sup>1</sup>Variablenselektionsmethode: Einschluss, **SE**: Standardfehler des Koeffizienten, **RR**: relatives Risiko, **95 % KI**: 95 % Konfidenzintervall

**Tab. 42: Relative Überlebensraten der Patienten in der öffentlichen Datenbank nach Gruppierung anhand des Risiko-Scores** <sup>1</sup>

Anzahl lebender Patienten / Gesamtzahl der Patienten im jeweiligen Zeitraum (%)				
Überlebenszeitraum	1 Jahr	2 Jahre	3 Jahre	
<b>Risiko-Score ≤ 0,088</b> <sup>2</sup>	16/23 (70 %)	10/22 (45 %)	7/22 (32 %)	
<b>Risiko-Score &gt; 0,088</b>	15/29 (52 %)	6/28 (21 %)	4/28 (14 %)	
<b>p</b> <sup>2</sup>	0,193	0,071	0,178	

<sup>1</sup>Ermittelt mit den Daten aus Tab. 41 unter Verwendung von Formel 5, <sup>2</sup>optimaler Grenzwert für das Gesamtüberleben nach Log-Rang Statistik, <sup>3</sup>Signifikanzwert nach Pearsons  $\chi^2$  und Fishers Exakt Test

### 3.1.4 Vergleichende Genexpressionsanalyse zwischen korrespondierenden prä- und posttherapeutischen Tumorproben mit qRT-PCR

Um den Einfluss der Chemotherapie auf die Expression von prognostisch relevanten, tumorstammzellassozierten Genen zu untersuchen und gleichzeitig festzustellen, ob sich Anhaltspunkte für eine Anreicherung potentieller Tumorstammzellen ergeben, wurden vergleichende Analysen zwischen korrespondierenden prätherapeutischen Biopsien und posttherapeutischen Resektaten mit TRG2 und TRG3 durchgeführt.

Anhand der Ergebnisse der initialen *Screening*-Analyse wurden zwölf Gene für diese vergleichenden Genexpressionsanalysen ausgewählt. *GSK3B*, *DNMT1*, *CTNNB1*, *ABCG2*, *OLFM4* und *NOTCH2* wurden aufgrund ihrer Assoziation mit dem Gesamtüberleben ausgewählt. *POU5F1* und *LGR5* wurden aufgrund ihrer herausragenden Rolle als potentielle Stammzellmarker selektiert. *CCND1* wurde zusätzlich in die Untersuchung eingeschlossen, da sich ein Zusammenhang zwischen der Expression von *CCND1* und dem histologischen Typ sowie dem Lymphknotenstatus ergab und da *CCND1*, wie auch *LGR5*, ein Zielgen des Wnt-Signalwegs ist <sup>(171,172)</sup>. Weiterhin wurden *JAG1* als Ligand und *HES1* als Zielgen des Notch-Signalwegs eingeschlossen. *NOTCH1* zeigte in den bisherigen Versuchen keine relevanten Assoziationen mit klinisch-pathologischen Parametern, wurde aber aufgrund der

funktionellen Nähe zu *NOTCH2* ausgewählt. Für die Normalisierung wurden die gleichen Referenzgene herangezogen, wie für die *Screening*-Analysen.

In den posttherapeutischen Resektaten mit TRG2 konnte eine signifikante Zunahme der *NOTCH2*-, *POU5F1*- und *LGR5*-Expression gegenüber den zugehörigen prätherapeutischen Biopsien festgestellt werden ( $p=0,002$ ,  $0,028$  und  $0,017$ ). In den Proben mit TRG3 war lediglich eine signifikante Zunahme der *POU5F1*-Expression nach der Chemotherapie zu verzeichnen ( $p=0,002$ ). Die Zunahme der *NOTCH2*-Expression fiel moderat aus ( $p=0,062$ ) (Tab. 43).

**Tab. 43: Expressionsänderungen zwischen korrespondierenden prä- und posttherapeutischen Tumorproben**

Expressionsänderung <sup>1</sup>	TRG2 (n=22)		TRG3 (n=22)	
	Gen	p <sup>2</sup>	Gen	p <sup>2</sup>
Zunahme	<i>NOTCH2</i>	0,002	<i>NOTCH2</i>	0,062
	<i>POU5F1</i>	0,028	<i>POU5F1</i>	0,002
	<i>LGR5</i>	0,017	<i>LGR5</i>	0,249
	<i>CTNNB1</i>	0,062	<i>CTNNB1</i>	0,733
Keine Veränderung	<i>ABCG2</i>	0,263	<i>ABCG2</i>	0,485
	<i>GSK3B</i>	0,263	<i>GSK3B</i>	0,709
	<i>OLFM4</i>	0,211	<i>OLFM4</i>	0,961
	<i>CCND1</i>	0,178	<i>CCND1</i>	0,007
Abnahme	<i>JAG1</i>	0,067	<i>JAG1</i>	0,026
	<i>HES1</i>	0,050	<i>HES1</i>	0,007
	<i>NOTCH1</i>	0,072	<i>NOTCH1</i>	0,001
	<i>DNMT1</i>	0,009	<i>DNMT1</i>	0,002

<sup>1</sup> Expression in den Resektaten bezogen auf die Expression in den Biopsien, <sup>2</sup> Signifikanzwert nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, **TRG**: Tumorregressionsgrad

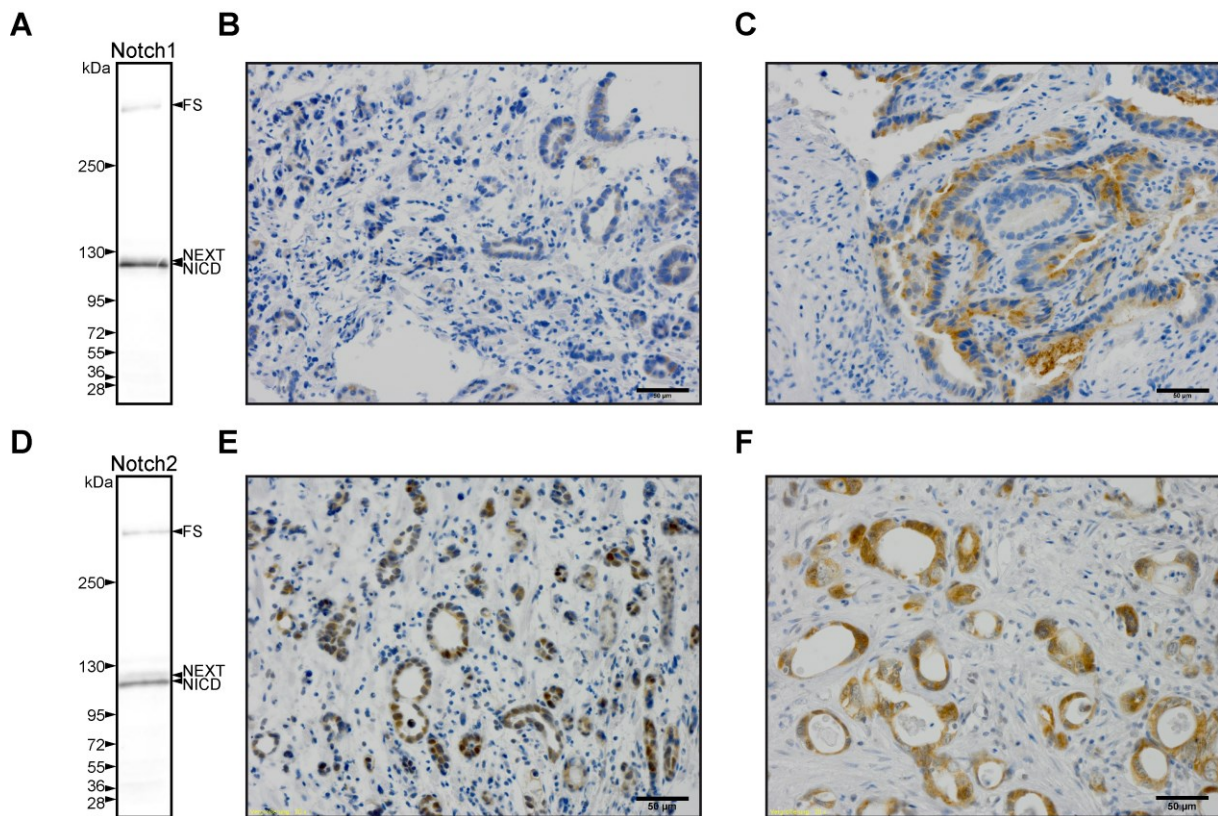
Eine signifikante Abnahme der Expression in Resektaten mit TRG3 gegenüber den zugehörigen Biopsien wurde für *CCND1* ( $p=0,007$ ), *JAG1* ( $p=0,026$ ), *HES1* ( $p=0,007$ ), *NOTCH1* ( $p=0,001$ ) und *DNMT1* ( $p=0,007$ ) festgestellt. In den Resektaten mit TRG2 waren *DNMT1* signifikant ( $p=0,009$ ) sowie *JAG1* ( $p=0,067$ ), *HES1* ( $p=0,050$ ) und *NOTCH1* ( $p=0,072$ ) moderat geringer exprimiert als in den zugehörigen Biopsien (Tab. 43).

Die Expression von *GSK3B*, *CTNNB1*, *OLFM4* und *ABCG2* war in keiner Patientengruppe nach der Chemotherapie signifikant verändert, obwohl die Expression dieser Gene mit dem Überleben der Patienten assoziiert war.



### 3.2 Immunhistochemischer Nachweis der Notch1- und Notch2-Expression

Um zu überprüfen, ob die prognostische Bedeutung der *NOTCH2*-Expression nach der Chemotherapie und die Veränderungen der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression zwischen den prätherapeutischen Biopsien und posttherapeutischen Resektaten auch auf der Proteinebene nachweisbar war, wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt.



**Abb. 12:** Antikörperspezifitätskontrolle im Western Blot und immunhistochemische Färbebeispiele für Notch1 und Notch2. **A)** Der Western Blot für Notch1 zeigt eine spezifische Bande bei etwa 300 kDa für das Gesamtlängenprotein (FS) und eine spezifische Doppelbande bei ca. 120 kDa für die Spaltprodukte NEXT (*Notch extracellular truncation*) und NICD (*Notch intracellular domain*). Die immunhistochemischen Färbebeispiele zeigen **B)** eine schwache zytoplasmatische Notch1-Färbung und **C)** eine mittlere Notch1-Färbung. **D)** Der Western Blot für Notch2 zeigt ebenfalls spezifische Banden für FS, NEXT und NICD. **E)** Schwache zytoplasmatische Notch2-Immunhistochemie mit teilweise starker Kernfärbung in einer Biopsie und **F)** eine starke zytoplasmatische Notch2-Färbung ohne Kernfärbung in dem zugehörigen Resektat.

Die Antikörper für die Immunhistochemie wurden im Western-Blot auf ihre Spezifität hin überprüft (Abb. 12A und D). Beide paralogspezifischen Antikörper anti-Notch1 (DSHB) und anti-Notch2 (DSHB) waren durch die jeweils im intrazellulären C-Terminus gelegenen Epitope geeignet, um sowohl das jeweilige Gesamtlängenprotein (*full size* FS, ca. 300 kDa) sowie die intrazellulären Spaltprodukte der aktivierten Rezeptoren (*Notch extracellular truncation* (NEXT) und *Notch intracellular domain* (NICD), beide ca. 120 kDa) zu detektieren.

Beispiele für die immunhistochemischen Färbungen mit den entsprechenden Antikörpern sind in Abb. 12 dargestellt. Die Färbung von Notch1 und Notch2 war spezifisch für Tumorzellen und normale Epithelgewebe. Beide Proteine waren hauptsächlich im Zytoplasma der Tumorzellen nachweisbar und zeigten keine erkennbare membranständige Färbung. Notch2 trat zudem nukleär lokalisiert auf, während in keinem der untersuchten Tumoren Notch1 im Zellkern nachweisbar war.

### 3.2.1 Vergleichende Analysen der Notch1- und Notch2-Proteinexpression zwischen korrespondierenden Biopsien und Resektaten

Um die Veränderungen der Expression zwischen Biopsie und Resektat auf der Proteinebene zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen für Notch1 und Notch2 durchgeführt. Diese Versuche sollten weitere Hinweise geben, ob es sich bei den beobachteten Expressionsveränderungen möglicherweise um eine Anreicherung von bestimmten Tumorzellen handelte.

Zusätzlich zu den Tumorproben mit TRG2 und TRG3 konnten mit der Immunhistochemie auch prätherapeutische Biopsien und posttherapeutische Resektate von Tumoren mit TRG1b untersucht werden. Diese waren aufgrund der geringen Mengen an residualen Tumorzellen nicht für die hier durchgeführte mRNA-Isolation geeignet und konnten daher nicht mit den qRT-PCR-Methoden analysiert werden. Als Vergleichskollektiv diente eine nicht chemotherapierte Kontrollgruppe von 16 primär resezierten Magenkarzinomen mit den zugehörigen Biopsien.

**Tab. 44:** Vergleich der immunhistochemischen Färbung von Notch1 in korrespondierenden prä- und posttherapeutischen Tumorproben.

Kategorie	Variable	p-Werte der Veränderung der Notch1-Färbung <sup>1</sup>			
		Kontrolle (n=16)	TRG1b (n=21)	TRG2 (n=21)	TRG3 (n=22)
Zytoplasma	% Tumorzellen <sup>2</sup>	1,000	0,593	0,273	0,873
	Färbeintensität	0,719	0,948	0,435	0,135
	IRS	0,877	0,339	0,959	0,776

<sup>1</sup> Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests (exakte zweiseitige Signifikanz) der Veränderung der Färbung in dem Resektat gegen die Biopsie, <sup>2</sup> Anteil der Tumorzellen mit der stärksten Färbung in der Probe, **IRS**: Immunreaktivitätsscore, gebildet durch Multiplikation der Einzelbewertungen für Intensität und prozentualen Anteil, **TRG**: Tumorregressionsgrad

Die zytoplasmatische Färbeintensität von Notch1 und der Anteil gefärbter Tumorzellen war in keinem der untersuchten Patientenkollektive (Kontrolle, TRG1b, TRG2 und TRG3) zwischen

prä- und posttherapeutischen Tumorproben signifikant verändert. Ebenso wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Immunreaktivitätsscore (IRS) gefunden, der sich aus der Kombination der Bewertungen für Anteil und Intensität zusammensetzte (Tab. 44).

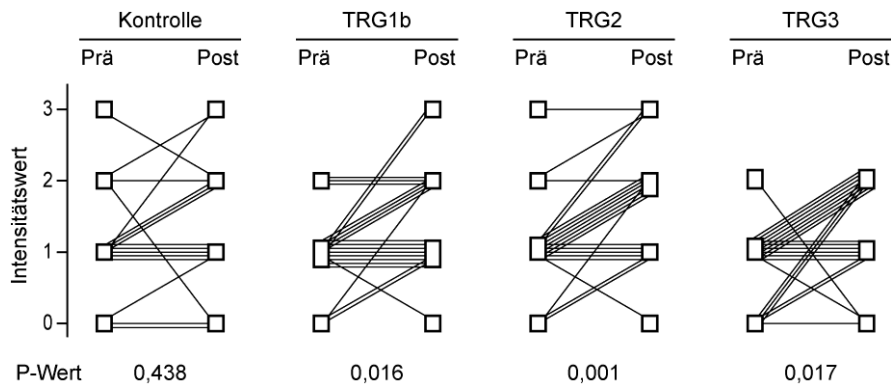
**Tab. 45: Vergleich der immunhistochemische Färbung von Notch2 in korrespondierenden prä- und posttherapeutischen Tumorproben.**

		p-Werte der Veränderung der Notch2-Färbung <sup>1</sup>				
Kategorie	Variable	Kontrolle (n=16)	TRG1b (n=21)	TRG2 (n=21)	TRG3 (n=22)	Änderung <sup>2</sup>
Zytoplasma	% Tumorzellen <sup>3</sup>	0,313	0,293	0,088	0,968	keine
	Färbeintensität	0,438	0,016	0,001	0,017	Zunahme
	IRS	0,947	0,014	0,237	0,112	Zunahme
Nukleus	% Tumorzellen <sup>3</sup>	0,001	0,005	<0,001	0,003	Abnahme
	Färbeintensität	0,016	0,542	0,007	0,015	Abnahme
	IRS	0,001	0,027	0,002	0,001	Abnahme

<sup>1</sup>Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests (exakte zweiseitige Signifikanz) der Veränderung der Färbung in dem Resektat gegen die Biopsie, <sup>2</sup>Tendenz der Expressionsveränderung von der Biopsie zum Resektat bei signifikanten Unterschieden, <sup>3</sup>Anteil der Tumorzellen mit der stärksten Färbung in der Probe, **IRS**: Immunreaktivitätsscore, gebildet durch Multiplikation der Einzelbewertungen für Intensität und prozentualen Anteil, **TRG**: Tumorregressionsgrad

Bezüglich der Färbung für Notch2 ergab sich eine signifikante Reduktion der Färbbarkeit der Zellkerne in den Resektaten gegenüber den Biopsien. Sowohl der Anteil, als auch Intensität und der IRS der Zellkernfärbung war reduziert. Diese Beobachtung war jedoch nicht auf die chemotherapierten Patienten beschränkt, sondern war auch in der Kontrollgruppe nachzuvollziehen (Tab. 45).

Der Anteil der Tumorzellen mit Notch2-positivem Zytoplasma war in den posttherapeutischen Resektaten nicht signifikant gegenüber den zugehörigen Biopsien verändert. Die zytoplasmatische Färbeintensität für Notch2 veränderte sich dagegen chemotherapieabhängig. Die Intensität der Färbung war in den Resektaten der Patientengruppen mit TRG1b, TRG2 und TRG3 signifikant erhöht (p=0,017, 0,001 und 0,016) jedoch nicht in der Kontrollgruppe (p=0,438) (Tab. 45 und Abb. 13).

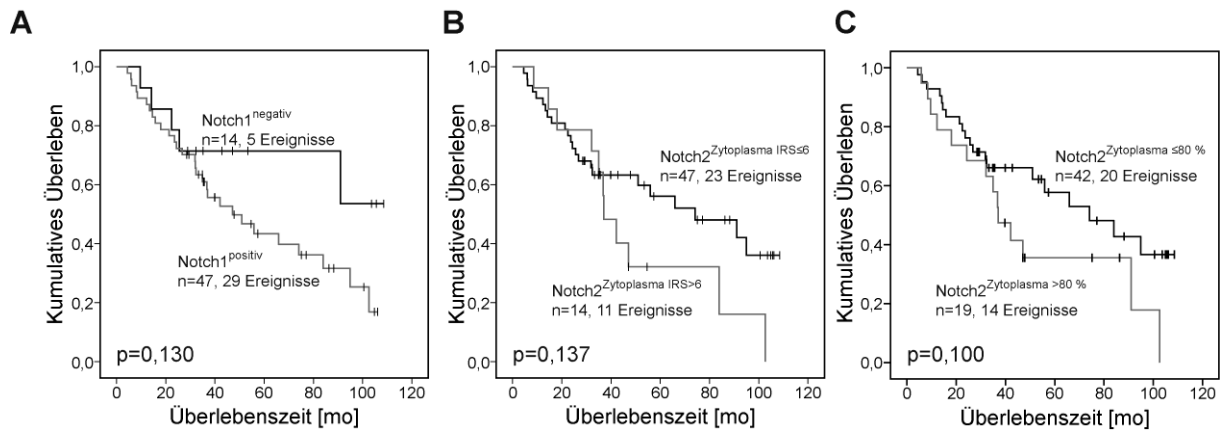


**Abb. 13:** Expressionsveränderung von Notch2 zwischen zusammengehörenden prä- und post-therapeutischen Tumorproben. Dargestellt sind die Werte der zytoplasmatischen Färbeintensität (0=negativ, 1=schwach, 2=mittel, 3=stark). Jede Linie repräsentiert den Expressionsverlauf einer Probe und verbindet den Intensitätswert der Biopsie (Prä) mit dem Intensitätswert des zugehörigen Resektats (Post). Die p-Werte wurden mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests (exakte zweiseitige Signifikanz) ermittelt.

### 3.2.2 Notch1- und Notch2-Proteinexpression und Überleben

Weiterhin wurden auch die Tumorsektate mit TRG2, an denen das initiale Genexpressionscreening durchgeführt wurde, für Notch1 und Notch2 gefärbt, um Zusammenhänge zwischen der Proteinexpression und dem Gesamtüberleben zu untersuchen. Von den 61 Tumoren zeigten 14 keine zytoplasmatische Färbung für Notch1 und alle 61 waren negativ für nukleär lokalisiertes Notch1. Notch2 war in zwei Fällen nicht im Zytoplasma und in 17 Fällen nicht im Zellkern nachweisbar (Tab. 46).

Für die Analyse der Assoziation zwischen der Proteinexpression und dem Gesamtüberleben wurden verschiedene Grenzwerte für die immunhistochemisch ermittelten Expressionswerte (Anteil gefärbter Tumorzellen, Färbeintensität, IRS) für die Einteilung der Patienten in zwei Gruppen (hoch und niedrig exprimierend) genutzt. Keiner der überprüften Grenzwerte führte zu einer signifikanten Unterscheidung der Patientengruppen bezüglich des Überlebens. Die deutlichste Assoziation zwischen der Notch1-Expression und dem Überleben deutete sich bei der Einteilung der Patienten in Notch1<sup>negativ</sup> (Intensität=0 und Anteil=0 %, n=14) oder Notch1<sup>positiv</sup> (n=47, p=0,130) an, mit besserem Überleben für die Notch1<sup>negativ</sup>-Patienten (Abb. 14A). Bezüglich der Notch2-Färbung hatten die Patienten mit einem zytoplasmatischen IRS $\leq$ 6 beziehungsweise mit einem prozentualen Anteil gefärbter Zellen unter 80 % ein etwas besseres Gesamtüberleben (p=0,137 und 0,100) (Abb. 14B und C).



**Abb. 14:** Zusammenhang der Notch1- und Notch2-Proteinexpression mit dem Überleben der Patienten. **A)** Kaplan-Meier-Kurve der Patienten mit Tumoren mit TRG2, eingeteilt nach globaler Notch1-Proteinexpression (immunhistochemisch positiv versus negativ). **B)** Die gleichen Patienten eingeteilt nach dem IRS für die zytoplasmatische Notch2-Färbung (IRS≤6 versus IRS>6). **C)** Einteilung nach dem Prozentsatz der zytoplasmatisch Notch2-positiven Zellen (>80 % versus ≤80 %). n=61, p-Werte wurden mit Log-Rang-Tests ermittelt.

**Tab. 46:** Übersicht über die immunhistochemische Färbung von Notch1 und Notch2 in Tumorresektaten mit TRG2 (n=61)

Parameter	Klassifizierung	Notch1-Färbung [n]		Notch2-Färbung [n]	
		Zytoplasma	Zellkern	Zytoplasma	Zellkern
Intensität	negativ	14	61	2	17
	schwach	20	0	20	14
	mittel	15	0	27	16
	stark	12	0	12	14
% Tumorzellen <sup>1</sup>	0	14	61	2	17
	< 10	23	0	9	24
	10 - 50	15	0	18	9
	> 50 - 80	5	0	13	8
	> 80	4	0	19	3
IRS	0	14	61	2	17
	1	8	0	4	10
	2	16	0	7	12
	3	7	0	5	6
	4	8	0	19	2
	6	6	0	10	8
	8	0	0	8	1
	9	2	0	4	3
	12	0	0	2	2

<sup>1</sup>Bezogen auf die Zellen mit der größten Färbintensität, **IRS**: Immunreaktivitätsscore, gebildet durch Multiplikation der Einzelbewertungen für Intensität und prozentualen Anteil.

### 3.2.3 Notch1- und Notch2-Proteinexpression und klinisch-pathologische Parameter

Die Analyse der Assoziation zwischen der Proteinexpression von Notch1 und Notch2 und den klinisch-pathologischen Parametern in den Tumorsektaten mit TRG2 (n=61) erfolgte ebenfalls durch Dichotomisierung der Patienten in je zwei Gruppen anhand verschiedener Grenzwerte für die immunhistochemische Färbung (Anteil gefärbter Tumorzellen, Färbeintensität, IRS).

Ein hoher Immunreaktivitätsscore (IRS) der zytoplasmatischen Notch1-Färbung war signifikant mit einer geringeren lokalen Tumorausdehnung assoziiert (p=0,015) (Tab. 47).

**Tab. 47: Assoziation der Proteinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern**

Protein	Parameter	Grenzwert <sup>1</sup>	Anzahl der Patienten		p <sup>2</sup>
			ypT0 bis ypT2	ypT3 und ypT4	
Notch1	Zytoplasma IRS	< 3	24	14	0,015
		≥ 3	21	2	
Notch2	Zytoplasma IRS	< 6	24	13	0,050
		≥ 6	21	3	
Notch2	Zytoplasma Färbeintensität	< 2	13	9	0,050
		≥ 2	32	7	
			ypN0	ypN1	
Notch2	Zytoplasma % gefärbte Tumorzellen	< 50	24	14	0,040 *
		≥ 50	21	2	
			ypM0	ypM1	
Notch2	Zytoplasma IRS	< 3	7	6	0,008 *
		≥ 3	43	5	
Notch2	Zytoplasma % gefärbte Tumorzellen	< 10	6	5	0,020 *
		≥ 10	44	6	
			Intestinal	Nichtintestinal	
Notch2	Zellkern % gefärbte Tumorzellen	< 10	20	21	0,031
		≥ 10	4	16	

<sup>1</sup>Bezogen auf die numerische Bewertung der Färbeintensität und des Immunreaktivitätsscores (IRS) beziehungsweise auf den prozentualen Anteil gefärbter Tumorzellen, <sup>2</sup> $\chi^2$ -Test mit Freiheitsgrad 1, asymptotische Signifikanz (zweiseitig) nach Pearson, mit \* gekennzeichnete Werte: exakte Signifikanz (zweiseitig) nach Fischer

Ein höherer zytoplasmatischer IRS für Notch2 war signifikant mit einem negativen Fernmetastasenstatus assoziiert (p=0,008). Auch hatten Tumoren mit stärkerer Notch2-

Färbung oder größerem Anteil Notch2-positiver Zellen tendenziell eine geringere lokale Tumorausdehnung, keine Lymphknotenmetastasen und entsprachen vermehrt einem nicht-intestinalen histologischen Subtyp (Tab. 47).

### 3.2.4 Korrelation der mRNA- und Proteinexpression

Die RNA-Expressionsdaten für *NOTCH1* und *NOTCH2* der Tumoren mit TRG2 wurden auf mögliche Korrelationen mit der jeweiligen Proteinexpression untersucht (n=61). In der Spearman-Rho-Regressionsanalyse ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen der mRNA-Expression und der immunhistochemisch quantifizierten Proteinexpression von Notch2 (Tab. 48).

Zwischen der mRNA-Expression von *NOTCH1* und der Notch1-Proteinexpression zeigte sich eine schwach-positive Korrelation zwischen der mRNA-Expression und dem Anteil gefärbter Zellen beziehungsweise dem IRS (Tab. 48).

Die gleichen Analysen in den zusammengehörenden Biopsien und Resektaten mit TRG2 und TRG3 ergaben ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression und der immunhistochemischen Färbung von Notch1 und Notch2.

In den Tumorsektaten mit TRG2 korrelierten die zytoplasmatischen Proteinexpressionen (IRS) von Notch1 und Notch2 signifikant ( $p=0,441$ ,  $p<0,001$ ).

**Tab. 48: Korrelation zwischen der Proteinexpression und der mRNA-Expression von Notch1 und Notch2 in Tumorsektaten mit TRG2**

Kategorie	Variable	Notch1		Notch2	
		Korrelationskoeffizient <sup>1</sup>	p	Korrelationskoeffizient <sup>1</sup>	p
Zytoplasma	% Tumorzellen <sup>2</sup>	0,257	0,045	0,163	0,209
	Färbeintensität	0,165	0,204	-0,170	0,191
	IRS	0,263	0,041	-0,051	0,697

<sup>1</sup>Spearman-Rho-Korrelation, <sup>2</sup>bezogen auf die Zellen mit der größten Färbeintensität, **IRS**: Immunreaktivitätsscore, gebildet durch Multiplikation der Einzelbewertungen für Intensität und prozentualen Anteil

### 3.3 Etablierung und Charakterisierung eines Tumorstammzellmodells aus Magenkarzinomzelllinien

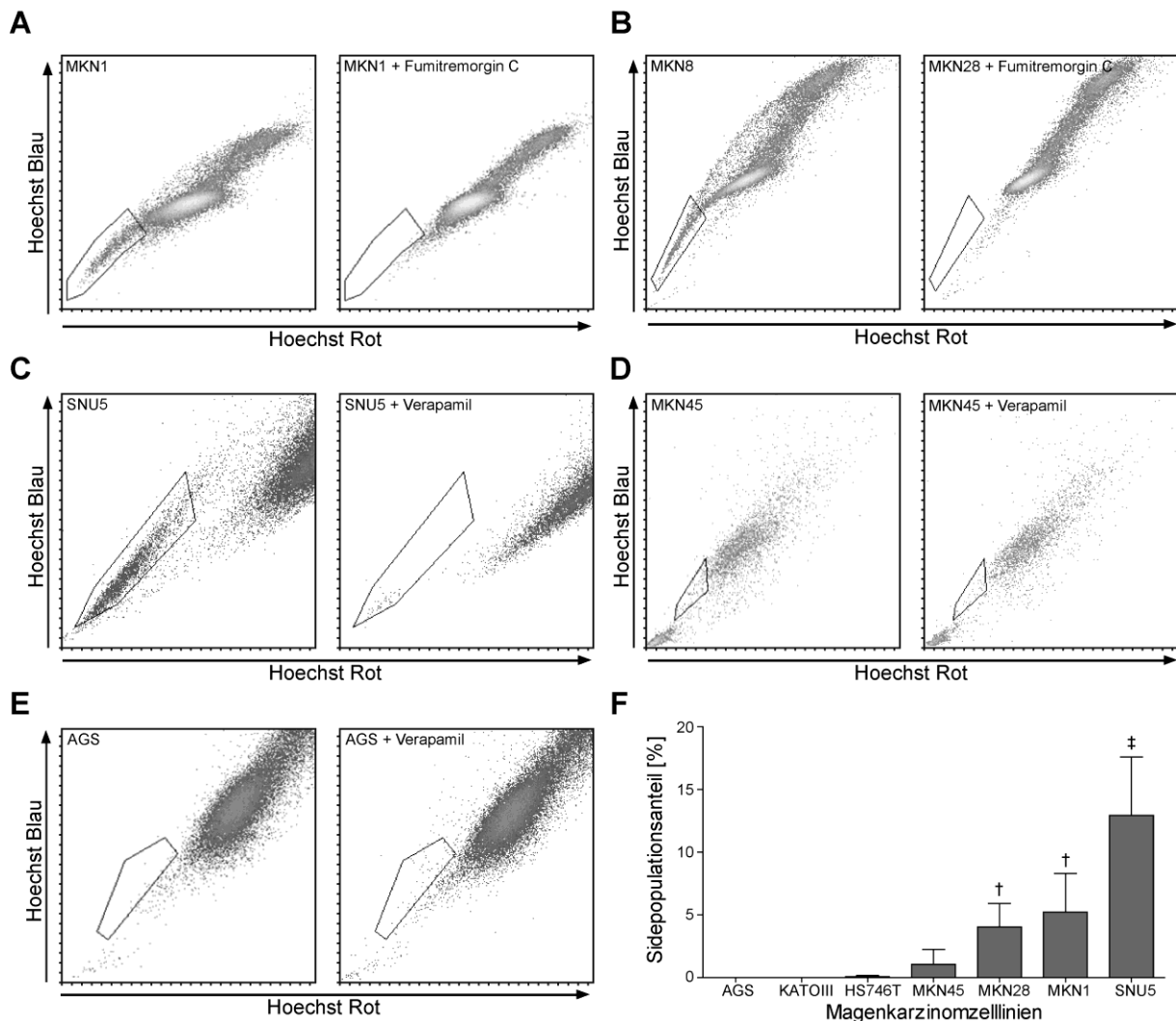
#### 3.3.1 *Side-populations*

Um ein *in vitro*-System zur Analyse von Tumorstammzellen beziehungsweise der tumorphysiologischen Relevanz von tumorstammzellassozierten Genen im Magenkarzinom zur Verfügung zu haben, wurde versucht ein geeignetes Zellkulturmodell zu etablieren.

*Side-populations* (SP) sind Subpopulationen von Zellen, die sowohl in Normalgeweben als auch in Tumoren und Zelllinien vorkommen können. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie aufgrund ihrer erhöhten ABC-Transporter-Aktivität in der Lage sind den DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff Hoechst33342 auszuschleusen. Durch Messung der Fluoreszenzen im FACS können die schwächeren und leicht in den blauen Fluoreszenzbereich verschobenen Signale der SP-Zellen von den nicht-SP-Zellen unterschieden werden und die beiden Zellpopulationen an geeigneten Geräten isoliert werden. Zur Kontrolle können die ABC-Transporter mit Inhibitoren wie Verapamil oder Fumitremorgin C gehemmt werden, wodurch die SP-Zellen die gleichen Fluoreszenzwerte wie die nicht-SP-Zellen annehmen. SP-Zellen sollen mit (Tumor-)Stammzellen angereichert sein. Daher wird die SP-Analyse sowohl für die Isolation von Tumorstammzellen, als auch zur Überprüfung der Anreicherung von Tumorstammzellen durch spezifische Marker eingesetzt<sup>(173)</sup>.

Zunächst wurden sieben Magenkarzinomzelllinien auf das Vorhandensein von SP-Zellen hin überprüft. Die Zelllinien AGS, HS746T und KatoIII wiesen keine SP auf. Bei den Zelllinien SNU5, MKN1, MKN28 und MKN45 hingegen wurden in der erwarteten Region der SP Signale im FACS registriert (Abb. 15). Dabei wurde das Protokoll für die Zelllinien MKN1, MKN28 und SNU5 so modifiziert (2 µg/ml Hoechst33342 für MKN1 und MKN28 beziehungsweise 10 µg/ml Hoechst33342 für SNU5), dass der Anteil der SP-Zellen bei etwa 5-10 % lag. Dies stellte einen Kompromiss zwischen einer stringenten Selektion der SP-Zellen und der Verfügbarkeit von genügend Zellen aus der Zellsortierung für anschließende Versuche dar.





**Abb. 15:** *Side-population*-Analysen an Magenkarzinomzelllinien. **A-E)** Repräsentative Dichtediagramme für die untersuchten Zelllinien ohne und mit Inhibitorbehandlung (Fumitremorgin C oder Verapamil); die eingezeichneten Regionen kennzeichnen die Lokalisation der *side-population* (SP). **A)** Die Zelllinie MKN1 hatte im Mittel  $5,2 \pm 3,1$  % SP. Die Zelllinien **B)** MKN28 und **C)** SNU5 wiesen ebenfalls größere SP-Anteile auf ( $4,0 \pm 1,9$  % und  $12,9 \pm 5,6$  %). **D)** Bei der Zelllinie MKN45 konnte keine klar definierte SP identifiziert werden. **E)** Die Zelllinie AGS wies keine SP auf. **F)** Mittlere SP-Anteile an der Gesamtzahl vitaler Zellen. KatoIII und HS746T wiesen keine SP auf. Mit † gekennzeichnete Zelllinien: 2  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst33342, ‡: 10  $\mu\text{g/ml}$ , andere: 5  $\mu\text{g/ml}$

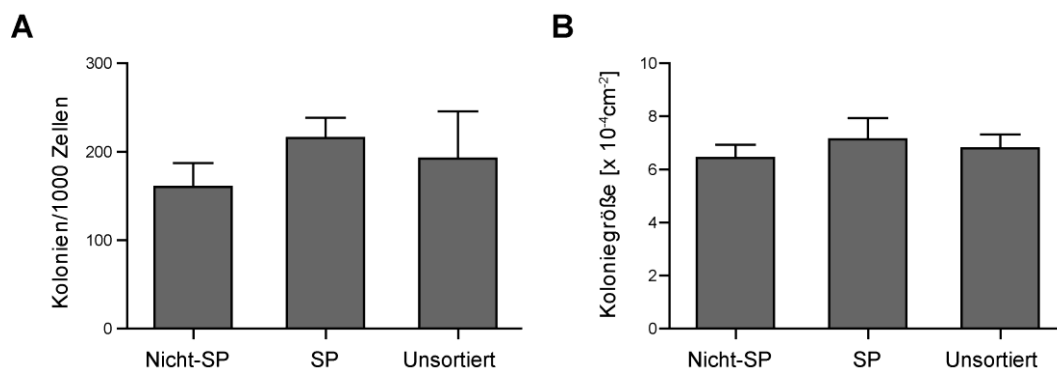
Für die Isolation und Charakterisierung der SP-Zellen wurden die Zelllinien MKN1 und SNU5 ausgewählt. Um die für Stammzellen wichtigen Parameter der Koloniebildung zu testen wurden die SP-Zellen von den nicht-SP-Zellen getrennt aufgefangen und bezüglich der Zellproliferation und Cisplatin sensitivität charakterisiert. Die Wachstumsgeschwindigkeiten der SP- und nicht-SP-Zellen unterschieden sich in beiden Zelllinien nicht (Tab. 49).

**Tab. 49: Mittlere Verdoppelungszeiten von SP- und nicht-SP-Zellen (n=3)**

	MKN1		SNU5	
	MW [h]	SA	MW [h]	SA
SP	40	2,1	36	2,3
Nicht-SP	39	1,1	35	6,0
p <sup>1</sup>	0,470		0,744	

<sup>1</sup> Student's t-Test, *MW*: Mittelwert aus drei unabhängigen XTT-Test-Zeitserien. Einzelwerte wurden jeweils im 2-Punkt-Verfahren aus Werten in der exponentiellen Wachstumsphase errechnet. *SA*: Standardabweichung, *SP*: *side-population*-Zellen.

Im Koloniebildungsassay der sortierten MKN1-Zellen bildete die SP-Fraktion mehr Kolonien als die nicht-SP-Fraktion (216±23 gegenüber 160±27, p=0,054). Im Vergleich dazu wiesen unsortierte Zellen, die ebenfalls mit dem Hoechst33342-Farbstoff inkubiert worden waren eine mittlere Koloniezahl von 193±53 auf, die zwischen denen der SP- und nicht-SP-Fraktionen lag. Die Koloniegrößen waren in beiden sortierten Fraktionen ähnlich (p=0,288) (Abb. 16). Mit der Zelllinie SNU5 konnte diese Form der Koloniebildungsassays aufgrund des semiadherenten Wachstums der Zelllinie nicht durchgeführt werden.

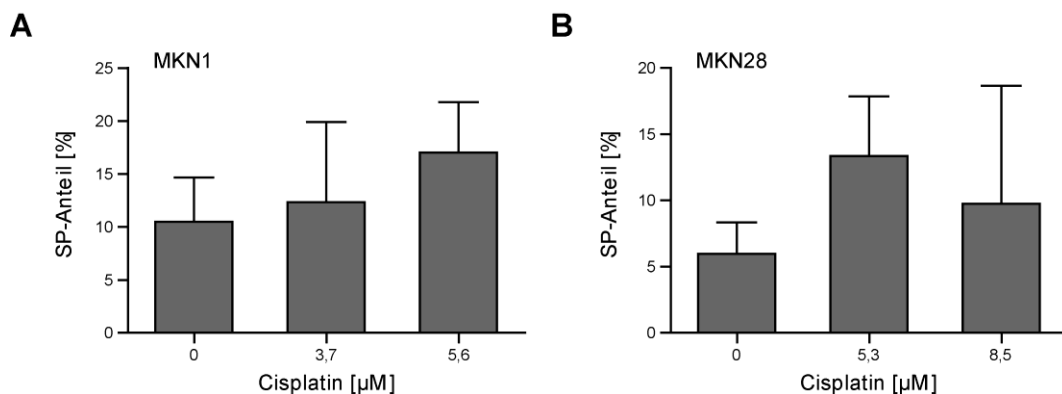


**Abb. 16: Koloniebildungsassay mit *side-population* (SP)-Zellen der Zelllinie MKN1 sowie nicht-SP-Zellen und unsortierten Zellen der gleichen Zelllinie.** Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen. **A)** Die SP-Fraktion bildete mehr Kolonien (216±23) je 1000 Zellen als die nicht-SP-Fraktion (160±27, p=0,054). Die unsortierten Zellen lagen dazwischen (193±53). **B)** Die Koloniegrößen war in beiden sortierten Fraktionen ähnlich (p=0,288).

Die Sensitivität der sortierten Fraktionen gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin wurde in zwei unabhängigen Versuchen mit der Zelllinie MKN1 untersucht. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den SP- und nicht-SP-Fraktionen festgestellt (IC<sub>50</sub>=4,5 µM für beide Fraktionen).

Als weitere, indirekte Methode zur Bestimmung der relativen Chemosensitivität der SP- und nicht-SP-Zellen wurde der Einfluss einer vorangegangenen Cisplatin-Behandlung auf den SP-Anteil untersucht. Dazu wurden die Zelllinien MKN1 und MKN28 eingesetzt und für 48 h mit der jeweiligen  $IC_{20}$ - beziehungsweise  $IC_{50}$ -Konzentration von Cisplatin behandelt. Die  $IC_{20}$ - und  $IC_{50}$ -Konzentrationen wurden für die Zelllinie MKN1 mit XTT-Tests ermittelt, während die Werte für die Zelllinie MKN28 von früheren Arbeiten in dieser Arbeitsgruppe übernommen wurden (MKN1: 3,7  $\mu$ M und 5,3  $\mu$ M, MKN28: 5,6  $\mu$ M und 8,5  $\mu$ M<sup>(174)</sup>).

Es zeigte sich ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg des SP-Anteils bei den MKN1-Zellen, welche mit der  $IC_{50}$ -Konzentration von Cisplatin behandelt wurden, von  $10,5 \pm 4,2$  % auf  $17 \pm 4,7$  % ( $p=0,148$ ) (Abb. 17A). Die Behandlung mit der  $IC_{20}$ -Konzentration führte zu einer schwächeren Erhöhung des SP-Anteils auf  $12,3 \pm 7,5$  %, die aufgrund der großen Streuung nicht signifikant von der Kontrolle zu unterscheiden war.



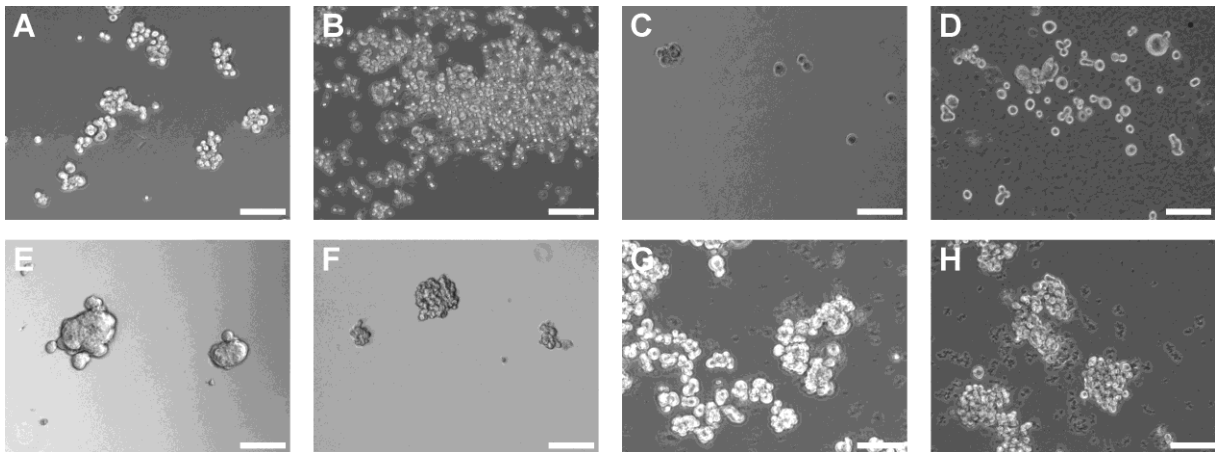
**Abb. 17:** *Side-populations (SP) in Zelllinien nach Cisplatinbehandlung.* A) MKN1 und B) MKN28 mit und ohne 48 h Vorbehandlung mit der  $IC_{20}$  beziehungsweise  $IC_{50}$ -Konzentration von Cisplatin. Dargestellt sind die mittleren SP-Anteile nach Korrektur durch die Fumitremorgin C-Kontrolle aus drei unabhängigen Versuchen.

Der SP-Anteil der Zelllinie MKN28 stieg nach Behandlung mit der  $IC_{20}$ -Konzentration ebenfalls von  $5,9 \pm 2,4$  % auf  $13,4 \pm 4,5$  % ( $p=0,065$ ) (Abb. 17B). Nach der Behandlung mit der  $IC_{50}$ -Konzentration war bei den MKN28-Zellen keine Veränderung des SP-Anteils feststellbar, da die Werte zu großen Schwankungen unterworfen waren ( $9,8 \pm 8,9$  %).

Die Isolation von SP-Zellen war sehr komplex und mit geringer Zellausbeute verbunden. Aufgrund der insgesamt zu geringen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beziehungsweise zu subtilen Unterschieden zwischen SP- und nicht-SP-Zellen wurden die SP-Analysen eingestellt.

### 3.3.2 Tumorsphäroide

Die Bildung sphäroidartiger Kolonien unter nichtadhärenten Kulturbedingungen in serumfreiem Medium wurde als weiteres mögliches Tumorstammzellmodell untersucht. Es wurden sechs Magenkarzinomzelllinien auf Sphäroidbildung untersucht (AGS, HS746T, KatoIII, MKN1, MKN28 und MKN45). Die Kulturbedingungen wurden zunächst aus Ji et al. (2008) übernommen<sup>(161)</sup>. Nach 7 d waren bei den Zelllinien MKN28 und MKN45 sphäroidartige Strukturen zu erkennen. Die übrigen Zelllinien zeigten nur sehr lockere Zellverbände oder Einzelzellen. Im Vergleich mit den in Normalmedium kultivierten Zellen waren die Kolonien von MKN28 und MKN45 im Stammzellmedium (SZM) kompakter. Besonders die MKN28-Sphäroide wiesen eine sehr glatte Oberfläche auf, welche keine sichtbaren Zellbegrenzungen aufwies. Die sphäroidartigen Kolonien der Zelllinie MKN45 waren dagegen lockerer, mit einer weniger scharf begrenzten Oberfläche und ähnlich den Kolonien im Normalmedium (Abb. 18).



**Abb. 18:** Beispielbilder für das Wachstumsverhalten verschiedener Magenkarzinomzelllinien unter nichtadhärenten Wachstumsbedingungen A-F) in serumfreiem Stammzellmedium (SZM) und G-H) in DMEM-Vollmedium (10 % FKS) nach 7 d Inkubation. A) KatoIII, B) AGS, C) MKN1 und D) HS746T wachsen als Einzelzellen oder sehr lockere Verbände, E) MKN28 und F) MKN45 bilden sphäroidartige Kolonien. Die Kolonien von MKN28 sind glattflächig ohne erkennbare Zellgrenzen und bis ca. 250 µm groß. Die Kolonien von MKN45 sind traubenartig organisiert mit deutlich abgrenzbaren Zellen und unregelmäßiger Oberfläche. G) MKN28 und H) MKN45 zeigen in serumhaltigem Medium nur lockere Zellverbände. Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

Da die Sphäroidbildung der Zelllinie MKN28 auch in Medium mit niedrigerer Wachstumsfaktorkonzentration (10 ng/ml bFGF und 20 ng/ml EGF) wie sie von Takaishi et al. (2009) eingesetzt wurde unverändert vorlag ( $3,0 \pm 0,5$  % Sphäroidbildungseffizienz gegenüber  $2,8 \pm 0,5$  %), wurde diese Zusammensetzung anschließend weiterverwendet<sup>(76)</sup>. Die Zugabe von 1 beziehungsweise 2 µM Cisplatin zu den Zellen bei Aussaat der Sphäroide hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Sphäroidbildung. Die Sphäroidbildungseffizienz betrug für die unbehandelten Zellen  $3,0 \pm 0,5$  % und für die mit Cisplatin behandelten Zellen  $2,9 \pm 0,3$  % beziehungsweise  $2,9 \pm 0,1$  %.

### 3.4 Herunterregulation der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression in Magenkarzinomzelllinien

Die vorangegangenen Untersuchungen an neoadjuvant chemotherapierten Magenkarzinomen zeigten, dass eine hohe Expression von *NOTCH2* im Residualtumor mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einhergeht, die Expression von *NOTCH2* in den untersuchten Residualtumoren im Vergleich mit den zugehörigen Biopsien nach neoadjuvanter Chemotherapie erhöht ist und sich die Expression von *NOTCH1* in diesem Zusammenhang entgegengesetzt zur *NOTCH2*-Expression verhält.

Um einen möglichen funktionellen Zusammenhang der Chemosensitivität mit der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression näher zu charakterisieren wurden in *Knockdown*-Experimenten mittels RNA-Interferenz in den Zelllinie MKN28 und AGS die Expression von *NOTCH1* und *NOTCH2* auf mRNA-Ebene herunterreguliert. Dabei wurden für jedes Gen zwei verschiedene shRNA-Konstrukte eingesetzt (Tab. 11). Zur besseren Unterscheidung erhalten die entsprechenden Zelllinien mit *NOTCH1-Knockdown* (Konstrukte SH59 und SH62) in dieser Arbeit die Suffixe -N1<sup>59</sup> und -N1<sup>62</sup> und diejenigen mit *NOTCH2-Knockdown* (SH94 und SH95) die Suffixe -N2<sup>94</sup> und -N2<sup>95</sup>. Die jeweilige Kontrollzelllinie mit dem unspezifischen shRNA-Konstrukt (SHC002) erhält das Suffix -Kon.

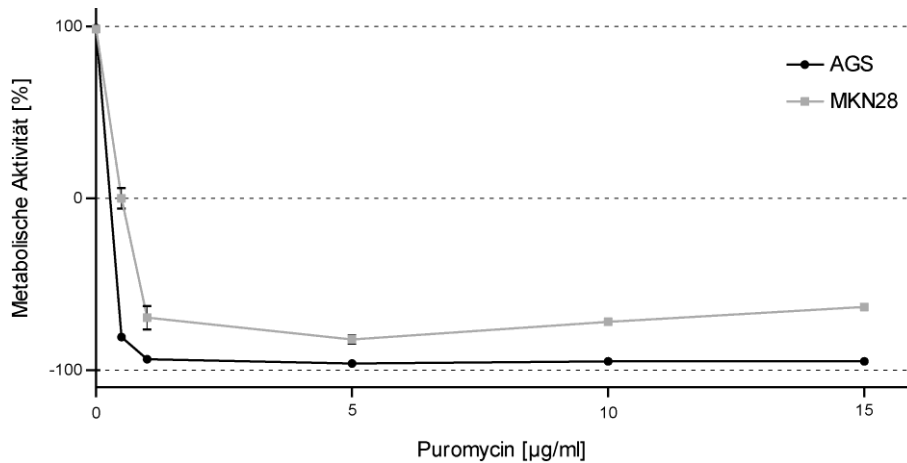
#### 3.4.1 Feststellung der intrinsischen Puromycinresistenz

Die hier eingesetzte lentivirale Transfektion führt zu der Insertion eines shRNA-Konstrukts sowie eines Puromycin-Resistenzgens in das Genom der Zielzellen. Erfolgreich transfizierte Zellen konnten daher auch in Gegenwart des Nukleosidanalogons Puromycin proliferieren und somit selektiert werden<sup>(175)</sup>.

Um zu untersuchen, bei welchen Konzentrationen die nichttransfizierten Zellen durch das zugegebene Puromycin getötet werden, wurden XTT-Tests mit zunehmenden Puromycin-konzentrationen durchgeführt. Dabei zeigte sich für die Zelllinie MKN28 die maximale Wirkung bei einer Konzentration von 5 µg/ml über 48 h (-82 % metabolische Aktivität) und für die Zelllinie AGS bereits bei 1 µg/ml über 48 h (-94 % metabolische Aktivität) (Abb. 19).

Zusätzlich wurde eine mikroskopische Begutachtung der behandelten Zelllinien durchgeführt. Diese zeigte, dass nach 48 h Behandlung mit 5 µg/ml Puromycin weniger als 10 % der Zellen morphologisch intakt waren, bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle.

Die Dosis für die 10-tägige Selektion von puromycinresistenten, transfizierten Zellen („*bulk selection*“) wurde aufgrund dieser Ergebnisse auf 2,5 µg/ml festgelegt. Als Erhaltungsdosis für die anschließende dauerhafte Kultivierung wurde 1 µg/ml Puromycin festgelegt.



**Abb. 19:** Dosis-Wirkungs-Kurven der Puromycinbehandlung von nativen MKN28- und AGS-Zellen. Dargestellt sind die gemittelten Kurven aus je zwei Versuchen mit 48 h Puromycinbehandlung. Die minimale metabolische Aktivität für MKN28 wird bei Behandlung mit 5 µg/ml Puromycin erreicht. Die Zelllinie AGS erreicht eine minimale metabolische Aktivität bei 1 µg/ml Puromycin.

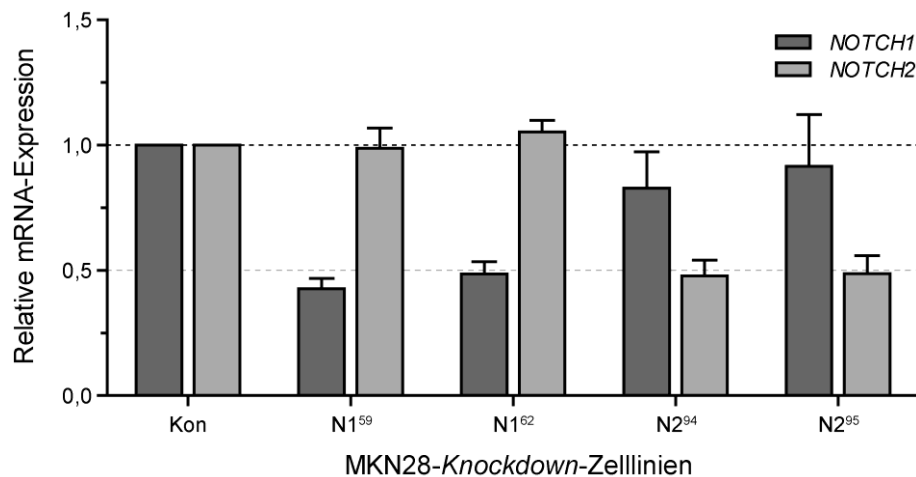
### 3.4.2 Überprüfung der *Knockdown*-Effizienz

#### 3.4.2.1 Nachweis der Genexpression mittels qRT-PCR

Um den Erfolg des *Knockdowns* zu kontrollieren und im Verlauf der Kultivierung der Zellen zu überwachen, wurde regelmäßig Gesamt-RNA extrahiert und die *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression mittels qRT-PCR überprüft.

##### 3.4.2.1.1 mRNA-Expression der MKN28-*Knockdown*-Zellen

In den *NOTCH1-Knockdown*-Zelllinien MKN28-N1<sup>59</sup> und MKN28-N1<sup>62</sup> war die *NOTCH1*-Expression auf 43±4 % beziehungsweise 49±5 % gegenüber der MKN28-Kon reduziert (n=8). Die *NOTCH2*-Expression war in diesen Zelllinien gegenüber der Kontrolle nahezu unverändert (99±8 % und 105±5 %). Die *NOTCH2*-Expression in den *NOTCH2-Knockdown*-Zelllinien MKN28-N2<sup>94</sup> und MKN28-N2<sup>95</sup> war auf 48±6 % beziehungsweise 49±7 % reduziert. Die *NOTCH1*-Expression in diesen Zelllinien war weniger stabil (83±14 % und 92±21 %) (Abb. 20).



**Abb. 20:** Expression von *NOTCH1* und *NOTCH2* in den MKN28-Knockdown-Zelllinien MKN28-N1<sup>59</sup> und MKN28-N1<sup>62</sup> (*NOTCH1-Knockdown*) sowie MKN28-N2<sup>94</sup> und MKN28-N2<sup>95</sup> (*NOTCH2-Knockdown*). Dargestellt sind die mittels qRT-PCR gemessenen mittleren Expressionswerte und Standardabweichungen von acht Messungen, welche im Verlauf der Kultivierung zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden.

#### 3.4.2.1.2 mRNA-Expression der AGS-Knockdown-Zellen

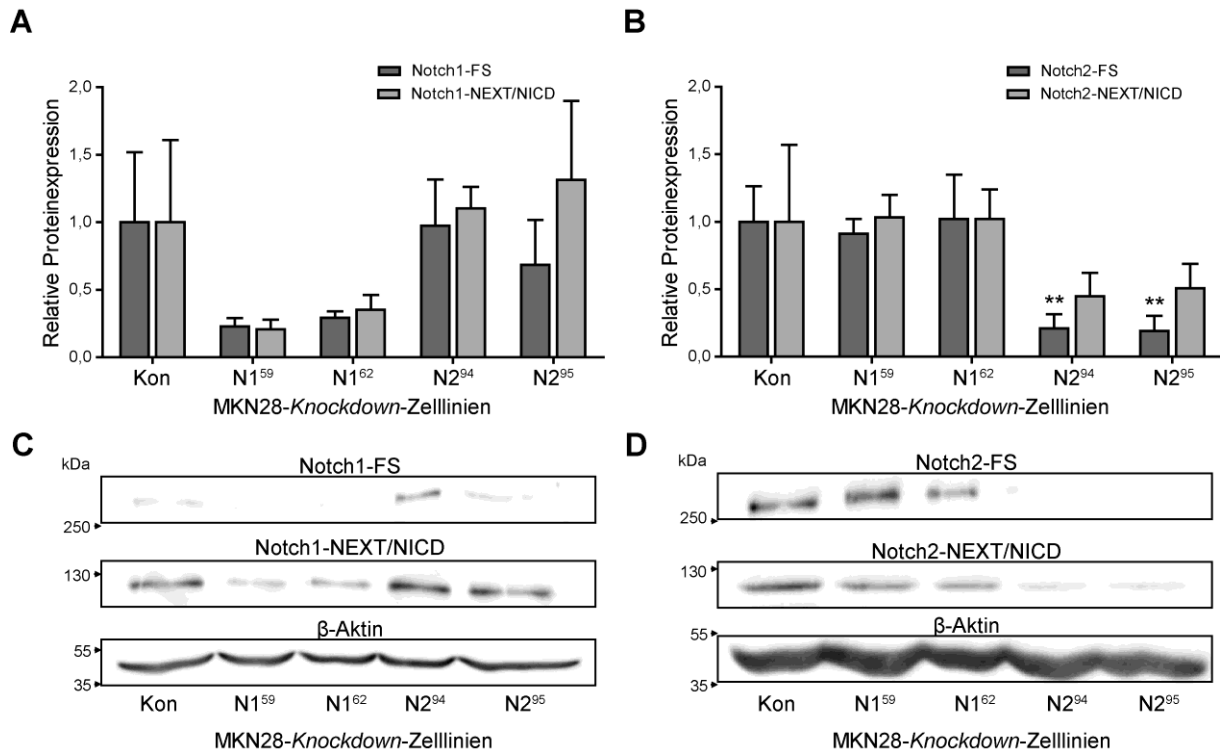
In den *NOTCH1-Knockdown*-Zelllinien AGS-N1<sup>59</sup> und AGS-N1<sup>62</sup> wurden relative *NOTCH1*-Expressionwerte von 54 und 78 % gemessen. Gleichzeitig betrug die *NOTCH2*-Expression in diesen Zelllinien 143 beziehungsweise 120 % gegenüber der Kontrollzelllinie AGS-Kon (n=1). Die *NOTCH2*-Expression in den *Knockdown*-Zelllinien AGS-N2<sup>94</sup> und AGS-N2<sup>95</sup> war mit 99 beziehungsweise 85 % Restaktivität gegenüber AGS-Kon nahezu unverändert. Die *NOTCH1*-Expression dieser Zellen war ebenfalls unverändert (108 und 103 %, n=1).

Aufgrund der fehlenden Effektivität des *NOTCH2-Knockdowns* und des schwachen *NOTCH1-Knockdowns* in Verbindung mit steigender *NOTCH2*-Expression wurden die AGS-Knockdown-Zelllinien nicht weiterverwendet.

#### 3.4.2.2 Nachweis der Proteinexpression mittels Western-Blot

Neben dem Nachweis der Expressionsreduktion auf der mRNA-Ebene wurde in den MKN28-Zellen die *Knockdown*-Effizienz auch mittels Western-Blot-Verfahren auf der Proteinebene überprüft (Abb. 21).

Die Expression von Notch2-FS (*full size*) war in beiden *NOTCH2-Knockdown*-Zelllinien signifikant auf 21±11 % (MKN28-N2<sup>94</sup>) beziehungsweise 19±11 % (MKN28-N2<sup>95</sup>) reduziert (jeweils p=0,001, Abb. 21B und D). Eine Reduktion der aktivierten Notch-Proteine NEXT (*Notch extracellular truncation*) und NICD (*Notch intracellular domain*) war ebenfalls zu erkennen, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (p=0,114 und p=0,151).



**Abb. 21: Relative Notch1- und Notch2-Proteinexpression in MKN28-Knockdown-Zelllinien (Western-Blot).** **A)** Notch1-Proteinexpression normalisiert mittels  $\beta$ -Aktin und bezogen auf MKN28-Kon. **B)** Notch2-Proteinexpression normalisiert mittels  $\beta$ -Aktin und bezogen auf MKN28-Kon. Dunkle Säulen repräsentieren jeweils die Expression des ungespaltenen Notch-Rezeptors (FS, *full size*), helle Säulen stehen für die kombinierte Expression der gespaltenen (aktivierten) Notch-Proteine (NEXT, *Notch extracellular truncation* und NICD, *Notch intracellular domain*). **C)** und **D)** Repräsentative Western-Blots für Notch1 und Notch2 (Notch-FS bei ca. 300 kDa, NEXT/NICD bei ca. 120 kDa) sowie  $\beta$ -Aktin (ca. 40 kDa). **Kon:** Kontrolle, **N1<sup>59/62</sup>:** *NOTCH1-Knockdown* **N2<sup>94/95</sup>:** *NOTCH2-Knockdown*, \*\*  $p=0,001$ , Student's t-Test,  $n=3$

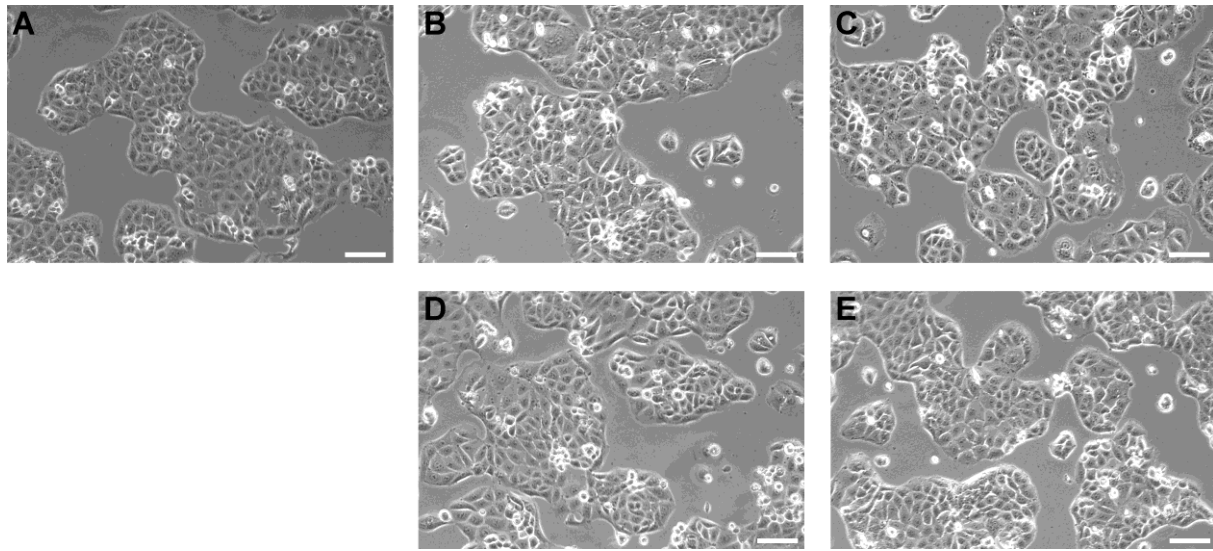
Die Expression von Notch1-FS und NEXT/NICD war in beiden *NOTCH1-Knockdown-Zelllinien* gegenüber der *Knockdown-Kontrolle* deutlich reduziert (MKN28-N1<sup>59</sup>: 23±6 % und 21±7 %, MKN28-N1<sup>62</sup>: 29±5 % und 35±11 %) (Abb. 21A und C).



### 3.4.3 Auswirkungen der Herunterregulation der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression auf MKN28-Magenkarzinomzellen

#### 3.4.3.1 Auswirkungen auf die Morphologie und das Wachstum

Es wurden keine morphologischen Veränderungen der MKN28 *NOTCH1*- und *NOTCH2*-*Knockdown*-Zellen im Vergleich mit der Kontrollzelllinie festgestellt (Abb. 22).



**Abb. 22:** Vergleich der Morphologie von MKN28-*Knockdown*-Zelllinien. **A)** Das Wachstumsmuster der Kontrollzelllinie MKN28-Kon unterscheidet sich nicht von **B)** den *NOTCH1*-*Knockdown*-Zelllinien MKN28-N1<sup>59</sup> und **C)** MKN28-N1<sup>62</sup>, sowie von **D)** den *NOTCH2*-*Knockdown*-Zelllinien MKN28-N2<sup>94</sup> und **E)** MKN28-N2<sup>95</sup>. Maßstabsbalken=200  $\mu$ m

Weiterhin ergaben sich in den XTT-basierten Untersuchungen der Kolonieverdoppelungszeiten keine signifikanten Unterschiede in den Wachstumsgeschwindigkeiten zwischen den *Knockdown*-Zelllinien (Tab. 50).

**Tab. 50:** Mittlere Kolonieverdoppelungszeiten von MKN28-*Knockdown*-Zelllinien

	Kolonieverdoppelungszeit		
	MW [h]	SA	p <sup>1</sup>
MKN28-Kon	26,1	1,5	
MKN28-N1 <sup>59</sup>	26,6	2,7	0,793
MKN28-N1 <sup>62</sup>	25,1	0,5	0,347
MKN28-N2 <sup>94</sup>	24,9	2,2	0,488
MKN28-N2 <sup>95</sup>	24,9	2,4	0,489

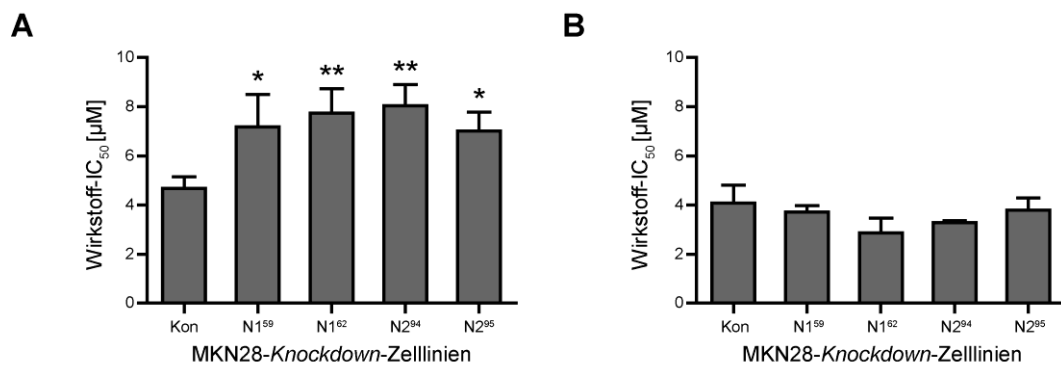
<sup>1</sup> Student's t-Test gegen MKN28-Kon, *MW*: Mittelwert aus drei unabhängigen XTT-Test-Zeitreihen. Einzelwerte wurden jeweils im 2-Punkt-Verfahren aus Werten in der exponentiellen Wachstumsphase errechnet. *SA*: Standardabweichung, *Kon*: Kontrolle, *NI*<sup>59/62</sup>: *NOTCH1*-*Knockdown*, *N2*<sup>94/95</sup>: *NOTCH2*-*Knockdown*.

### 3.4.3.2 Auswirkungen auf die Chemosensitivität

Da die Expression von *NOTCH1* und *NOTCH2* nach der Zytostatikabehandlung in den untersuchten Magenkarzinomen verändert war, wurden die *NOTCH1*- und *NOTCH2*-*Knockdown*-Zelllinien (MKN28) auf Veränderungen bezüglich der Chemosensitivität gegenüber Cisplatin und 5-Fluorouracil untersucht. Diese Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob es Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression und der Chemosensitivität gab.

#### 3.4.3.2.1 Chemosensitivitätsanalysen mit XTT-Tests

Die Herunterregulation der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression erhöhte die Resistenz der Magenkarzinomzelllinie MKN28 gegenüber Cisplatin. Die Cisplatinkonzentration, welche für eine 50 %ige Wachstumsinhibition der MKN28-*Knockdown*-Zelllinien nötig war (50 % *inhibitory concentration*,  $IC_{50}$ ), war sowohl für die *NOTCH1*- als auch für die *NOTCH2*-*Knockdown*-Zelllinien signifikant größer als für die Kontrollzelllinie MKN28-Kon. Ein unterschiedlicher Einfluss der *NOTCH1*- gegenüber der *NOTCH2*-Expression auf die Chemosensitivität konnte nicht festgestellt werden (Abb. 23A). Die Resistenz gegenüber 5-Fluorouracil wurde durch den *NOTCH1*- und *NOTCH2*-*Knockdown* in diesem Assay nicht beeinflusst (Abb. 23B).

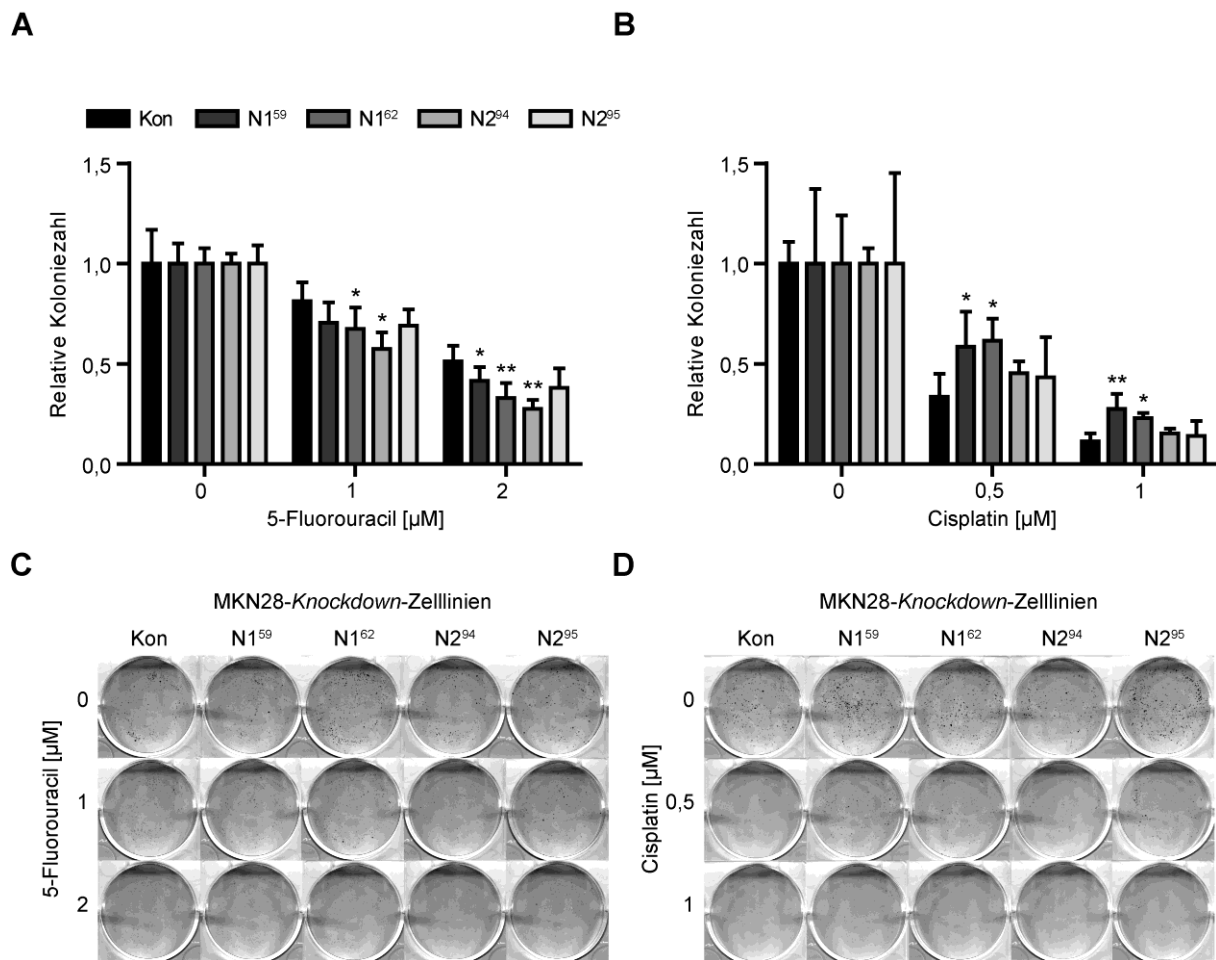


**Abb. 23:** Chemosensitivität von *NOTCH1*- und *NOTCH2*-*Knockdown*-Zelllinien gegen Cisplatin und 5-Fluorouracil. Dargestellt sind die mittleren inhibitorischen Konzentrationen ( $IC_{50}$ ) bei 48 h Inkubation mit **A**) Cisplatin und **B**) 5-Fluorouracil. \*  $p < 0,05$  und \*\*  $p < 0,01$  im Student's t-Test gegenüber der Kontrollzelllinie. **Kon**: Kontrolle, **N1<sup>59/62</sup>**: *NOTCH1*-*Knockdown* **N2<sup>94/95</sup>**: *NOTCH2*-*Knockdown*.

#### 3.4.3.2.2 Chemosensitivitätsanalysen mit Koloniebildungsassays

Eine weitere Möglichkeit den Einfluss der Herunterregulation der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression auf die Chemosensitivität zu untersuchen bietet der Koloniebildungsassay (KBA), welcher auch den Anteil der zur Koloniebildung befähigten Zellen abschätzen lässt. KBAs wurden für die MKN28-*Knockdown*-Zelllinien sowohl mit einer Cisplatin- als auch mit einer 5-Fluorouracil-Behandlung durchgeführt (Abb. 24).

Durch die Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  5-Fluorouracil war die Koloniebildung der *Knockdown*-Zelllinien MKN28-N1<sup>62</sup> und MKN28-N2<sup>94</sup> stärker reduziert als die der Kontrollzelllinie MKN28-Kon. Die Erhöhung der 5-Fluorouracil-Konzentration auf 2  $\mu\text{M}$  führte zusätzlich zu einer verstärkten Reduktion der Koloniebildung von MKN28-N1<sup>59</sup>-Zellen ( $p=0,038$ ) und von MKN28-N2<sup>95</sup>-Zellen ( $p=0,072$ ) gegenüber den MKN28-Kon-Zellen (Abb. 24A und C).



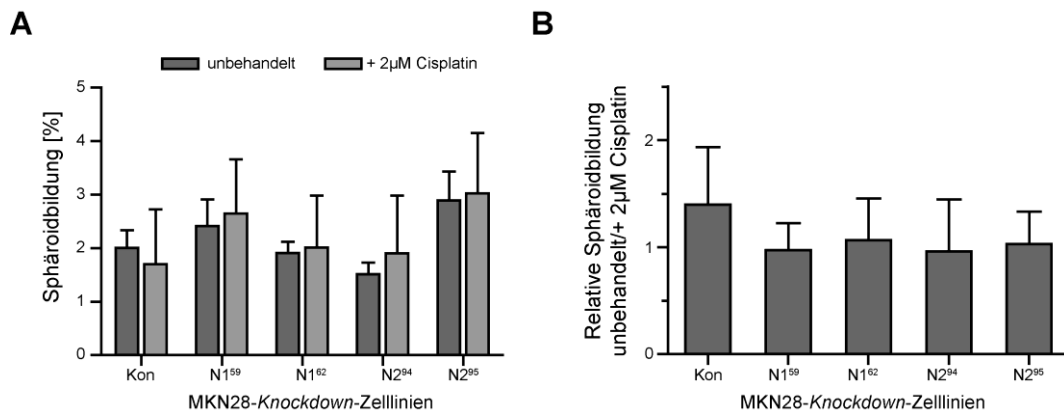
**Abb. 24: Koloniebildungsassays (KBA) mit MKN28-Knockdown-Zelllinien unter Zytostatikabehandlung.** **A)** Mittlere relative Kolonienzahl bei Behandlung mit Cisplatin, normiert auf die jeweiligen unbehandelten Proben. **B)** Mittlere relative Kolonienzahlen bei Behandlung mit 5-Fluorouracil, normiert auf die unbehandelten Proben. In **C)** und **D)** ist jeweils ein *Well* je Konzentration und Zelllinie exemplarisch dargestellt. Die Sterne beziehen sich auf den Vergleich mit der jeweils gleich behandelten MKN28-Kon, \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  Student's t-Test. **Kon:** Kontrolle, **N1<sup>59/62</sup>:** *NOTCH1-Knockdown*, **N2<sup>94/95</sup>:** *NOTCH2-Knockdown*.

Nach der Behandlung mit 1 und 2  $\mu\text{M}$  Cisplatin verblieben bei den *NOTCH1-Knockdown*-Zelllinien MKN28-N1<sup>59</sup> und -N1<sup>62</sup> signifikant mehr Kolonien als bei MKN28-Kon. Die *NOTCH2-Knockdown*-Zelllinien MKN28-N2<sup>94</sup> und -N2<sup>95</sup> wiesen keine signifikanten Koloniebildungsunterschiede gegenüber der Kontrolle auf (Abb. 24B und D).

### 3.4.3.3 Auswirkungen auf die Sphäroidbildung

Um die Auswirkungen der Herunterregulation der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression auf die Tumorinitiationsfähigkeit der MKN28-Zellen zu untersuchen wurden Sphäroidassays mit den *Knockdown*-Zelllinien durchgeführt. Da in den vorangegangenen Versuchen Unterschiede in der Resistenz der *Knockdown*-Zellen gegenüber Cisplatin auftraten, wurden die Zelllinien mit und ohne Zugabe von 2  $\mu$ M Cisplatin über 7 d auf ihr Sphäroidbildungsverhalten untersucht.

Es konnte kein signifikanter Einfluss des *Knockdowns* von *NOTCH1* oder *NOTCH2* auf die Sphäroidbildungseffizienz der unbehandelten Proben festgestellt werden. Für MKN28-N1<sup>59</sup> und MKN28-N2<sup>95</sup> deutete sich eine leicht erhöhte Sphäroidbildung gegenüber MKN28-Kon an (nicht signifikant). Dagegen schien MKN28-N2<sup>94</sup> eine eher geringere Sphäroidbildung aufzuweisen (ebenfalls nicht signifikant) (Abb. 25A).

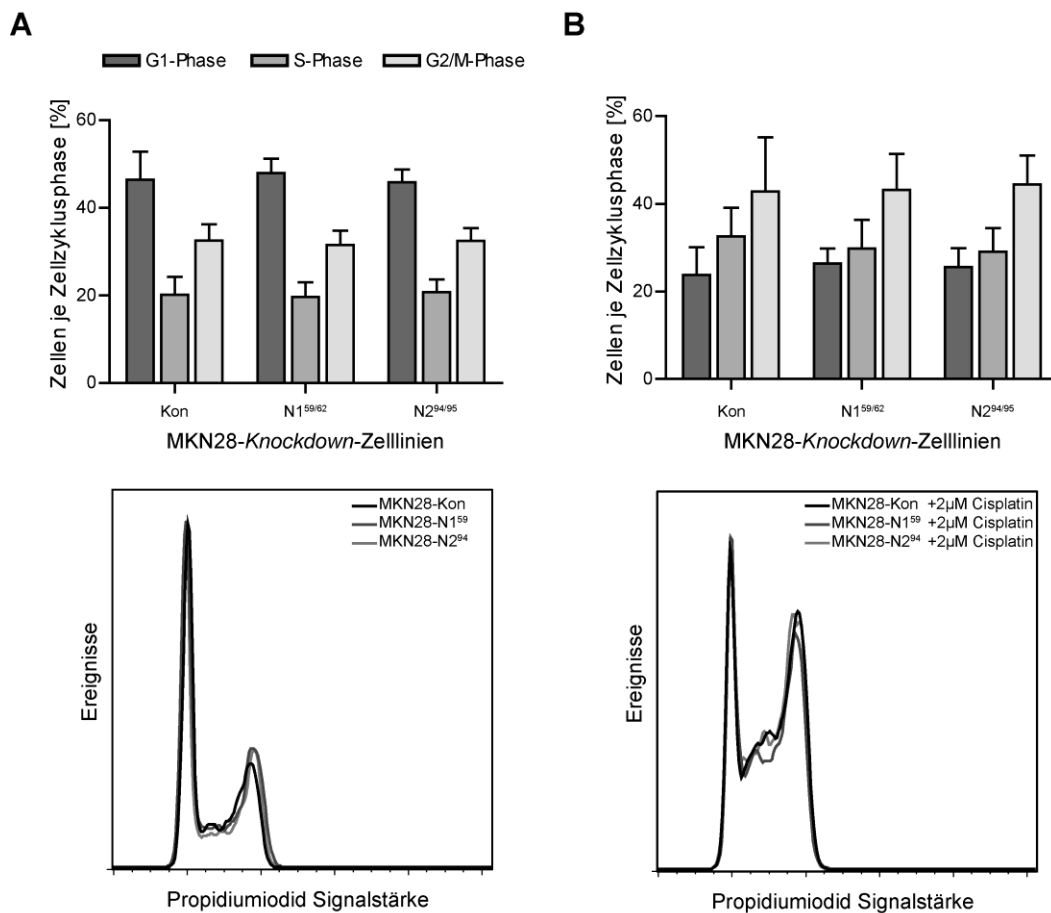


**Abb. 25:** Quantifizierung der Sphäroidbildung von MKN28-*Knockdown*-Zelllinien ohne und mit Cisplatinbehandlung (2  $\mu$ M Cis). **A)** Mittlere Sphäroidbildungseffizienz der MKN28-*Knockdown*-Zellen (mittleren Sphäroidzahl je Anzahl ausgesäter Zellen). **B)** Mittleres Verhältnis zwischen der unbehandelten und der behandelten Probe aus drei unabhängigen Experimenten. **Kon:** Kontrolle, **N1<sup>59/62</sup>:** *NOTCH1*-*Knockdown*, **N2<sup>94/95</sup>:** *NOTCH2*-*Knockdown*.

Bei keiner der Zelllinien führte die Behandlung mit Cisplatin zu einer signifikanten Veränderung der Sphäroidbildungseffizienz. Die gemittelten Verhältnisse zwischen den unbehandelten und behandelten Proben wiesen auf eine leicht verminderte Sphäroidbildung unter Cisplatinbehandlung bei der Zelllinie MKN28-Kon hin (mittleres Verhältnis unbehandelt zu behandelt 1,4 $\pm$ 0,5) während die Behandlung mit 2  $\mu$ M Cisplatin bei den *NOTCH1*- und *NOTCH2*-*Knockdown*-Zelllinien keine Veränderung bewirkte (mittleres Verhältnis unbehandelt zu behandelt 1,0 $\pm$ 0,3, 1,1 $\pm$ 0,4, 1,0 $\pm$ 0,5 und 1,0 $\pm$ 0,3) (Abb. 25B).

### 3.4.3.4 Auswirkungen auf die Zellzyklusverteilung

Die Behandlung mit Cisplatin führt durch Bildung von DNA-Addukten und Quervernetzung zu DNA-Schäden welche einen G2/M-Zellzyklusarrest hervorrufen<sup>(176)</sup>. In den Chemosensitivitätsanalysen waren besonders die *NOTCH1*- und zum Teil auch die *NOTCH2*-*Knockdown*-Zelllinien resistenter gegenüber Cisplatin. Um zu ergründen, ob sich diese Resistenz in Veränderungen der Zellzyklusverteilung manifestiert, wurden Zellzyklusanalysen an den MKN28-*Knockdown*-Zelllinien mit und ohne Cisplatin-Behandlung durchgeführt.



**Abb. 26:** Verteilung der Zellzyklusphasen von MKN28-N1 und MKN28-N2-Zelllinien im Vergleich mit der Kontrollzelllinie MKN28-Kon. A) Die unbehandelten Zelllinien unterscheiden sich nicht in der Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen. B) Mit vorangegangener Cisplatin-Behandlung (2  $\mu$ M über 24 h) kommt es zu einer deutlichen Verschiebung der Zyklusanteile im Sinne eines G2/M-Arrests. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den MKN28-N1- und MKN28-N2-Zelllinien und der Kontrollzelllinie MKN28-Kon bezüglich der Reaktion auf die Cisplatinbehandlung feststellbar. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten sowie repräsentative Histogramme. **Kon:** Kontrolle, **N1<sup>59/62</sup>:** *NOTCH1*-*Knockdown* **N2<sup>94/95</sup>:** *NOTCH2*-*Knockdown*.

Nach 24 h Inkubation mit oder ohne 2  $\mu$ M Cisplatin und anschließender FACS-Analyse wies die Kontrollzelllinie MKN28-Kon einen G1-Phasen-Anteil von 46 % auf, 20 % der Zellen

befanden sich in der S-Phase und 33 % in der G2/M-Phase. Die MKN28-N1 und MKN28-N2-Zelllinien wichen von diesen Werten nicht signifikant ab (Abb. 26A). Nach Behandlung mit Cisplatin verschob sich das Verhältnis zugunsten der G2/M- und S-Phasen. In der Kontrollzelllinie MKN28-Kon befanden sich noch 24 % der Zellen in der G1-Phase, während 33 % in der S-Phase und 43 % in der G2/M-Phase waren. Die MKN28-N1 und MKN28-N2-Zelllinien folgten diesem Bild mit jeweils 26 % der Zellen in der G1-Phase, 30 % (MKN28-N1) und 29 % (MKN28-N2) in der S-Phase und 44 bzw. 43 % in der G2/M-Phase. Die scheinbar leicht höheren G1- und niedrigeren S-Phasen-Anteile waren nicht signifikant von denen der Kontrollzelllinie verschieden (Abb. 26B).

Zusammen genommen zeigten die *in vitro*-Versuche, dass eine verringerte *NOTCH1* und *NOTCH2*-Expression sich nicht auf die Morphologie, Wachstumsgeschwindigkeit, Sphäroidbildung und Zellzyklusverteilung der *Knockdown*-Zelllinien im Vergleich mit der Kontrollzelllinie auswirkte. Der *NOTCH1-Knockdown* führte zu erhöhter Chemoresistenz gegenüber Cisplatin im XTT-Test und Koloniebildungsassay und verringerter Resistenz gegenüber 5-Fluorouracil im Koloniebildungsassay. Der *NOTCH2-Knockdown* führte im XTT-Test zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Cisplatin. Im Koloniebildungsassay war die Resistenz dieser Zellen gegen 5-Fluorouracil verringert. Bezüglich der Cisplatinsensitivität waren keine Unterschiede gegenüber der Kontrolle messbar.

## 4. Diskussion

Die neoadjuvante Chemotherapie des lokal fortgeschrittenen Magenkarzinoms dient der Verkleinerung des Tumors vor der Operation. Zusätzlich ermöglicht dieses Therapieschema die Untersuchung von Tumoren des gleichen Patienten vor und nach einer Chemotherapie unter den realen klinischen Bedingungen. Zwar führt die neoadjuvante Chemotherapie in etwa 20 % der Fälle zu einer fast vollständigen Regression des Primärtumors, bei den meisten Patienten verbleiben jedoch erhebliche Mengen residueller Tumorzellen<sup>(36,41)</sup>.

Das Tumorstammzellmodell bietet einen Erklärungsansatz für das unterschiedliche Ansprechen der Zellen auf eine Chemotherapie innerhalb eines Tumors. Durch intrinsische Chemoresistenzmechanismen, welche mit dem Tumorstammzellphänotyp verknüpft sein sollen (Dormanz, Exportsysteme) könnten diese Zellen eine Chemotherapie überdauern und anschließend die Bildung lokaler Rezidive bewirken<sup>(45)</sup>. Entsprechend sollte eine höhere Expression von tumorstammzellassozierten Genen im Residualtumor mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einhergehen und potenzielle Tumorstammzellen in den Residualtumoren gegenüber dem prätherapeutischen Tumor angereichert sein.

Die molekulare Charakterisierung der residuellen Tumorzellen auf tumorstammzellassozierte Expressionsmuster könnte Aufschluss über deren Eigenschaften geben und eventuell Angriffspunkte für alternative Behandlungen aufzeigen. Die vorliegende Arbeit hatte die Untersuchung dieser Aspekte der Tumorstammzellhypothese in neoadjuvant chemotherapierten Magenkarzinomen zum Ziel und sollte die funktionelle Bedeutung ausgewählter Gene für den Tumorstammzellphänotyp und die Chemoresistenz *in vitro* untersuchen.

Im Folgenden sollen zunächst die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen im Hinblick auf die prognostische Wertigkeit der untersuchten Gene für das neoadjuvant chemotherapierte Magenkarzinom sowie die Assoziation mit weiteren klinisch-pathologischen Parametern diskutiert werden. Die Betrachtung der Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt des Tumorstammzellmodells insbesondere bezüglich der differenziellen Expression ausgesuchter Gene vor und nach der Chemotherapie folgt in Abschnitt 4.3. Im letzten Teil dieser Diskussion wird auf die Bedeutung von *NOTCH1* und *NOTCH2* im Bezug auf die Chemotherapieresistenz und

Tumorstammzeleigenschaften von Magenkarzinomen und Magenkarzinomzelllinien näher eingegangen.

## 4.1 Überlegungen zur Vergleichbarkeit von Expressionsstudien

Um diese Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der vorhandenen Literatur einordnen und interpretieren zu können, wird zunächst auf die Vergleichbarkeit von Expressionsstudien an Tumoren eingegangen. Um verschiedene Studien zu vergleichen, ist es wichtig die Zusammensetzung der untersuchten Patientenkollektive zu beachten. Dazu gehört in erster Linie die erfolgte Therapie sowie die klinische Ausgangslage, welche erheblichen Einfluss auf die Prognose der Patienten aber auch auf die Genexpression haben kann. Eine neoadjuvante Chemotherapie beim Magenkarzinom wird in der Regel bei lokal fortgeschrittenen Tumoren durchgeführt (cT3/4, Nx, M0), während bei Tumoren mit niedrigerem Tumorstadium eine primäre Resektion vorgeschlagen wird<sup>(30)</sup>. Die Prognose für Patienten mit lokal fortgeschrittenen Karzinomen ist *per se* erheblich schlechter als für Patienten mit lokal begrenzten Tumoren und diese Unterschiede werden auch durch die Chemotherapie nicht egalisiert<sup>(39)</sup>. Auch innerhalb der Gruppe der neoadjuvant chemotherapierten Patienten kann bezüglich des Therapieansprechens und der daraus resultierenden Prognose differenziert werden. Patienten mit Tumorregressionsgrad (TRG) 1 (weniger als 10 % residuale Tumorzellen) haben eine deutlich bessere Prognose, als Patienten mit TRG2 oder 3<sup>(41)</sup>. Die hier untersuchten Tumoren mit TRG2 stellen eine sehr spezielle Gruppe dar, die zwar in teilweise erheblichem Umfang auf die Chemotherapie anspricht (10-50 % residuale Tumorzellen), sich jedoch prognostisch kaum von Tumoren mit TRG3 (mehr als 50 % residuale Tumorzellen) unterscheidet<sup>(41)</sup>. Die Beschränkung auf neoadjuvant behandelte Patienten, die sich in dem Therapieansprechen und der Prognose von der Gesamtheit der Magenkarzinompatienten abgrenzen, kann die Vergleichbarkeit zu anderen Studien einschränken. Zusätzlich zu den Unterschieden im Überleben werden durch die Chemotherapie auch Veränderungen in der Genexpression hervorgerufen<sup>(177)</sup>, so dass der Vergleich zwischen Studien an Biopsien oder primär resezierten Tumoren und Studien an posttherapeutischen Resektaten mit Einschränkungen zu werten ist. Nicht für alle betrachteten Aspekte stehen Vergleichsdaten aus Magenkarzinomstudien zur Verfügung. Daher werden auch Vergleiche mit anderen Tumorentitäten und -zelllinien angestellt. Diese Vergleiche können aufgrund der unterschiedlichen klinischen, therapeutischen und molekularen Voraussetzungen in anderen Tumorarten nur exemplarisch sein.



In dieser Arbeit wurden Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene durchgeführt. Für den Vergleich mit Studien, die die Expression auf Proteinebene analysierten, muss beachtet werden, dass auf Grund der vielfältig möglichen, posttranslationalen und posttranskriptionalen Regulationsmechanismen eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression und der Proteinexpression nicht notwendigerweise vorliegen muss<sup>(178)</sup>. Allein von der Expression kann in vielen Fällen nicht auf die Aktivität von Proteinen geschlossen werden; auch die zelluläre Lokalisation und aktivierende oder deaktivierende Phosphorylierung können die Aktivität von Proteinen bestimmen<sup>(179)</sup>.

Auch wenn Studien auf der gleichen Expressionsebene durchgeführt wurden, können Variabilitäten durch das verwendete System zur Expressionsquantifizierung entstehen. Dabei spielen die Auswahl der Primer und Sonden (Detektion von Spleißvarianten), die Art der Normalisierung (globale Methoden oder referenzgenbasierte Methoden), die Auswahl der Antikörper (Spezifität, Lage des Epitops) und andere technische Aspekte eine Rolle<sup>(180)</sup>.

## 4.2 Assoziation der Genexpression mit dem Überleben und klinisch-pathologischen Parametern

### 4.2.1 Assoziationen mit dem Überleben

Die Genexpressionsanalysen in neoadjuvant chemotherapierten Magenkarzinomen mit TRG2 zeigte für die Expression von drei Genen (*GSK3B*, *DNMT1*, und *CTNNB1*) eine signifikante Assoziation mit dem Überleben, sowie einen entsprechenden Trend für drei weitere Gene (*CCND1*, *ABCG2* und *NOTCH2*).

Eine hohe Expression von Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (*GSK3B*)-mRNA war mit einem besserem Gesamtüberleben der Patienten assoziiert. Die *GSK3B*-Expression war in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse sogar der zweitstärkste unabhängige, prognostische Faktor nach dem Metastasenstatus. Eine immunhistochemische Studie an Magenkarzinomen beschrieb bereits eine signifikant bessere Prognose für Patienten mit starker phospho-GSK3B<sup>Tyr216</sup>-Proteinexpression und eine Assoziation dieser aktivierten Form der Kinase mit einer niedrigeren lokalen Tumorausdehnung und mit Metastasenfreiheit<sup>(181)</sup>. Die Gesamtproteinexpression von *GSK3B* wurde in der genannten Studie nicht berücksichtigt, jedoch wurde bereits für hochgradige, seröse Ovarialkarzinome beschrieben, dass eine hohe *GSK3B*-Genexpression mit einer guten Prognose assoziiert sei<sup>(182)</sup>. In anderen Tumoren wird *GSK3B* jedoch eher als Zielstruktur für eine Therapie angesehen, da es in Tumorzellen vermehrt exprimiert wird oder die Proliferation von Tumorzellen fördert<sup>(183,184)</sup>. Diese Diskrepanzen

liegen möglicherweise in den vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten von GSK3B begründet. GSK3B ist eine Serin/Threonin-Kinase, die mit über 40 verschiedenen Substraten in diverse Signalwege und zelluläre Funktionen eingebunden ist. Zu diesen gehören der Wnt-Signalweg, die zelluläre Regulation der Insulinwirkung und die Apoptoseinduktion<sup>(185)</sup>. Im Wnt-Signalweg ist GSK3B ein Bestandteil des  $\beta$ -Catenin-Zerstörungskomplexes und für eine Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zuständig, welche zur Ubiquitinierung und zum Abbau von  $\beta$ -Catenin führt und somit inhibierend auf den Wnt-Signalweg einwirkt<sup>(186)</sup>. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs ist für die Erhaltung vieler Stammzellkompartimente, darunter auch im Gastrointestinaltrakt, notwendig. Gleichzeitig ist eine Deregulation im Sinne einer dauerhaften Aktivierung des Wnt-Signalwegs eine häufig beobachtete Eigenschaft in gastrointestinalen Tumoren<sup>(100)</sup>. Auch in bis zu 46 % aller Magenkarzinome wurde eine verstärkte Aktivierung des Wnt-Signalwegs beschrieben, welche mit einem schlechteren Überleben der Patienten einherging<sup>(187)</sup>. Die hier beobachtete Assoziation der *GSK3B*-Genexpression mit einem besseren Überleben könnte also auf die Inhibition des Wnt-Signalwegs durch eine GSK3B-vermittelte  $\beta$ -Catenin-Degradation zurückzuführen sein. Dagegen spricht, dass in dieser Studie auf mRNA-Ebene keine Korrelation zwischen der Expression von *CTNNB1* ( $\beta$ -Catenin-Gen) und *GSK3B* festgestellt wurde. Dies wird durch eine weitere Studie von Cho *et al.* (2010) bestätigt, die keine Korrelation zwischen phospho-GSK3B und der  $\beta$ -Catenin-Aktivität oder -Proteinexpression im Magenkarzinom feststellen konnten<sup>(188)</sup>. Weiterhin kann GSK3B regulierend in den Notch-Signalweg eingreifen, indem es aktiviertes Notch2 phosphoryliert und dessen transkriptionelle Aktivität einschränkt<sup>(189)</sup>. Die möglichen Auswirkungen einer veränderten Notch-Signalweg-Aktivität werden in Abschnitt 4.4 ausführlicher diskutiert.

Eine verstärkte mRNA-Expression von *CTNNB1* ( $\beta$ -Catenin-Gen) könnte eine Aktivitätssteigerung des Wnt-Signalwegs bewirken und wäre daher im Zusammenhang mit einem schlechteren Überleben der Patienten zu erwarten. Hier wurde jedoch eine signifikante Assoziation von geringer *CTNNB1*-Genexpression im Primärtumor mit dem Auftreten von Fernmetastasen und schlechterer Prognose festgestellt. Interessanterweise wurde im Magenkarzinom und anderen Tumoren des Gastrointestinaltrakts häufig eine geringere Expression von  $\beta$ -Catenin als im Normalgewebe beobachtet, was mit einer erhöhten Malignität einherging<sup>(190)</sup>. Dies würde mit der beobachteten besseren Prognose bei höherer *CTNNB1*-Genexpression übereinstimmen. Andere Autoren sahen dagegen keinen Zusammenhang zwischen der Expression von  $\beta$ -Catenin und der Prognose von Magenkarzinomen<sup>(191)</sup> oder konnten zeigen, dass die  $\beta$ -Catenin-Expression besonders in dem prognostisch ungünstigen histologischen Mischtyp nach Laurén erhöht und mit Lymphknotenmetastasen assoziiert ist<sup>(192)</sup>. Eine mögliche Erklärung für eine bessere Prognose bei

höherer  $\beta$ -Catenin-Expression bietet dessen duale Funktion als Wachstums- und Proliferationsmediator im Wnt-Signalweg und in der Adhärenzvermittlung im membrangebundenen E-Cadherin-Komplex. In einer Kolonkarzinomstudie wurde zum Beispiel festgestellt, dass eine Verringerung der  $\beta$ -Catenin-Expression oder des E-Cadherins zu einem signifikant schlechteren Überleben der Patienten führte<sup>(193)</sup>. In der vorliegenden Studie wurden weder eine Korrelation zwischen der *CTNNB1*- und *CDHI* (E-Cadherin-Gen)-Expression noch zwischen der *CDHI*-Genexpression und dem Überleben festgestellt. Einen weiteren Erklärungsansatz für die Assoziation einer hohen *CTNNB1*-Genexpression mit einem besseren Überleben bietet die Arbeit von de Sousa *et al.* (2011). Diese zeigte eine Assoziation zwischen erhöhter Expression von Wnt-Zielgenen in frühen Kolorektalkarzinomen und der Abnahme der Expression mit fortschreitender Entdifferenzierung des Tumors. In der Studie war eine erhöhte Expression von Wnt-Zielgenen auch mit einer besseren Prognose verknüpft<sup>(194)</sup>.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine Assoziation zwischen hoher *DNMT1* (DNA-Methyltransferase 1-Gen) -Expression in den Resektaten und einem besseren Gesamtüberleben festgestellt. Dies steht im Gegensatz zu Studien, die belegen, dass die DNMT1 in Magenkarzinomen verstärkt exprimiert wird und daher DNMT-Inhibitoren als mögliche Therapieoption vorschlagen<sup>(195,196)</sup>. Unterstützt wird diese Einschätzung durch eine immunhistochemische Analyse an prätherapeutischen Biopsien neoadjuvant behandelter Magenkarzinome, die eine Assoziation zwischen niedriger Expression von DNMT1 und besserem Überleben der Patienten feststellte<sup>(158)</sup>. Dieser Gegensatz zu den hier vorliegenden Daten könnte wie eingangs erwähnt auf die verschiedenen Untersuchungsebenen (mRNA-versus Proteinexpression), sowie die Auswahl der Patienten zurückzuführen sein, was die Vergleichbarkeit der Studien einschränkt. Funktionell ist die DNMT1 eine so genannte *maintenance*- (Erhaltungs-) Methyltransferase, die die Übertragung von bestehenden Methylierungsmustern auf neu synthetisierte DNA-Stränge zur Aufgabe hat. Tatsächlich ist die Expression von DNMT1 in proliferierenden Zellen erhöht<sup>(197)</sup>. Beim Magenkarzinom ist eine erhöhte DNMT1-Proteinexpression mit einem CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp (CIMP) assoziiert. Diese epigenetische Deregulation gilt als mögliche Ursache für den *CDHI*-Expressionsverlust. Es muss daher zwischen einer generell erhöhten Expression und einer erhöhten Proliferationsrate unterschieden werden<sup>(197)</sup>, was auf der hier untersuchten mRNA-Ebene nicht geschehen kann.

Eine höhere Genexpression von *ABCG2* im Tumorsektat war ebenfalls mit einem besserem Überleben der Patienten assoziiert. Dies war unerwartet, da *ABCG2* (*ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2*) ein Exportprotein ist, welches wie andere *multidrug resistance* (MDR)-assoziierte Gene für die Resistenz gegen diverse Chemotherapeutika

mitverantwortlich gemacht wird<sup>(129)</sup>. In einer immunhistochemischen Studie an Magenkarzinomen wurde eine Assoziation der Expression von ABCG2 und ABCB1 mit einem schlechteren Differenzierungsgrad der Tumoren gefunden. Eine mögliche Assoziation mit dem Überleben der Patienten wurde dabei nicht untersucht<sup>(198)</sup>. Im nichtkleinzelligen Lungenkrebs ist ABCG2 alleine zwar nicht mit der Prognose assoziiert, jedoch ist eine hohe Expression des Proteins Teil einer prognostischen Signatur, die eine früh rezidivierende Erkrankung vorhersagt<sup>(199)</sup>. Im Gegensatz zu *ABCG2* war die Genexpression von *ABCB1* bezüglich des Überlebens und der klinisch-pathologischen Parameter in dieser Arbeit unauffällig.

Die *OLFM4* (Olfactomedin 4-Gen)-Expression war in dieser Arbeit positiv mit einem besserem Überleben der Patienten assoziiert. Eine immunhistochemische Studie an Kolorektalkarzinomen kam zu einem vergleichbaren Ergebnis bezüglich des Überlebens und stellte eine höhere Expression von *OLFM4* bei niedrigerer TNM-Klassifikation fest<sup>(200)</sup>. Weiterhin wurde *OLFM4* als Biomarker für die Differenzierung von Magenkarzinomen beschrieben, wobei in dieser immunhistochemischen Studie gut differenzierte Tumoren und Tumoren vom intestinalen Typ nach Laurén eine erhöhte Expression aufwiesen, während schlecht differenzierte und diffuse Tumoren *OLFM4* geringer exprimierten<sup>(201)</sup>. In den hier untersuchten Tumoren zeigte sich eine Assoziation der *OLFM4*-Genexpression mit einem negativen Lymphknotenmetastasenstatus, nicht jedoch mit dem histologischen Subtyp nach Laurén.

Der Notch-Signalweg mit seinen vier paralogen Rezeptoren (Notch1-4) spielt besonders in der Regulation des intestinalen Stammzellkompartiments und der Proliferations- und Differenzierungskontrolle eine Rolle<sup>(102,114)</sup>. Die Expression von *NOTCH2* korrelierte in dieser Arbeit mit einem schlechteren Überleben der Patienten und dem Vorhandensein von Fernmetastasen. Die Expression von *NOTCH1* war dagegen weder mit dem Überleben noch mit anderen klinisch-pathologischen Parametern assoziiert. Die Aktivierung des Notch-Signalwegs über Notch1 und Notch2 wurde als progressionsfördernd in Xenotransplantationsversuchen mit Magenkarzinomzellen, welche aktiviertes Notch1 beziehungsweise Notch2 exprimierten, beschrieben<sup>(202,203)</sup>. Notch2 wurde in Glioblastomen als proliferationsverstärkend und apoptoseinhibierend beschrieben<sup>(204)</sup> und die konstitutive Expression von Notch2-NICD (aktiviertes Notch2) in Mäuselebern führt zur Entstehung von hepatozellulären Karzinomen<sup>(205)</sup>. Auch die progressionsfördernden Eigenschaften von Notch2 in der Entstehung von duktalem Pankreaskarzinomen aus den PanIN-Vorläuferläsionen (*pancreatic intraepithelial neoplasia*) spricht für eine onkogene Rolle von Notch2<sup>(119)</sup>. Notch1 kann beim Hautkrebs je nach Tumortyp (Melanom, Spinalzellkarzinom, Basalzellkarzinom) und Lokalisation (Sonnenlichtexposition) als Tumorsuppressor oder als Onkogen auftreten<sup>(206)</sup>.

Die meisten Publikationen stellen Notch1 jedoch als potenzielles Onkogen dar<sup>(118)</sup>. Aktivierende Mutationen von *NOTCH1* werden häufig bei akuten lymphoblastischen Leukämien vom T-Zell-Typ (T-ALL) gefunden und daher wird Notch1 als therapeutische Zielstruktur für diese Tumoren angesehen, obwohl diese Mutationen interessanterweise mit besserem Therapieansprechen und einer günstigen Prognose assoziiert sind<sup>(207,208)</sup>. Im Brustkrebs ist die Genexpression von *NOTCH1*, *NOTCH3* und *JAG1* mit schlechterem Gesamtüberleben assoziiert<sup>(209)</sup>. Auch in anderen Tumoren wurde eine verstärkte Expression von Notch-Rezeptoren identifiziert und in vielen Fällen mit einer vermehrten Chemoresistenz in Verbindung gebracht<sup>(118)</sup>. So konnte in einer Kolonkarzinomstudie eine erhöhte Genexpression von *NOTCH1* in den Karzinomen festgestellt werden und in anschließenden Zellkulturexperimenten auf eine Induktion durch die Chemotherapie zurückgeführt werden<sup>(117)</sup>.

Insgesamt wird der Notch-Signalweg zunehmend als wichtige Komponente in der Tumorprogression und Chemoresistenz gesehen und gewinnt dadurch als potenzielle Zielstruktur an Bedeutung<sup>(118)</sup> (siehe auch Abschnitt 4.4). Die hier durchgeführten Expressionsanalysen deuten ebenfalls auf Notch2 als mögliche Zielstruktur, nicht jedoch auf Notch1 hin. Die Aktivierungsmechanismen und Wirkungen der einzelnen Rezeptorparaloge sind nicht vollständig bekannt und eine spezifische Inhibition einzelner Rezeptoren ist daher eventuell einer allgemeinen Blockade des Signalwegs vorzuziehen<sup>(120)</sup>. Für diese Sichtweise spricht auch die in dieser Arbeit gefundene Assoziation der *NOTCH2*-Expression mit einer schlechteren Prognose, während die *NOTCH1*-Expression nicht mit dem Gesamtüberleben korrelierte. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Expressionsveränderungen von *NOTCH1* und *NOTCH2* während der Chemotherapie festgestellt (siehe Abschnitte 4.3 und 4.3.2).

#### 4.2.2 Die prognostische Signatur

Durch die Kombination der Ergebnisse der Expressionsanalyse und der Cluster-Analysen konnte eine Genexpressionssignatur bestehend aus *GSK3B*<sup>hoch</sup>, *CTNNB1*<sup>hoch</sup> und *NOTCH2*<sup>niedrig</sup> im Tumorsektat identifiziert werden. Diese Signatur definierte eine Patientengruppe, deren Gesamtüberleben im Vergleich mit den Patienten, deren Tumoren andere Expressionsmuster aufwiesen, erheblich besser war. Dies konnte nicht nur mit der Einteilung nach den Einzelgrenzwerten gezeigt werden, sondern war auch mit einem Risiko-Score, der auf den Cox-Regressionskoeffizienten der Gene basierte, nachweisbar. Der klinische Nutzen einer solchen prognostischen Signatur läge besonders in der Stratifizierung von Patienten für eine zusätzliche Therapie. So könnte Patienten, die anhand der

Expressionssignatur in die prognostisch günstige Gruppe eingestuft werden, eine anstrengende und eventuell schädliche *second-line* Chemotherapie erspart werden, während man bei Patienten mit einer schlechten Prognose eine zusätzliche Therapie in Erwägung ziehen würde. Um zu einer solchen Anwendung zu finden ist eine sorgfältige Validierung der Signatur notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen werden konnte.

In der Literatur werden verschiedene Interaktionen und Regulationsmechanismen zwischen den Komponenten der Signatur beschrieben. Die offensichtliche Interaktion von GSK3B und  $\beta$ -Catenin im kanonischen Wnt-Signalweg wurde bereits oben beschrieben (siehe Abschnitt 4.1). Daneben ist GSK3B auch in der Lage aktiviertes Notch2 (Notch2-NICD) durch Phosphorylierung zu inaktivieren. Dieser Vorgang wird jedoch gehemmt, wenn der Wnt-Signalweg aktiviert wird<sup>(189)</sup>. Im Gegenzug sind membranständige, nicht aktivierte Notch-Proteine (besonders Notch1) in der Lage freies  $\beta$ -Catenin zu binden und damit den Wnt-Signalweg zu inhibieren<sup>(210)</sup>. Ob diese funktionellen Zusammenhänge tatsächlich zu der hohen prognostischen Signifikanz der Genkombination beitragen, geht aus den vorliegenden Daten nicht hervor.

Die prognostische Signatur wurde anhand der Genexpressionswerte in posttherapeutischen Proben ermittelt. Um eine generelle prognostische Relevanz zu prüfen, war die Veränderung der Expressionswerte während der Chemotherapie von Interesse. *GSK3B* war der stärkste unabhängige prognostische Faktor nach dem Metastasenstatus in den posttherapeutischen Resektaten mit TRG2. Die *GSK3B*-Expression veränderte sich während der Chemotherapie nicht signifikant. Die *CTNNB1*-Expression zeigte nach der Chemotherapie in Tumoren mit TRG2 eine Tendenz zu höherer Expression, nicht jedoch in Tumoren mit TRG3. Die *NOTCH2*-Expression war in Tumoren mit TRG2 signifikant und in Tumoren mit TRG3 tendenziell gegenüber den zugehörigen Biopsien erhöht.

Insgesamt ließen diese Ergebnisse darauf schließen, dass die Chemotherapie nur einen geringen Einfluss auf die Komponenten der prognostischen Signatur hatte und der stärkste prognostische Faktor unverändert blieb. Dadurch ergab sich die Frage, ob die Signatur unabhängig von dem Therapiestatus der Patienten eine prognostische Wertigkeit haben könnte.

### 4.2.3 Analyse öffentlicher Datenbanken

Um die allgemeine prognostische Relevanz der gefundenen Signatur einzuschätzen wurden aus einer öffentlichen Datenbank Genexpressionswerte, Überlebensdaten und klinisch-pathologische Daten für ein Kollektiv von primär resezierten Magenkarzinomen extrahiert<sup>(170)</sup>. Die Patienten in dieser Studie wurden, soweit bekannt, weder vor noch nach

der Operation einer Chemotherapie unterzogen. Dennoch konnte durch die Anwendung der *GSK3B*<sup>hoch</sup>, *CTNBI*<sup>hoch</sup> und *NOTCH2*<sup>niedrig</sup>-Expressionssignatur, basierend auf der Einteilung nach dem Median oder den optimalen Grenzwerten, jeweils eine Patientengruppe mit erheblich besserem Gesamtüberleben identifiziert werden. Dies unterstreicht, dass die hier gefundene Signatur unabhängig von einer Chemotherapie eine prognostische Signifikanz hat. Gleichzeitig könnte der in dieser Arbeit beobachtete Anstieg der *NOTCH2*-Expression nach der neoadjuvanten Chemotherapie zu einer Verstärkung der Signatur im Sinne einer besseren Diskriminierung geführt haben.

#### 4.2.4 Assoziationen mit weiteren klinisch-pathologischen Parametern

In den Resektaten von Tumoren mit TRG2 wurden eine Reihe weiterer tumorstammzell-assoziiertes Gene identifiziert, die mit klinisch-pathologischen Parametern, aber nicht mit dem Überleben assoziiert waren.

Cyclin D1 ist ein Zielprotein des Wnt-Signalwegs<sup>(171)</sup> und wird als potentes Onkogen angesehen, da es den Zellzyklus vorantreiben kann und in vielen Tumoren überexprimiert oder überaktiviert wird<sup>(109)</sup>. In dieser Arbeit war eine hohe Expression von *CCND1* (Cyclin D1-Gen) mit dem intestinalen Subtyp nach Laurén sowie mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen assoziiert. Außerdem wiesen proximal lokalisierte Tumoren eine tendenziell höhere *CCND1*-Genexpression auf als Tumoren mit anderen Lokalisationen. In der Literatur gibt es Arbeiten, die hinsichtlich der Assoziation zwischen der Cyclin D1-Proteinexpression und dem intestinalen Subtyp nach Laurén zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen<sup>(211,212)</sup>.

*POU5F1* (*POU class 5 homeobox 1*, auch OCT3/4 genannt) ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Selbsterneuerung und Pluripotenz von Stammzellen eine entscheidende Rolle spielt<sup>(60)</sup>. In dieser Arbeit war in Tumoren mit TRG2 nach der Chemotherapie eine höhere *POU5F1*-Genexpression mit einer größeren lokalen Tumorausdehnung (pT) assoziiert. Eine signifikante Assoziation zwischen einer hohen *POU5F1*-Genexpression und einer schlechteren Prognose, wie sie zum Beispiel nach Radiochemotherapie bei Kolorektalkarzinomen beobachtet wurde<sup>(213)</sup>, konnte hier nicht festgestellt werden. In einer Magenkarzinomstudie an primär resezierten Tumoren wurde dagegen eine Assoziation zwischen einer geringeren *POU5F1*-Proteinexpression und einer schlechteren Prognose, größeren Tumorausdehnung und verstärkter Metastasierung gefunden.<sup>(214)</sup> Dass hier die Tumorausdehnung mit einer hohen Genexpression von *POU5F1* assoziiert war könnte neben technischen Aspekten der Vergleichbarkeit von Expressionsstudien auch an der

Chemotherapie liegen, die eine signifikant höhere *POU5F1*-Genexpression in den residualen Tumorzellen zur Folge hatte. Die hier gefundene starke positive Korrelation der *POU5F1*-, *LIN28*-, *SOX2*- und *NANOG*-Genexpression in Resektaten mit TRG2 deutet möglicherweise auf das Vorhandensein eines Tumorstammzellphänotyps in einigen Tumoren hin, da diese vier Gene die gleichen sind, die in der Publikation von Yu *et al.* (2007) als ausreichend für die Umwandlung differenzierter somatischer Zellen zu pluripotenten Stammzellen beschrieben wurden<sup>(61)</sup>. Aufgrund des *Assay*designs für diese Gene konnte eine Amplifikation von gDNA nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die stichprobenartige Überprüfung der cDNA-Reinheit und relativ niedrigen  $C_t$ -Werte von *POU5F1*, *SOX2* und *NANOG* wiesen jedoch darauf hin, dass ein Einfluss von gDNA-Verunreinigungen auf die beobachtete Korrelation unwahrscheinlich ist.

Nanog ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung von Stammzellen hemmt und somit eine wichtige Rolle in der Embryogenese spielt<sup>(96)</sup>. Auch in der Tumorentstehung und für die Ausbildung des Tumorstammzellphänotyps scheint Nanog relevant zu sein<sup>(97)</sup>. Für Magenkarzinome gibt es unterschiedliche Berichte über den Zusammenhang zwischen der Nanog-Proteinexpression und der Prognose sowie den klinisch-pathologischen Parametern. In der bereits erwähnten Studie von Matsuoka *et al.* (2012) korrelierte die Nanog-Proteinexpression mit keinem der untersuchten Faktoren (TNM, Überleben, Laurén), während eine ähnliche Studie von Lin *et al.* (2012) eine Assoziation zwischen hoher Nanog-Proteinexpression und schlechterer Prognose, größerer Tumorausdehnung sowie höherem TNM-Stadium feststellte<sup>(214,215)</sup>. In den hier untersuchten neoadjuvant chemotherapierten Tumoren war die *NANOG*-Genexpression nicht mit dem Überleben korreliert, aber eine hohe Expression war ebenfalls bevorzugt in Tumoren mit größerer lokaler Ausdehnung zu finden. Außerdem zeigte sich eine Assoziation zwischen einer niedrigen *NANOG*-Expression und einer proximalen Tumorlokalisation, die Lin *et al.* (2012) nicht feststellen konnten<sup>(215)</sup>.

Die Genexpression des Wnt-Rezeptors *FZD1* (*Frizzled homolog 1*) war besonders in Tumoren mit großer lokaler Ausdehnung und in nichtproximal lokalisierten Tumoren erhöht. In der Literatur wird *FZD1* vor allem mit einer erhöhten Chemoresistenz durch eine Wnt-vermittelte *ABCBI*-Expression in Verbindung gebracht<sup>(107)</sup>. In dieser Arbeit war die Expression der beiden Gene jedoch nicht signifikant korreliert ( $\rho=0,298$ ,  $p>0,05$ ). Andererseits fand sich in dieser Arbeit eine starke Korrelation zwischen *FZD1* und dem Wnt-Zielgen *ASCL2* (*Achaete-scute complex homolog 2*), was für eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs in einigen Tumoren spricht. *ASCL2* ist für die Erhaltung intestinaler Stammzellen essenziell<sup>(110)</sup> und die Expression von *FZD1* und *ASCL2* korrelierten außerdem stark mit den



oben bereits erwähnten Stammzellmuster bestehend aus *LIN28*, *NANOG*, *POU5F1* und *SOX2*.

Das *Secreted frizzled protein 1* (*SFRP1*) ist ein Antagonist des Wnt-Signalwegs und ein Zielgen des Hedgehog-Signalwegs<sup>(104)</sup>. Die *SFRP1*-Genexpression in den residualen Tumorzellen mit TRG2 war mit dem nichtintestinalen histologischen Subtyp assoziiert, während das Wnt-Zielgen *CCND1* mit dem intestinalen Subtyp assoziiert war. Eine signifikante negative Korrelation zwischen den beiden Genen konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Ein weiteres Wnt-Zielgen ist *LGR5*. Dieses ist für den Tumorstammzellphänotyp im Magenkarzinom besonders interessant, da es als zuverlässiger Stammzellmarker in der intestinalen Schleimhaut sowie in Teilbereichen des Magens gilt<sup>(101)</sup>. Eine höhere Genexpression von *LGR5* war in den Tumoren mit TRG2 signifikant mit einem negativen Metastasenstatus und geringerer Tumorausdehnung verknüpft. Ein Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten konnte dagegen nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde in fortgeschrittenen Magenkarzinomen eine Assoziation von hoher *LGR5*-Genexpression und höherem Tumorstadium beschrieben<sup>(216)</sup>. Die Ursache für diese gegensätzlichen Resultate ist unklar. Der Transkriptionsfaktor *ASCL2* wurde ursprünglich im Kolon durch eine Genexpressionssignatur von *LGR5*-positiven intestinalen Stammzellen als Regulator der Stammzellerhaltung identifiziert<sup>(110)</sup>, daher wäre eine Korrelation der Genexpression von *ASCL2* und *LGR5* zu erwarten gewesen, was aber hier nicht bestätigt werden konnte.

Von den häufig für die Anreicherung von Tumorstammzellen eingesetzten Oberflächenmarkern (*CD133*, *CD44*, *CD24*, *CD34*, *CD38*) zeigte in dieser Arbeit keiner eine Assoziation zwischen der Genexpression und dem Überleben oder anderen klinisch-pathologischen Faktoren. Zwar kommt auch eine kürzlich erschienene Arbeit zu dem Schluss, dass *CD133* nicht geeignet ist um Tumorstammzellen des Magens zu identifizieren<sup>(78)</sup>, doch wurde mehrfach berichtet, dass mit immunhistochemischen Methoden an primär resezierten oder teilweise adjuvant chemotherapierten Magenkarzinomen eine negative Assoziation der *CD133*-Expression mit dem Überleben<sup>(217-220)</sup> sowie eine positive Assoziation mit einer größeren lokalen Tumorausdehnung und Lymphknotenbeteiligung feststellbar ist<sup>(217,220)</sup>. Diese Befunde konnten durch diese Arbeit nicht bestätigt werden, was jedoch auf die unterschiedliche Patientenstratifizierung sowie die unterschiedlichen Nachweisebenen zurückzuführen sein könnte. Alle genannten Studien zu Oberflächenmarkern basierten auf immunhistochemischen Analysen an primär resezierten Tumoren.

Zusammenfassend wurden aus den Expressionsdaten der 44 tumorstammzellassozierten Gene nach Chemotherapie sechs Gene identifiziert, die mit dem Überleben der Patienten

assoziiert waren. Aus drei dieser Gene (*GSK3B*, *CTNNB1* und *NOTCH2*) konnte eine prognostische Signatur abgeleitet werden, deren Wertigkeit durch die Anwendbarkeit an primär resezierten Tumoren aus einem öffentlich verfügbaren Datensatz unterstrichen wurde. Auch eine Reihe anderer tumorstammzellassoziierter Gene zeigte interessante Assoziationen mit den klinisch-pathologischen Parametern der untersuchten Proben. Zu diesen gehören wichtige Stammzellgene wie *POU5F1*, *LGR5* und *NANOG*.

## 4.3 Evaluation der Genexpressionsanalysen unter dem Gesichtspunkt der Tumorstammzellhypothese

### 4.3.1 Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene

Tumorstammzellen sollen in der Lage sein sich selbst zu erneuern und durch Differenzierung alle heterogenen Zelltypen eines Tumors hervorzubringen<sup>(49)</sup>. Weiterhin werden ihnen auch Resistenzmechanismen zugeschrieben (Exportproteinexpression, Dormanz), die es ihnen erlauben eine Chemotherapie zu überstehen und anschließend zu der Entstehung von lokalen Rezidiven beizutragen<sup>(45,71,221)</sup>. Das Tumorstammzellmodell ist noch im Wandel begriffen, da nicht alle Tumoren nach einem hierarchischen Modell kategorisierbar sind und es immer wieder Ausnahmen bezüglich der postulierten Tumorstammzeleigenschaften gibt. Daher wurden flexiblere Modelle vorgeschlagen, die eine mögliche Plastizität des Tumorstammzellphänotyps einbeziehen<sup>(52)</sup>.

Die Konsequenz aus flexiblen Tumorstammzellmodellen ist, dass eine erfolgreiche Therapie sowohl die klassische, auf schnell teilende Tumorzellen ausgerichtete, als auch eine gegen die Tumorstammzellen gerichtete Komponente enthalten muss, da jede residuale Zelle potenziell ein Rezidiv hervorrufen kann<sup>(66,70)</sup>. Um eine solche gezielte Therapieoption zu entwickeln ist es nötig, Identifikationsmarker und Zielstrukturen für Tumorstammzellen zu finden, die von der klassischen Chemotherapie ausgespart werden. Die neoadjuvante Chemotherapie des Magenkarzinoms bietet die Möglichkeit prä- und posttherapeutische Tumorzellen molekular zu charakterisieren und Gene zu identifizieren, die als Marker und therapeutische Zielstrukturen interessant sind, da sie in den residualen Tumorzellen vermehrt exprimiert werden.

Von den 44 untersuchten tumorstammzellassozierten Genen waren sechs mit der Prognose der Patienten assoziiert. Bezug nehmend auf die Hypothese, dass Tumorstammzellen in den residualen Tumoren angereichert sind und zu einer schlechteren Prognose führen, konnten die Assoziationen zwischen hoher *NOTCH2*-Expression beziehungsweise niedriger *GSK3B*-Expression mit einer schlechteren Prognose als bestätigende Ergebnisse angeführt werden.

Weiterhin deutete die höhere Expression von *CCND1* in metastasierten Tumoren und von *FZD1* in lokal weiter ausgedehnten Tumoren auf eine erhöhte Aktivität des Wnt-Signalwegs in diesen Tumoren hin, was auch mit einer erhöhten Zahl von potenziellen Tumorstammzellen vereinbar wäre. Auch die tumorstammzellassozierten Transkriptionsfaktoren *POU5F1* und *NANOG* waren in Tumoren mit größerer lokaler Ausdehnung nach der Chemotherapie stärker exprimiert. Nicht unmittelbar mit der Hypothese vereinbar war die positive Assoziation des potenziellen Stammzellmarkers *OLFM4*, des Wnt-Transkriptionsfaktors *CTNNB1* und des Resistenzvermittlers *ABCG2* mit einem besseren Überleben der Patienten. Auch der (Tumor-) Stammzellmarker *LGR5* war entgegen der vorgeschlagenen Hypothese mit einer geringeren Tumorausdehnung und negativem Metastasenstatus assoziiert, obwohl diese Faktoren eher für eine bessere Prognose sprechen. Andererseits wurde in Resektaten mit TRG2 ein signifikanter Anstieg der *LGR5*-Genexpression verzeichnet, was für eine Anreicherung von potentiellen Tumorstammzellen spricht.

Aufgrund der Assoziation der *NOTCH2*-Expression in den residualen Tumorzellen mit einem schlechteren Überleben der Patienten war *NOTCH2* von besonderem Interesse. Die vergleichenden Expressionsanalysen ergaben zudem, dass die *NOTCH2*-Expression in den Resektaten signifikant erhöht war, was für eine Anreicherung chemotherapieresistenter, *NOTCH2*-exprimierender Zellen spricht. Eine ähnliche Untersuchung an neoadjuvant behandelten Brustkrebsproben ergab eine „Anreicherung des Notch-Signalwegs“ in nicht-basalähnlichen Tumoren im Vergleich mit den prätherapeutischen Biopsien<sup>(222)</sup>. In gemcitabinresistenten Pankreaskarzinomzelllinien wurde ebenfalls ein Anstieg der Notch2-Proteinexpression gemessen<sup>(223)</sup>. Der Notch-Signalweg wird daher als potenzielle therapeutische Zielstruktur angesehen. Dass sich die Bedeutung des Notch-Signalwegs dabei nicht nur auf die Chemoresistenzvermittlung beschränkt, untermauert eine Arbeit von Wang *et al.* (2010) an Glioblastomen und Glioblastomzelllinien. Diese zeigte zum einen, dass CD133-positive, potenzielle Tumorstammzellen zu endothelialen Zellen differenzieren können, um die Tumolvaskularisierung voranzutreiben, zum anderen konnte dieser Prozess durch Notch-Inhibition gehemmt werden<sup>(51)</sup>. Ein wichtiger Aspekt in diesem Zusammenhang ist jedoch, dass die verschiedenen Rezeptorparalogue unterschiedliche Funktionen im Tumor wahrnehmen könnten. In den hier untersuchten Resektaten war die Expression von *NOTCH1* gegenüber den zugehörigen prätherapeutischen Biopsien erniedrigt. Der gleichen Argumentation folgend spricht dies für eine erhöhte Chemosensitivität von *NOTCH1*-exprimierenden Tumorzellen und gegen die Eignung von *NOTCH1* als Tumorstammzellmarker. Somit verhalten sich die beiden Rezeptorparalogue unter der Chemotherapie unterschiedlich. Sollte die Inhibition des Notch-Signalwegs als therapeutische Option genutzt

werden, muss dieser Aspekt berücksichtigt werden. Besonders der Einsatz von  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren (GSI) in der Tumorthherapie könnte dadurch behindert werden. GSI sind aufgrund ihrer Erforschung als Alzheimertherapeutikum gut charakterisiert, jedoch wirken sie undifferenziert auf die Aktivität aller Notch-Paraloge<sup>(224)</sup>. Da aber divergente Funktionen der Rezeptorparaloge auch auf Grund der hier vorliegenden Daten anzunehmen sind, ist es nötig spezifischere Inhibitoren zu entwickeln, wie zum Beispiel paralogspezifische Antikörper<sup>(120)</sup>. Interessanterweise zeigten auch das Notch-Zielgen *HES1* sowie der Ligand *JAG1* eine ähnliche Expressionsveränderung wie *NOTCH1*, was für eine geringere Aktivität des Signalwegs nach der Chemotherapie spricht. Allerdings gibt es eine Vielzahl von Notch-Liganden und -Zielgenen<sup>(225,226)</sup>, so dass nicht auszuschließen ist, dass andere Komponenten des Signalwegs im Zusammenhang mit der vermehrten *NOTCH2*-Expression stärker aktiviert werden.

Der Transkriptionsfaktor POU5F1 wird als Regulator der Pluripotenz von Stammzellen angesehen und wird fast ausschließlich in Stammzellen während der Entwicklung exprimiert<sup>(60,61,92)</sup>. Auch für den Erhalt des Tumorstammzellphänotyps wird POU5F1 eine Funktion zugeschrieben<sup>(93-95)</sup>. Dabei scheint die exakte Regulation der *POU5F1*-Genexpression unter der Kontrolle von POU5F1 selbst und SOX2 eine entscheidende Rolle zu spielen, da in embryonalen Stammzellen eine Verringerung der *POU5F1*-Genexpression eine trophoektodermale Differenzierung einleitet, während eine Expressionserhöhung zu einer endodermalen/mesodermalen Differenzierung führt<sup>(92)</sup>. In den hier untersuchten Proben zeigte sich eine deutliche Erhöhung der *POU5F1*-Genexpression in den posttherapeutischen Resektaten. Dies könnte auf eine Anreicherung von *POU5F1*-exprimierenden, potenziellen Tumorstammzellen hindeuten. Für eine Bestätigung dieser Annahme wären immunhistochemische Untersuchungen nötig, mit deren Hilfe eine Anreicherung von POU5F1-exprimierenden Zellen von einer Expressionsinduktion abgegrenzt werden könnte. Unterstützt wird diese Sichtweise durch die bereits erwähnte Studie von Tsuchida *et al.* (2008), die in Osteosarkom-, Neuroblastom- und Rhabdomyosarkom-Zelllinien feststellten, dass *POU5F1*-exprimierenden SP-Zellen durch eine Cisplatin-Behandlung angereichert werden. Diese wiesen eine erhöhte Tumorigenität auf, auch gegenüber unbehandelten SP-Zellen<sup>(136)</sup>.

Die Expression von *FOXD3* war in den hier untersuchten Proben mit der Expression von *POU5F1*, *SOX2*, *LIN28* und *NANOG* korreliert. Ähnlich wie *POU5F1* scheint *FOXD3* eine wichtige Rolle für die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu spielen. Diese exprimieren *FOXD3* und sowohl die Erhöhung als auch die Erniedrigung der *FOXD3*-Genexpression führte zur Differenzierung der pluripotenten Stammzellen<sup>(227)</sup>. Die Expression von *FOXD3* kann auch durch POU5F1 reguliert werden<sup>(228)</sup>. Beim Magenkarzinom wird

besonders die epigenetische Herunterregulation der *FOXD3*-Expression mit Voranschreiten der *H. pylori*-assoziierten Karzinogenese in Verbindung gebracht<sup>(229)</sup>.

LGR5-positive Zellen werden als potenzielle Ursprungszellen für gastrointestinale Tumorerkrankungen angesehen<sup>(101,111,230)</sup> und Magenkarzinome weisen eine erhöhte *LGR5*-Genexpression gegenüber der normalen Schleimhaut auf<sup>(216)</sup>. Der Vergleich der prä- und posttherapeutischen Tumorproben in dieser Arbeit zeigte einen signifikanten Anstieg der *LGR5*-Genexpression in Resektaten mit TRG2 gegenüber den zugehörigen Biopsien. Dies weist auf eine Anreicherung von *LGR5*-positiven potenziellen Tumorstammzellen hin und steht im Einklang mit Untersuchungen an Kolorektalkarzinomen, die bei schlechterem Ansprechen auf die Chemotherapie eine höhere *LGR5*-Expression aufwiesen<sup>(231)</sup>. Andererseits wurde berichtet, dass Kolonkarzinomzellen als Reaktion auf eine Chemotherapie mit Irinotecan von einem *LGR5*-positiven Stammzellphänotyp zu einem *LGR5*-negativen chemoresistenten Phänotyp wechseln und dass dieser Prozess nach dem Ende der Therapie reversibel ist<sup>(232)</sup>. Ob es sich hier um eine Anreicherung von *LGR5*-positiven Zellen nach einer Chemotherapie oder eine Induktion der Expression handelt, wäre durch weiterführende immunhistochemische Untersuchungen zu klären.

Des Weiteren ist *LGR5* ein Zielgen des Wnt-Signalwegs und kann diesen über einen positiven Rückkopplungsmechanismus aktivieren<sup>(112)</sup>. Eine erhöhte Aktivität des Wnt-Signalwegs wird ebenfalls als Merkmal von (Tumor-) Stammzellen angesehen<sup>(100)</sup>. Von den weiteren hier untersuchten Wnt-Signalwegskomponenten *GSK3B* und *CTNNB1* sowie dem Wnt-Zielgen *CCND1* war die Expression von *CTNNB1* in Tumoren mit TRG2 nach der Chemotherapie tendenziell erhöht und die *CCND1*-Expression in Tumoren mit TRG3 verringert. Zellkultur-experimente an Ovarialkarzinomzellen zeigten, dass eine Herunterregulation der *CTNNB1*-Expression zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika, darunter auch Cisplatin, führte und gleichzeitig auch die Proliferationsfähigkeit der Zellen einschränkte<sup>(233)</sup>. Dies würde sich mit einer Anreicherung von *CTNNB1*-exprimierenden Zellen nach der Chemotherapie decken. Andererseits wurde für Magenkarzinome, wie oben bereits erwähnt, eine erhöhte Malignität bei niedrigerer *CTNNB1*-Expression beschrieben<sup>(190)</sup>.

Die Aktivität der *GSK3B* wurde mit der Wirkung von Zytostatika auf Tumorzellen in Verbindung gebracht, wobei *GSK3B*-Inhibitoren oder verstärkte *GSK3B*-Serin9-Phosphorylierung (Inaktivierung) zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Cisplatin führten<sup>(234,235)</sup>. In den hier untersuchten prä- und posttherapeutischen Tumorproben war die *GSK3B*-Genexpression durch die Chemotherapie nicht signifikant verändert, was dafür spricht, dass die Zellen unabhängig von ihrem *GSK3B*-Expressionsstatus durch die Chemotherapie betroffen waren. Dies muss kein widersprüchliches Ergebnis sein, da in den

oben genannten Studien die GSK3B-Aktivität untersucht wurde, während hier die Genexpression betrachtet wurde. Ausgehend von der Expression von *GSK3B* und *CTNNB1* kann nicht notwendigerweise auf deren Aktivität geschlossen werden. Die verringerte Genexpression von *CCND1* in Tumoren mit TRG3 legt jedoch nahe, dass der Wnt-Signalweg in den Tumoren mit einem schlechteren Therapieansprechen nach der Chemotherapie geringer aktiviert ist. In den Tumoren mit TRG2 konnte keine Veränderung der *CCND1*-Expression festgestellt werden, aber die Signalwegskomponente *CTNNB1* und das Zielgen *LGR5* waren verstärkt exprimiert, was für eine Aktivierung des Signalwegs spricht. Zusammengenommen zeichnen diese Ergebnisse ein unklares Bild des Zusammenhangs zwischen der Chemotherapie und der Aktivierung des Wnt-Signalwegs sowie der Expression von Wnt-Signalwegskomponenten als Merkmal von Tumorstammzellen.

Die *ABCG2*-Genexpression war mit einem besseren Überleben der Patienten assoziiert. Aufgrund der Eigenschaft von ABCG2 als MDR-Protein wäre eine Anreicherung von *ABCG2*-exprimierenden Zellen durch die neoadjuvante Chemotherapie zu erwarten gewesen. In den hier untersuchten Proben konnte jedoch keine signifikante Veränderung der *ABCG2*-Expression durch die Chemotherapie festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen, die eine erhöhte Expression von ABCG2 und anderen MDR-Proteinen nach neoadjuvanter Chemotherapie von Brustkrebs<sup>(236)</sup> und nach Cisplatin-Behandlung von Lungenkrebszellen beobachtet haben<sup>(237)</sup>. ABCG2 bestimmt auch den SP-Phänotyp von Magenkarzinomzellen, die als verstärkt tumorinitiierend und als angereichert mit Tumorstammzellen beschrieben wurden. Die Expression von *ABCG2* scheint jedoch nicht für die Tumorinitiationsfähigkeit von Magenkarzinom-SP-Zellen notwendig zu sein<sup>(238)</sup>. Demnach muss eine unveränderte *ABCG2*-Expression nicht im Widerspruch zu einer Anreicherung von Tumorstammzellen nach der Chemotherapie stehen.

Die *DNMT1*-Genexpression war in Tumoren mit TRG2 und TRG3 nach der Chemotherapie signifikant reduziert. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Expression von *DNMT1* die Tumoren gegenüber Chemotherapeutika sensibilisiert. Da DNMT1 bevorzugt in proliferierenden Zellen aktiv ist, könnte die hier gemachte Beobachtung auch Ausdruck der „Spezifität“ der Chemotherapie für teilungsaktive Zellen sein<sup>(197)</sup>. In embryonalen Stammzellen der Maus wird die Expression von *Dnmt1* benötigt um bei der Differenzierung die Expression von *Pou5f1* und *Nanog* zu unterbinden. *Dnmt1*<sup>-/-</sup>-embryonale Stammzellen sind zwar in der Lage zu differenzieren, die differenzierten *Dnmt1*<sup>-/-</sup>-Zellen exprimieren aber weiterhin in geringem Maße *Pou5f1* und *Nanog* und können wieder zu einem pluripotenten Stammzellphänotyp zurückkehren<sup>(239)</sup>. Bezogen auf diese Ergebnisse könnte eine geringere Expression von *DNMT1* in den residualen Tumorzellen auch Ausdruck einer Anreicherung von potenziellen Tumorstammzellen sein. Zudem verhält sich die

Expression von *POU5F1* in den posttherapeutischen Resektaten entgegengesetzt zu der *DNMT1*-Expression.

Zusammenfassend deutete besonders die erhöhte Expression von *POU5F1*, *LGR5*, *CTNNB1* und *NOTCH2* in den residualen Tumorzellen auf eine Anreicherung chemoresistenter potenzieller Tumorstammzellen hin. Eher gegen diese Annahme sprach die unveränderte Expression von *OLFM4* und *ABCG2*. Die verringerte Expression von *NOTCH1*, *JAG1* und *HES1* wies vor allem auf eine differenzielle Funktion der Notch-Paralogue in den residualen Tumorzellen hin, die bei einer darauf ausgerichteten therapeutischen Intervention beachtet werden muss. Die enge Korrelation der Expression von *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28*, *ASCL2* und *FOXD3* in den Tumorsektaten mit TRG2 weist darauf hin, dass es stammzellartige Populationen in den Tumoren geben könnte.

### 4.3.2 Expressionsanalysen auf Proteinebene

Die Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene waren naturgemäß nicht dazu geeignet zwischen einer relativen Anreicherung von Zellen mit spezifischem Expressionsmuster durch die Chemotherapie und einer reaktiven Expression der Gene in allen Zellen zu unterscheiden. Weiterhin konnte nicht ausgeschlossen werden, dass eine möglicherweise heterogene Verteilung der Expression in den Tumoren durch die kleinflächigen Biopsien verfälscht wiedergegeben wurde oder dass die analysierten Gene auch in Stromazellen, Lymphozyten oder Endothelien exprimiert wurden.

Besonders die Veränderung der *NOTCH2*-Expression war aufgrund der prognostischen Relevanz in primär resezierten und in neoadjuvant chemotherapierten Tumoren interessant, da eine hohe Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert war und der Notch-Signalweg somit eine potenzielle Zielstruktur für die Behandlung chemoresistenter residualer Tumorzellen darstellt. Um die oben genannten Fragen der Anreicherung, Heterogenität und Tumorspezifität der *NOTCH2*-Expression zu klären wurden immunhistochemische Färbungen für Notch2 durchgeführt. Gleichzeitig wurde auch die Proteinexpression von Notch1 auf die gleiche Weise untersucht, da die Signalwege der beiden Rezeptoren therapeutisch bedeutsame Gemeinsamkeiten aufweisen, die Expression in den Tumoren jedoch divergierte.

Die Färbung für Notch1 und Notch2 war fast ausschließlich auf Tumorzellen beschränkt. Stroma, Lymphozyten und Endothelien exprimierten keine erkennbaren Mengen Notch2 oder Notch1, lediglich Epithelzellen der Magenschleimhaut und des Plattenepithels des Ösophagus wurden teilweise in ähnlicher Stärke wie die Tumorzellen angefärbt. Da für die Expressionsanalysen auf den Ausschluss von nichtneoplastischer Magenschleimhaut und andere Epithelien geachtet wurde, konnte mit einiger Sicherheit davon ausgegangen werden,

dass die mRNA-Expressionswerte die Expression der Tumorzellen widerspiegeln. Der Vergleich der mRNA- und Proteinexpression von Notch1 und Notch2 in den 63 Resektaten mit TRG2 ergab nur für Notch1 eine signifikante Korrelation der beiden Expressionsebenen. Für Notch2 konnte keine entsprechende Korrelation festgestellt werden, dennoch zeigte sich eine Tendenz zu einer schlechteren Prognose bei stärkerer Notch2-Proteinexpression, ähnlich der zuvor auf mRNA-Ebene gefundenen Relation. Insgesamt ist die mangelnde Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Expression ein bekanntes Phänomen, welches im Allgemeinen auf unterschiedliche Stabilität und Umsatz der Molekülklassen zurückgeführt wird<sup>(178,240)</sup> und für die Notch-Proteine im Besonderen auch auf die proteolytische Spaltung und den Abbau des Rezeptors nach der Aktivierung zurückzuführen sein könnte<sup>(113)</sup>.

Eine membranständige Färbung wurde weder für Notch1 noch für Notch2 gefunden, obwohl dies die zu erwartende Lokalisation des Rezeptors wäre. Für eine Detektion der Moleküle mittels Immunhistochemie ist deren Dichte entscheidend. Der Notch-Signalweg wird durch Rezeptorinternalisierung reguliert und die Aktivierungsmethode durch proteolytische Spaltung führt zum einen bei Aktivierung zur Entfernung des Rezeptors von der Membran und zur lysosomalen Degradation und erfordert zum anderen die Neusynthese, welche im Zytoplasma/endoplasmatischem Retikulum stattfindet<sup>(113)</sup>. Bei einer dauerhaften Aktivierung des Signalweges wäre demnach der Großteil der Notch-Rezeptoren in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert. In der Literatur finden sich mehrere immunhistochemische Analysen, die eine vorrangig nukleäre und zytoplasmatische Expression von Notch1 und Notch2 zeigen, darunter auch im Magenkarzinom<sup>(241)</sup>, in Melanomen und im Nichtmelanomhautkrebs<sup>(206)</sup>, sowie in Plattenepithel- und Adenokarzinomen der Lunge<sup>(242)</sup> und der Zervix<sup>(243)</sup>. Die in der letztgenannten Studie verwendeten Antikörper sind die gleichen, die auch in dieser Arbeit für die immunhistochemischen Analysen eingesetzt wurden.

Die zytoplasmatische Notch2-Proteinexpression war nur in den neoadjuvant chemotherapierten Tumoren gegenüber den zugehörigen Biopsien signifikant verändert. In den primär resezierten Magenkarzinomen wurden dagegen keine entsprechenden Expressionsänderungen festgestellt. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die beobachteten Expressionsunterschiede zufällig durch die Biopsieentnahme bedingt wurden. Anders stellten sich die Veränderungen der nukleären Färbung für Notch2 dar. Diese konnte nicht als chemotherapiespezifisch eingestuft werden, da sowohl in den chemotherapierten Tumoren, als auch in den nichtchemotherapierten Kontrollen eine starke Reduktion der Kernfärbung in den Resektaten auftrat. Dies könnte auf Unterschiede in der Fixierung zwischen den Biopsien und Resektaten<sup>(244)</sup> im Zusammenhang mit der kurzen Halbwertszeit von Notch-ICD-Proteinen beruhen<sup>(245)</sup>. Für die Notch1-Proteinexpression konnte keine diesbezügliche



Aussage getroffen werden, da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Biopsien und den Resektaten ergaben.

Dass die zytoplasmatische Notch2-Färbeintensität in den chemotherapierten Tumoren anstieg und nicht der Anteil Notch2-positiver Zellen, sprach gegen eine Anreicherung eines durch die Notch2-Expression gekennzeichneten Zelltyps und eher für eine Induktion oder Verstärkung der Expression als Reaktion auf die Chemotherapie. Somit konnte zwar nicht sicher davon ausgegangen werden, dass Notch2-exprimierende Zellen eine *per se* größere Resistenz gegenüber der Chemotherapie aufwiesen, Notch2 scheint jedoch an der Reaktion der Tumorzellen auf die Behandlung involviert zu sein.

#### 4.4 Bedeutung von Notch1 und Notch2 für die Chemotherapieresistenz und Tumorstammzelleigenschaften von Magenkarzinomzelllinien

Die Genexpressionsanalysen legten nahe, dass die Expression von *NOTCH1* und *NOTCH2* durch die Chemotherapie beeinflusst wird. Daher wurden *NOTCH1*- und *NOTCH2*-*Knockdown*-Zelllinien generiert, um zu überprüfen, ob es Hinweise auf funktionelle Zusammenhänge zwischen der *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression und der Chemosensitivität von Magenkarzinomzellen gibt.

Für den *Knockdown* wurde die RNA-Interferenz genutzt. Dieses endogene System der Genexpressionskontrolle erkennt doppelsträngige RNA, verarbeitet diese zu *small interfering* (si)-RNA und bewirkt eine sequenzspezifische Translationsinhibition, indem die zur siRNA komplementäre mRNA gebunden und degradiert wird. Hier wurde eine lentiviral vermittelte Transfektion eines *short hairpin* (sh)-RNA-Konstrukts gewählt. Diese Methode hat gegenüber der direkten Transfektion mit siRNA den Vorteil, dass das Konstrukt dauerhaft in die DNA integriert wird und so langfristige Untersuchungen an den Zellen vorgenommen werden können (Monate statt Tage)<sup>(246)</sup>. Ein Nachteil der Methode ist, dass durch die Insertion in die DNA der Zielzellen die Transkription von Genen im Bereich der Insertion gestört werden kann oder die Effektivität des *Knockdowns* beeinträchtigt wird. Die Lokalisation und damit die transkriptionellen Konsequenzen können bei dem verwendeten System nicht vorhergesagt werden. Weiterhin kann es Nebeneffekte geben, wenn die siRNA an mehreren mRNAs binden kann<sup>(246)</sup>. Diesen Aspekten sollte durch die *bulk selection* mit Puromycin, die Verwendung validierter Inserts und eine Kontrolltransfektion mit einem nicht spezifischen Insert begegnet werden. Die *bulk selection* dient in erster Line der Selektion von transfizierten Zellen und der Verlängerung der Dauer des *Knockdowns*. Dabei wird keine klonale Selektion durchgeführt, so dass ein zufälliges Verteilungsmuster der Insertionsstellen resultiert.

Dadurch wurde zwar die maximale *Knockdown*-Effizienz unter Umständen reduziert, die Nebenwirkungen durch die Insertion wurden jedoch minimiert. Die Kontrolltransfektion wirkt als ideale Kontrolle für unspezifische Nebenwirkungen, da die Insertion des unspezifischen shRNA-Konstrukts in die DNA der Kontrollzelllinie ebenfalls zufällig verteilt ist. Die Konstrukte selbst sind vom Hersteller bezüglich der Spezifität validiert <sup>(247)</sup>.

Die Effektivität des hier durchgeführten *Knockdowns* war mit etwa 50 % Restaktivität auf mRNA-Ebene und etwa 25 bis 30 % Restexpression auf Proteinebene vergleichbar mit anderen Arbeiten <sup>(237,248,249)</sup>. Die reduzierte Expression von *NOTCH1* oder *NOTCH2* interferierte nicht mit vitalen Prozessen, da sich die *Knockdown*-Zelllinien weder morphologisch, noch in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit von der Kontrollzelllinie unterschieden. Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungen, bei denen der *Knockdown* von verschiedenen Komponenten des Notch-Signalwegs, darunter auch *NOTCH1* und *NOTCH2*, in Glioblastomzelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit führte <sup>(250)</sup>. Andererseits könnte die *Knockdown*-Effizienz hier zu gering sein oder Glioblastome und Glioblastomzelllinien sind in besonderem Maße von Notch-Signalen abhängig, wie sich durch eine Anzahl ähnlicher Publikationen andeutet <sup>(204,251,252)</sup>.

Die *NOTCH1-Knockdown*-Zelllinien waren im XTT-Test resistenter gegenüber Cisplatin und wurden durch die Behandlung weniger stark in der Koloniebildung gestört als die Kontrollzelllinie. Das entsprach den in den Tumoren erhobenen mRNA-Expressionsdaten, bei denen nach Chemotherapie eine verringerte *NOTCH1*-Expression gemessen wurde. Diese Reduktion könnte auf die bevorzugte Zerstörung *NOTCH1*-exprimierender Zellen zurückzuführen sein. Im Gegensatz dazu gibt es verschiedene Berichte, die eine erhöhte Expression oder Aktivierung von Notch1 mit einer erhöhten Chemosensitivität gegenüber Cisplatin und anderen Agenzien in Verbindung bringen <sup>(117,118,237,253)</sup>. Bei Behandlung mit 5-Fluorouracil zeigte sich eine höhere Sensitivität der *NOTCH1-Knockdown*-Zelllinien im Koloniebildungsassay. Ähnliches wurde vor kurzem für Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus gezeigt <sup>(253)</sup>. Liu *et al.* (2013) zeigten nicht nur eine höhere Resistenz in einer Notch1-exprimierenden Zelllinie im Vergleich mit einer Notch1-negativen Zelllinie (Proteinebene), sondern konnten auch die Notch1-positive Zelllinie durch *NOTCH1-Knockdown* für 5-Fluorouracil sensibilisieren <sup>(253)</sup>. Im XTT-Test wurde dagegen keine signifikante Veränderung der Chemosensitivität gegenüber 5-Fluorouracil festgestellt. Dies könnte einerseits an der kürzeren Inkubationszeit gelegen haben, andererseits fließen bei den XTT-Tests durch die Messung der metabolischen Aktivität Stressfaktoren stärker in das Ergebnis ein <sup>(254)</sup>, während im Koloniebildungsassay die Proliferationsfähigkeit der Zellen ausschlaggebend für die Anzahl der Kolonien ist.

Die entsprechenden Versuche mit *NOTCH2-Knockdown*-Zelllinien zeigten, dass diese Zellen im XTT-Test resistenter gegenüber der Behandlung mit Cisplatin waren, während in der Koloniebildung keine Unterschiede zu den Kontrollzelllinien messbar waren. Gegenüber 5-Fluorouracil war eine *NOTCH2-Knockdown*-Zelllinie (N2<sup>94</sup>) im Koloniebildungstest signifikant sensitiver als die Kontrollzelllinie. Für die Zelllinie mit dem zweiten Konstrukt (N2<sup>95</sup>) konnte lediglich ein entsprechender Trend festgestellt werden. Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse dennoch für eine erhöhte Sensitivität gegenüber 5-Fluorouracil bei verringerter *NOTCH2*-Expression.

Insgesamt lässt sich ableiten, dass die geringere Expression von *NOTCH1* oder *NOTCH2* in der untersuchten Zelllinie in unterschiedlichem Maße die Sensitivität gegenüber Cisplatin und 5-Fluorouracil beeinflusst. Eine Studie an 37 Magenkarzinomzelllinien identifizierte zwei genomische Subtypen, deren spezifische Genexpressionsmuster prognostisch für das Überleben von Magenkarzinompatienten war. Diese Subgruppen unterschieden sich interessanterweise auch hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber 5-Fluorouracil und Cisplatin; die eine Gruppe war sensitiv für 5-Fluorouracil und resistent gegenüber Cisplatin, bei der anderen Gruppe waren die Verhältnisse umgekehrt<sup>(255)</sup>. Dies ähnelt den hier gemachten Beobachtungen auf Basis einer veränderten *NOTCH1* und *NOTCH2*-Expression.

Die hier erstellten Resistenzmuster der *NOTCH1*- und *NOTCH2-Knockdown*-Zelllinien spiegeln die in den Tumorproben gemessenen Expressionsveränderungen nicht vollständig wider, bei denen nach der Chemotherapie *NOTCH2* erhöht und *NOTCH1* verringert exprimiert war. Zum einen wurde hier nur eine Zelllinie untersucht, wodurch die Inhomogenitäten der Tumoren nicht wiedergegeben wurden, zum anderen beruhten die Zellkulturexperimente auf der Behandlung mit den Einzelsubstanzen. Die Behandlung der untersuchten Patienten erfolgte dagegen mit einer Kombination aus Platin-basierten Chemotherapeutika und 5-Fluorouracil. Wie die beiden Agenzien gemeinsam auf die *NOTCH1*- und *NOTCH2-Knockdown*-Zelllinien wirken, muss in weiteren Versuchen untersucht werden. Möglich wäre auch, dass der Zeitrahmen der Behandlung die Bedingungen *in vivo* nur unzureichend widerspiegelte. Mit 48 h beziehungsweise 5 d waren die Behandlungszeiträume in den Zellkulturexperimenten verhältnismäßig kurz gegenüber den Chemotherapiezyklen, denen die Tumoren ausgesetzt waren (circa 6 Wochen je Zyklus, siehe Tab. 1). Um den Einfluss einer Langzeitbehandlung mit Chemotherapeutika auf den Notch-Signalweg zu untersuchen wären andere Modelle, wie zum Beispiel resistente Subzelllinien geeigneter. Eine dritte Möglichkeit ist, dass die Tumorzellen, wie aus der immunhistochemischen Analyse der Tumoren ersichtlich wurde, während oder nach der Chemotherapie die *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Expression als Reaktion auf die veränderten Bedingungen regulieren. Die *NOTCH*-Expression als Reaktion auf eine Chemotherapie wäre

also getrennt von einer Wirkung der *NOTCH*-Expression auf die Chemoresistenz zu betrachten. Zuletzt ist ein Zellkulturmodell ein hochgradig artifizielles System, das die Bedingungen *in vivo* nur unzureichend abbilden kann.

Entsprechend der Ergebnisse der Proliferationsanalysen zeigten sich in der Zellzyklusverteilung der unbehandelten *Knockdown*-Zellen keine Unterschiede gegenüber der Kontrollzelllinie. Nach 24 h Cisplatinbehandlung verschoben sich die Zellzyklusphasen in allen Zelllinien, hin zu einem S- und G<sub>2</sub>/M-Phase-Arrest. Somit ist die Inaktivierung der Zellzyklus-Kontrollpunkte eventuell kein Resistenzmechanismus der durch Notch1 und Notch2 gesteuert wird. Es kommen aber noch andere Mechanismen wie Apoptoseinhibition, verbesserte DNA-Reparatur oder Verhinderung der Interaktion zwischen Cisplatin und der DNA in Frage<sup>(176)</sup>. Andererseits wurde bereits beschrieben, dass ein *NOTCH1-Knockdown* zu einem G<sub>1</sub>-Arrest in Pankreaskarzinomzellen führt<sup>(256)</sup>, wofür hier jedoch keine Anhaltspunkte gefunden wurden.

Um weitere Möglichkeiten zur Untersuchung von Zusammenhängen zwischen der Expression von *NOTCH1* und *NOTCH2* und einem möglichen Tumorstammzellphänotyp zu nutzen, wurden zwei häufig verwendete Zellkultursysteme zur Identifikation und Charakterisierung von Tumorstammzellen geprüft.

SP-Analysen wurden vielfach angewandt um Stammzellen und Tumorstammzellen, auch von gastrointestinalen Tumoren, zu identifizieren oder zu charakterisieren. Dabei wurde mehrfach festgestellt, dass die SP-Zellen mit stammzellähnlichen Zellen angereichert sind oder, im Fall von Tumor-SP-Zellen, erhöhte Tumorigenität besitzen<sup>(56,133-135)</sup>. Andere Autoren stellen jedoch den Nutzen von SP-Zellen als Surrogatmarker für (Tumor-) Stammzellen in Frage, da sie nur geringe Unterschiede zwischen SP- und nicht-SP-Zellen bezüglich der Tumorigenität beziehungsweise Koloniebildung feststellen konnten<sup>(257-259)</sup>.

In dieser Arbeit konnten in vier Zelllinien SP-Zellen identifiziert werden (SNU5, MKN1, MKN28 und MKN45) während in drei weiteren Zelllinien keine SP-Zellen gefunden wurden (AGS, HS746T, KatoIII). Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit und der Resistenz gegenüber Cisplatin zwischen den SP-Zellen und den nicht-SP-Zellen feststellbar. Einzig die leicht erhöhte Koloniebildungs-Effizienz der SP-Zellen sowie die Anreicherung von SP-Zellen nach Cisplatinbehandlung deuteten einen Unterschied im Sinne einer erhöhten Tumorinitiationsfähigkeit und Chemoresistenz an.

Die reproduzierbare Nutzbarkeit dieser Methode hängt von vielen technischen Aspekten ab. Einerseits ist der Anteil der SP-Zellen von der eingesetzten Hoechst33342-Konzentration abhängig und daher eine möglichst hohe Konzentration für eine stringente Selektion zu wählen<sup>(173,260)</sup>, andererseits konnten nur mit geringeren Konzentrationen ausreichende

Zellzahlen für nachfolgende Analysen isoliert werden. Dadurch kam es eventuell zur Verunreinigung der SP-Population mit nicht-SP-Zellen. Die Wirksamkeit der ABC-Transporter-Inhibitoren ist nicht immer vollständig<sup>(173)</sup> und in den hier durchgeführten Untersuchungen musste aufgrund der nachlassenden Wirksamkeit von Verapamil zu Fumitremorgin C gewechselt werden. Die Eingrenzung der SP-Zellen in den Dichte-Diagrammen ist zudem ein subjektiver Prozess, da die Übergänge fließend sind und durch die teilweise geringen SP-Anteile nicht immer klar definierte Punktwolken gebildet werden<sup>(261)</sup>.

Insgesamt waren die gemessenen Unterschiede hinsichtlich der Tumorstammzeleigenschaften zwischen den SP- und nicht-SP-Zellen und die Reproduzierbarkeit der Experimente zu gering sowie der technische Aufwand zur Isolation ausreichender Zellzahlen mit hinreichender Qualität zu groß um die SP-Analysen fortzusetzen.

Als weiteres Zellkultursystem zur Charakterisierung von Tumorstammzeleigenschaften wurde die Bildung von Tumorsphäroiden aus Magenkarzinomzelllinien untersucht. Da die Sphäroidbildung in dieser Arbeit genutzt werden sollte um das Tumoringitionspotential von Magenkarzinomzellen zu untersuchen, wurde auf mechanische Methoden zur Sphäroidbildung<sup>(139)</sup> verzichtet und stattdessen die Anzahl der spontan gebildeten Sphäroide unter nichtadhärenten Zellkulturbedingungen in einem definierten Medium gezählt<sup>(76,161)</sup>.

Unter den gewählten Bedingungen bildeten MKN28- und MKN45-Zellen spontan Sphäroide. Auch andere Autoren konnten mit diesen Zelllinien Sphäroide erzeugen (MKN28, mechanisch<sup>(262)</sup>; MKN45, spontan und mechanisch<sup>(76,262,263)</sup>) Im Gegensatz zu einer Publikation von Ji *et al.* (2008) konnte bei den KatoIII-Zellen keine Sphäroidbildung beobachtet werden, obwohl hier die gleichen Bedingungen eingesetzt wurden<sup>(161)</sup>.

Die Zelllinie MKN28 bildete reproduzierbar Sphäroide und das Verfahren wurde daher für die Charakterisierung der *NOTCH1* und *NOTCH2-Knockdown*-Zelllinien eingesetzt. Hierbei konnten keine Unterschiede in der Sphäroidbildung der *Knockdown*-Zelllinien untereinander sowie im Vergleich mit der Kontrollzelllinie festgestellt werden. Auch unter Cisplatinbehandlung wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Ausgehend von der Literatur wäre zu erwarten gewesen, dass die *Knockdown*-Zelllinien eine verringerte Sphäroidbildung aufweisen müssten. So konnten mehrere Studien zeigen, dass Notch-Signalweg-Inhibitoren die Bildung von Glioblastom-Neurosphären<sup>(250,251)</sup>, sowie die Sphäroidbildung im duktalem *carcinoma in situ* der Brust<sup>(264)</sup>, im oralen Plattenepithelkarzinom<sup>(265)</sup> und im hepatozellulären Karzinom<sup>(266)</sup> hemmen. Tchorz *et al.* (2012) wiesen eine erhöhte Proliferation und Chemoresistenz in Notch2-NICD-überexprimierenden Neurosphären nach<sup>(204)</sup>. Die Bedeutung des Notch-Signalwegs für Magenkarzinom-Sphäroide wurde bisher nur indirekt durch Expression der mikro-RNA (miR)-34 in Zelllinien untersucht.

MiR-34 ist ein negativer Regulator der *NOTCH*-Expression und reduzierte die Sphäroidbildung von KatoIII- und MKN45-Zellen<sup>(161)</sup>. Insgesamt lassen diese Studien den Schluss zu, dass die Inhibition von Notch-Signalen die Sphäroidbildung hemmt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind dagegen nicht eindeutig, was möglicherweise an einer unzureichenden *Knockdown*-Effizienz oder Unterschiede in den Versuchsanordnungen liegen könnte.

Zusammenfassend deuteten die Untersuchungen an *NOTCH1*- und *NOTCH2*-*Knockdown*-Zelllinien an, dass die Expression der Notch-Rezeptoren unterschiedliche Auswirkungen auf die Chemoresistenz von Magenkarzinomzelllinien hat. So führte der *NOTCH1*-*Knockdown* zu einer erhöhten 5-Fluorouracil-Sensitivität bei erhöhter Cisplatin-Resistenz. Der *NOTCH2*-*Knockdown* führte zu ähnlichen Sensitivitätsänderungen, jedoch überwog die erhöhte Sensitivität gegen 5-Fluorouracil im Koloniebildungsassay während im gleichen Assay keine Veränderung der Cisplatin-Resistenz auftrat. Die Beobachtungen im Tumor wurden durch die *in vitro*-Versuche nicht vollständig widerspiegeln. Als eine mögliche Ursache kommt die Verwendung einer einzelnen Zelllinie im Gegensatz zu der Heterogenität der analysierten Magenkarzinome in Frage. Weiterhin wurde nur die Wirkung der Einzelsubstanzen betrachtet. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die kombinatorische Wirkung von 5-Fluorouracil und Cisplatin, wie sie in der Behandlung der Tumore angewendet wurde, da sich in den Zellkulturexperimenten gegenteilige Effekte der beiden Substanzen in Abhängigkeit von der *NOTCH*-Expression andeuteten. Ebenso wäre die Wirkung der Zytostatikabehandlung auf die Expression der chemoresistenzassoziierten Gene von Interesse, um Aufschluss über mögliche Mechanismen der Resistenzentwicklung in Magenkarzinomzellen zu erhalten. Hierzu wäre eine langfristige Behandlung der Zelllinien mit Cisplatin und/oder 5-Fluorouracil denkbar um eine Selektion resistenter Zelllinien zu bewirken. Diese könnten dann im direkten Vergleich mit den parental Zelllinien analysiert werden.

## 4.5 Fazit und Ausblick

Ein wesentliches Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit ist die Identifikation einer prognostischen Genexpressionssignatur aus hoher *GSK3B*-, hoher *CTNNB1*- und niedriger *NOTCH2*-Expression in Tumorresektaten mit TRG2, die für eine gute Prognose steht. Die prognostische Wertigkeit dieser Signatur wurde durch ihre Anwendbarkeit in einem unabhängigen, nicht chemotherapierten Patientenkollektiv unterstrichen. Dabei zeigte sich, dass diese Signatur zumindest teilweise unabhängig von der Chemotherapie ist und vielmehr eine generelle prognostische Relevanz haben könnte.

Eine Validierung der Expressionssignatur an weiteren unabhängigen Patientenkollektiven mit primär resezierten sowie neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen könnte zur Entwicklung eines „Prognosescores“ führen. Dieser könnte durch eine Risikostratifizierung Therapieentscheidungen unterstützen, zum Beispiel bezüglich der Gabe einer adjuvanten Chemotherapie nach erfolgter Operation.

Die vergleichenden Genexpressionsanalysen zwischen korrespondierenden prä- und posttherapeutischen Magenkarzinomproben ergaben folgende Hauptaspekte: erstens war die Expression der Tumorstammzellmarker *LGR5* und *POU5F1* in den residualen Tumorzellen erhöht. Dies wäre mit einer Anreicherung von *POU5F1*- und *LGR5*-exprimierenden potenziellen Tumorstammzellen in residualen Tumoren nach neoadjuvanter Chemotherapie vereinbar. Durch weiterführende, immunhistochemische Analysen könnte diese Theorie untermauert werden. Zweitens war die Expression von *NOTCH1* und *NOTCH2* nach der Chemotherapie gegensätzlich verändert, was auf divergierende Funktionen des Notch-Signalwegs hinwies.

Durch die immunhistochemischen Analysen und die *in vitro*-Untersuchungen zeigte sich, dass die Notch2-Proteinexpression in den Tumoren chemotherapieassoziiert erhöht war und dass die *NOTCH1*- und *NOTCH2*-Genexpression die Chemoresistenz von Magenkarzinomzellen beeinflusste. Die genaue Kenntnis der zugrunde liegenden Wechselwirkungen zwischen der Chemotherapie und dem Notch-Signalweg könnte neue therapeutische Angriffspunkte in der Behandlung von lokal fortgeschrittenen Magenkarzinomen aufzeigen. Hierzu sind weitere funktionelle Analysen, zum Beispiel mit einem geeigneten Chemoresistenz-Zellkulturmodell nötig. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf den möglicherweise divergierenden Funktionen der Notch-Signalwegkomponenten liegen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Rindi, G., Leiter, A.B., Kopin, A.S., Bordi, C. and Solcia, E. The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences. *Ann N Y Acad Sci* **1014**, 1-12 (2004).
2. Fenoglio-Preiser, C.M. *Gastrointestinal pathology : an atlas and text* (Raven Press, New York, 1989).
3. Rao, J.N. and Wang, J.Y. *Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth* (Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA), 2010).
4. RKI/GEKID (ed.) *Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe* (Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Berlin, Saarbrücken, 2012).
5. Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**, 2893-917 (2010).
6. Parkin, D.M. International variation. *Oncogene* **23**, 6329-40 (2004).
7. Correa, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* **52**, 6735-40 (1992).
8. HCCG. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* **49**, 347-53 (2001).
9. Wu, A.H., Wan, P. and Bernstein, L. A multiethnic population-based study of smoking, alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States). *Cancer Causes Control* **12**, 721-32 (2001).
10. Cho, Y., Lee, D.H., Oh, H.S., Seo, J.Y., Kim, N., Jeong, S.H. *et al.* Higher prevalence of obesity in gastric cardia adenocarcinoma compared to gastric non-cardia adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* **57**, 2687-92 (2012).
11. Lindblad, M., Rodriguez, L.A. and Lagergren, J. Body mass, tobacco and alcohol and risk of esophageal, gastric cardia, and gastric non-cardia adenocarcinoma among men and women in a nested case-control study. *Cancer Causes Control* **16**, 285-94 (2005).
12. Epplein, M., Nomura, A.M., Hankin, J.H., Blaser, M.J., Perez-Perez, G., Stemmermann, G.N. *et al.* Association of *Helicobacter pylori* infection and diet on the risk of gastric cancer: a case-control study in Hawaii. *Cancer Causes Control* **19**, 869-77 (2008).
13. Epplein, M., Shu, X.O., Xiang, Y.B., Chow, W.H., Yang, G., Li, H.L. *et al.* Fruit and vegetable consumption and risk of distal gastric cancer in the Shanghai Women's and Men's Health studies. *Am J Epidemiol* **172**, 397-406 (2010).
14. Joossens, J.V., Hill, M.J., Elliott, P., Stamler, R., Lesaffre, E., Dyer, A. *et al.* Dietary salt, nitrate and stomach cancer mortality in 24 countries. European Cancer Prevention (ECP) and the INTERSALT Cooperative Research Group. *Int J Epidemiol* **25**, 494-504 (1996).
15. Sjodahl, K., Lu, Y., Nilsen, T.I., Ye, W., Hveem, K., Vatten, L. *et al.* Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer* **120**, 128-32 (2007).
16. Palli, D., Galli, M., Caporaso, N.E., Cipriani, F., Decarli, A., Saieva, C. *et al.* Family history and risk of stomach cancer in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **3**, 15-8 (1994).
17. Carneiro, F., Oliveira, C. and Seruca, R. Pathology and genetics of familial gastric cancer. *Int J Surg Pathol* **18**, 33S-36S (2010).
18. Fitzgerald, R.C., Hardwick, R., Huntsman, D., Carneiro, F., Guilford, P., Blair, V. *et al.* Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J Med Genet* **47**, 436-44 (2010).
19. Keller, G., Vogelsang, H., Becker, I., Hutter, J., Ott, K., Candidus, S. *et al.* Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol* **155**, 337-42 (1999).
20. Grady, W.M., Willis, J., Guilford, P.J., Dunbier, A.K., Toro, T.T., Lynch, H. *et al.* Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in



- hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* **26**, 16-7 (2000).
21. Oliveira, C., Sousa, S., Pinheiro, H., Karam, R., Bordeira-Carrico, R., Senz, J. *et al.* Quantification of epigenetic and genetic 2nd hits in CDH1 during hereditary diffuse gastric cancer syndrome progression. *Gastroenterology* **136**, 2137-48 (2009).
  22. Becker, K.F., Atkinson, M.J., Reich, U., Becker, I., Nekarda, H., Siewert, J.R. *et al.* E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* **54**, 3845-52 (1994).
  23. Lynch, H.T., Lynch, P.M., Lanspa, S.J., Snyder, C.L., Lynch, J.F. and Boland, C.R. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* **76**, 1-18 (2009).
  24. Watson, P. and Lynch, H.T. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* **71**, 677-85 (1993).
  25. van Lier, M.G., Wagner, A., Mathus-Vliegen, E.M., Kuipers, E.J., Steyerberg, E.W. and van Leerdam, M.E. High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations. *Am J Gastroenterol* **105**, 1258-64; author reply 1265 (2010).
  26. Masciari, S., Dewanwala, A., Stoffel, E.M., Lauwers, G.Y., Zheng, H., Achatz, M.I. *et al.* Gastric cancer in individuals with Li-Fraumeni syndrome. *Genet Med* **13**, 651-7 (2011).
  27. Brenner, H., Rothenbacher, D. and Arndt, V. Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol* **472**, 467-77 (2009).
  28. Siewert, J.R., Stein, H.J., Sendler, A. and Fink, U. Surgical resection for cancer of the cardia. *Semin Surg Oncol* **17**, 125-31 (1999).
  29. Siewert, J.R., Stein, H.J. and Feith, M. Adenocarcinoma of the esophago-gastric junction. *Scand J Surg* **95**, 260-9 (2006).
  30. Bruns, C.J. (ed.) *Gastrointestinale Tumoren* (Tumorzentrum München, München, 2010).
  31. Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K. and Wittekind, C. (eds.) *TNM classification of malignant tumours* (7th Edition) (Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, 2009).
  32. Hamilton, S.R. and Aaltonen, L.A. (eds.) *World Health Organization Classification of Tumours* (IARC Press, Lyon, 2000).
  33. Laurén, P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* **64**, 31-49 (1965).
  34. Siewert, J.R., Bottcher, K., Stein, H.J. and Roder, J.D. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg* **228**, 449-61 (1998).
  35. Verdecchia, A., Mariotto, A., Gatta, G., Bustamante-Teixeira, M.T. and Ajiki, W. Comparison of stomach cancer incidence and survival in four continents. *Eur J Cancer* **39**, 1603-9 (2003).
  36. Lordick, F. and Siewert, J.R. Recent advances in multimodal treatment for gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* **8**, 78-85 (2005).
  37. Ott, K., Sendler, A., Becker, K., Dittler, H.J., Helmberger, H., Busch, R. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy with cisplatin, 5-FU, and leucovorin (PLF) in locally advanced gastric cancer: a prospective phase II study. *Gastric Cancer* **6**, 159-67 (2003).
  38. Reece-Smith, A.M., Saha, S., Cunnell, M.L., Hameed, K., Bessell, E.M., Duffy, J.P. *et al.* MAGIC in practice: Experience of peri-operative ECF/X chemotherapy in gastro-esophageal adenocarcinomas. *J Surg Oncol*, doi: 10.1002/jso.23187. [Epub ahead of print] (2012).
  39. Cunningham, D., Allum, W.H., Stenning, S.P., Thompson, J.N., Van de Velde, C.J., Nicolson, M. *et al.* Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* **355**, 11-20 (2006).
  40. De Vita, F., Giuliani, F., Galizia, G., Belli, C., Aurilio, G., Santabarbara, G. *et al.* Neo-adjuvant and adjuvant chemotherapy of gastric cancer. *Ann Oncol* **18 Suppl 6**, vi120-3 (2007).
  41. Becker, K., Langer, R., Reim, D., Novotny, A., Meyer zum Buschenfelde, C., Engel, J. *et al.* Significance of histopathological tumor regression after neoadjuvant chemotherapy in gastric adenocarcinomas: a summary of 480 cases. *Ann Surg* **253**, 934-9 (2011).
  42. Ychou, M., Boige, V., Pignon, J.P., Conroy, T., Bouche, O., Lebreton, G. *et al.* Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCO multicenter phase III trial. *J Clin Oncol* **29**, 1715-21 (2011).
  43. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23-8 (1976).
  44. Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M. *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**, 525-32 (1988).
  45. Clevers, H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* **17**, 313-9 (2011).
  46. Pierce, G.B. and Wallace, C. Differentiation of malignant to benign cells. *Cancer Res* **31**, 127-34 (1971).
  47. Orkin, S.H. and Zon, L.I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* **132**, 631-644 (2008).
  48. van der Flier, L.G. and Clevers, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* **71**, 241-60 (2009).

49. Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L. *et al.* Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* **66**, 9339-44 (2006).
50. Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T. *et al.* Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* **468**, 824-8 (2010).
51. Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K.E., Geber, A. *et al.* Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* **468**, 829-33 (2010).
52. Sugihara, E. and Saya, H. Complexity of cancer stem cells. *Int J Cancer* **132**, 1249-59 (2012).
53. Pece, S., Tosoni, D., Confalonieri, S., Mazzarol, G., Vecchi, M., Ronzoni, S. *et al.* Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. *Cell* **140**, 62-73 (2010).
54. Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.F. *et al.* Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* **100**, 672-9 (2008).
55. Chen, J., Li, Y., Yu, T.S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G. *et al.* A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* **488**, 522-6 (2012).
56. McAuliffe, S.M., Morgan, S.L., Wyant, G.A., Tran, L.T., Muto, K.W., Chen, Y.S. *et al.* Targeting Notch, a key pathway for ovarian cancer stem cells, sensitizes tumors to platinum therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E2939-48 (2012).
57. Visvader, J.E. Cells of origin in cancer. *Nature* **469**, 314-22 (2011).
58. Vries, R.G., Huch, M. and Clevers, H. Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol* **4**, 373-84 (2010).
59. Shackleton, M., Quintana, E., Fearon, E.R. and Morrison, S.J. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* **138**, 822-9 (2009).
60. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-72 (2007).
61. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-20 (2007).
62. Roesch, A., Fukunaga-Kalabis, M., Schmidt, E.C., Zabierowski, S.E., Brafford, P.A., Vultur, A. *et al.* A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* **141**, 583-94 (2010).
63. Vermeulen, L., De Sousa, E.M.F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J.H., Borovski, T. *et al.* Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* **12**, 468-76 (2010).
64. Liu, S., Ginestier, C., Ou, S.J., Clouthier, S.G., Patel, S.H., Monville, F. *et al.* Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res* **71**, 614-24 (2011).
65. Chaffer, C.L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A.J., Wiggins, P.A., Rodrigues, L.O. *et al.* Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7950-5 (2011).
66. Gupta, P.B., Fillmore, C.M., Jiang, G., Shapira, S.D., Tao, K., Kuperwasser, C. *et al.* Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* **146**, 633-44 (2011).
67. Cabarcas, S.M., Mathews, L.A. and Farrar, W.L. The cancer stem cell niche--there goes the neighborhood? *Int J Cancer* **129**, 2315-27 (2011).
68. Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E. *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* **366**, 883-92 (2012).
69. Dieter, S.M., Ball, C.R., Hoffmann, C.M., Nowrouzi, A., Herbst, F., Zavidij, O. *et al.* Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases. *Cell Stem Cell* **9**, 357-65 (2011).
70. Baccelli, I. and Trumpp, A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol* **198**, 281-93 (2012).
71. Vermeulen, L., de Sousa e Melo, F., Richel, D.J. and Medema, J.P. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol* **13**, e83-9 (2012).
72. Saikawa, Y., Fukuda, K., Takahashi, T., Nakamura, R., Takeuchi, H. and Kitagawa, Y. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis. *Gastric Cancer* **13**, 11-24 (2010).
73. Buczaccki, S.J., Zecchini, H.I., Nicholson, A.M., Russell, R., Vermeulen, L., Kemp, R. *et al.* Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* **495**, 65-9 (2013).
74. Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H.J., van Es, J.H. *et al.* Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* **6**, 25-36 (2010).
75. Houghton, J., Stoicov, C., Nomura, S., Rogers, A.B., Carlson, J., Li, H. *et al.* Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* **306**, 1568-71 (2004).
76. Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S.S., Shibata, W., Vigneshwaran, R. *et al.*

- Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* **27**, 1006-20 (2009).
77. Zhang, C., Li, C., He, F., Cai, Y. and Yang, H. Identification of CD44+CD24+ gastric cancer stem cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **137**, 1679-86 (2011).
  78. Rocco, A., Liguori, E., Pirozzi, G., Tirino, V., Compare, D., Franco, R. *et al.* CD133 and CD44 cell surface markers do not identify cancer stem cells in primary human gastric tumors. *J Cell Physiol* **227**, 2686-93 (2012).
  79. Singh, S.R. Gastric cancer stem cells: A novel therapeutic target. *Cancer Lett* (2013).
  80. Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821-8 (2003).
  81. Adini, A., Adini, I., Ghosh, K., Benny, O., Pravda, E., Hu, R. *et al.* The stem cell marker prominin-1/CD133 interacts with vascular endothelial growth factor and potentiates its action. *Angiogenesis* (2012).
  82. Fukamachi, H., Shimada, S., Ito, K., Ito, Y. and Yuasa, Y. CD133 is a marker of gland-forming cells in gastric tumors and Sox17 is involved in its regulation. *Cancer Sci* **102**, 1313-21 (2012).
  83. Magee, J.A., Piskounova, E. and Morrison, S.J. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* **21**, 283-96 (2012).
  84. Naor, D., Wallach-Dayana, S.B., Zahalka, M.A. and Sionov, R.V. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol* **18**, 260-7 (2008).
  85. Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. and Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983-8 (2003).
  86. Keysar, S.B. and Jimeno, A. More than markers: biological significance of cancer stem cell-defining molecules. *Mol Cancer Ther* **9**, 2450-7 (2010).
  87. Jaggupilli, A. and Elkord, E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol* **2012**, 708036 (2012).
  88. Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J. *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645-8 (1994).
  89. Gerber, J.M., Smith, B.D., Ngwang, B., Zhang, H., Vala, M.S., Morsberger, L. *et al.* A clinically relevant population of leukemic CD34(+)CD38(-) cells in acute myeloid leukemia. *Blood* **119**, 3571-7 (2012).
  90. Chen, L., Li, X., Wang, G.L., Wang, Y., Zhu, Y.Y. and Zhu, J. Clinicopathological significance of overexpression of TSPAN1, Ki67 and CD34 in gastric carcinoma. *Tumori* **94**, 531-8 (2008).
  91. Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P. *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947-56 (2005).
  92. Rizzino, A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **1**, 228-36 (2009).
  93. Chen, Y.C., Hsu, H.S., Chen, Y.W., Tsai, T.H., How, C.K., Wang, C.Y. *et al.* Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS One* **3**, e2637 (2008).
  94. Xu, C., Xie, D., Yu, S.C., Yang, X.J., He, L.R., Yang, J. *et al.* beta-catenin/POU5F1/SOX2 transcription factor complex mediates IGF-1 receptor signaling and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* (2013).
  95. Hu, T., Liu, S., Breiter, D.R., Wang, F., Tang, Y. and Sun, S. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer Res* **68**, 6533-40 (2008).
  96. Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M. *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230-4 (2007).
  97. Jeter, C.R., Badeaux, M., Choy, G., Chandra, D., Patrawala, L., Liu, C. *et al.* Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development. *Stem Cells* **27**, 993-1005 (2009).
  98. Tian, T., Zhang, Y., Wang, S., Zhou, J. and Xu, S. Sox2 enhances the tumorigenicity and chemoresistance of cancer stem-like cells derived from gastric cancer. *J Biomed Res* **26**, 336-45 (2012).
  99. Iwama, A., Oguro, H., Negishi, M., Kato, Y., Morita, Y., Tsukui, H. *et al.* Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* **21**, 843-51 (2004).
  100. Clevers, H. and Nusse, R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192-205 (2012).
  101. Schuijers, J. and Clevers, H. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *EMBO J* **31**, 2685-96 (2012).
  102. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. and Lake, R.J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-6 (1999).
  103. Zhao, C., Chen, A., Jamieson, C.H., Fereshteh, M., Abrahamsson, A., Blum, J. *et al.* Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* **458**, 776-9 (2009).
  104. Katoh, Y. and Katoh, M. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling

- network (review). *Int J Mol Med* **18**, 1019-23 (2006).
105. Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J. *et al.* Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19**, 379-83 (1998).
106. Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K. *et al.* A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-14 (2003).
107. Flahaut, M., Meier, R., Coulon, A., Nardou, K.A., Niggli, F.K., Martinet, D. *et al.* The Wnt receptor FZD1 mediates chemoresistance in neuroblastoma through activation of the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncogene* **28**, 2245-56 (2009).
108. Veeck, J. and Dahl, E. Targeting the Wnt pathway in cancer: the emerging role of Dickkopf-3. *Biochim Biophys Acta* **1825**, 18-28 (2012).
109. Musgrove, E.A., Caldon, C.E., Barraclough, J., Stone, A. and Sutherland, R.L. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* **11**, 558-72 (2011).
110. van der Flier, L.G., van Gijn, M.E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegebarth, A., Stange, D.E. *et al.* Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell* **136**, 903-12 (2009).
111. Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M. *et al.* Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* **457**, 608-11 (2009).
112. Carmon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A. and Liu, Q. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 11452-7 (2011).
113. Fortini, M.E. Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell* **16**, 633-47 (2009).
114. van Es, J.H., van Gijn, M.E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H. *et al.* Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**, 959-63 (2005).
115. Lewis, J., Hanisch, A. and Holder, M. Notch signaling, the segmentation clock, and the patterning of vertebrate somites. *J Biol* **8**, 44 (2009).
116. Aleksic, T. and Feller, S.M. Gamma-secretase inhibition combined with platinum compounds enhances cell death in a large subset of colorectal cancer cells. *Cell Commun Signal* **6**, 8 (2008).
117. Meng, R.D., Shelton, C.C., Li, Y.M., Qin, L.X., Notterman, D., Paty, P.B. *et al.* gamma-Secretase inhibitors abrogate oxaliplatin-induced activation of the Notch-1 signaling pathway in colon cancer cells resulting in enhanced chemosensitivity. *Cancer Res* **69**, 573-82 (2009).
118. Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Azmi, A.S., Banerjee, S., Kong, D. *et al.* Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* **1806**, 258-67 (2010).
119. Mazur, P.K., Einwachter, H., Lee, M., Sipos, B., Nakhai, H., Rad, R. *et al.* Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13438-43 (2010).
120. Pannuti, A., Foreman, K., Rizzo, P., Osipo, C., Golde, T., Osborne, B. *et al.* Targeting Notch to target cancer stem cells. *Clin Cancer Res* **16**, 3141-52 (2010).
121. Kubo, M., Nakamura, M., Tasaki, A., Yamanaka, N., Nakashima, H., Nomura, M. *et al.* Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res* **64**, 6071-4 (2004).
122. Thayer, S.P., di Magliano, M.P., Heiser, P.W., Nielsen, C.M., Roberts, D.J., Lauwers, G.Y. *et al.* Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* **425**, 851-6 (2003).
123. Ma, X., Chen, K., Huang, S., Zhang, X., Adegboyega, P.A., Evers, B.M. *et al.* Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas. *Carcinogenesis* **26**, 1698-705 (2005).
124. Varnat, F., Duquet, A., Malerba, M., Zbinden, M., Mas, C., Gervaz, P. *et al.* Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med* **1**, 338-51 (2009).
125. Takezaki, T., Hide, T., Takanaga, H., Nakamura, H., Kuratsu, J. and Kondo, T. Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells. *Cancer Sci* **102**, 1306-12 (2011).
126. Moreb, J.S. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* **3**, 237-46 (2008).
127. Fukuda, Y. and Schuetz, J.D. ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochem Pharmacol* **83**, 1073-83 (2012).
128. Szakacs, G., Varadi, A., Ozvegy-Laczka, C. and Sarkadi, B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* **13**, 379-93 (2008).
129. Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M.R. and Ross, D.D. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol* **83**, 1084-103 (2012).
130. Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M. and Morrison, S.J. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* **456**, 593-8 (2008).

131. Feuring-Buske, M., Gerhard, B., Cashman, J., Humphries, R.K., Eaves, C.J. and Hogge, D.E. Improved engraftment of human acute myeloid leukemia progenitor cells in beta 2-microglobulin-deficient NOD/SCID mice and in NOD/SCID mice transgenic for human growth factors. *Leukemia* **17**, 760-3 (2003).
132. Manz, M.G. Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and challenges. *Immunity* **26**, 537-41 (2007).
133. Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S. and Mulligan, R.C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* **183**, 1797-806 (1996).
134. Fukuda, K., Saikawa, Y., Ohashi, M., Kumagai, K., Kitajima, M., Okano, H. *et al.* Tumor initiating potential of side population cells in human gastric cancer. *Int J Oncol* **34**, 1201-7 (2009).
135. Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G., Nuchtern, J.G., Jax, T.W., Gobel, U. *et al.* A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14228-33 (2004).
136. Tsuchida, R., Das, B., Yeager, H., Koren, G., Shibuya, M., Thorner, P.S. *et al.* Cisplatin treatment increases survival and expansion of a highly tumorigenic side-population fraction by upregulating VEGF/Flt1 autocrine signaling. *Oncogene* **27**, 3923-34 (2008).
137. Wulf, G.G., Wang, R.Y., Kuehnle, I., Weidner, D., Marini, F., Brenner, M.K. *et al.* A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* **98**, 1166-73 (2001).
138. Hamilton, G. Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer Lett* **131**, 29-34 (1998).
139. Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W. and Kunz-Schughart, L.A. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* **148**, 3-15 (2010).
140. Schuhmacher, C.P., Fink, U., Becker, K., Busch, R., Dittler, H.J., Mueller, J. *et al.* Neoadjuvant therapy for patients with locally advanced gastric carcinoma with etoposide, doxorubicin, and cisplatin. Closing results after 5 years of follow-up. *Cancer* **91**, 918-27 (2001).
141. Peduzzi, P., Concato, J., Feinstein, A.R. and Holford, T.R. Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis. II. Accuracy and precision of regression estimates. *J Clin Epidemiol* **48**, 1503-10 (1995).
142. Vittinghoff, E. and McCulloch, C.E. Relaxing the rule of ten events per variable in logistic and Cox regression. *Am J Epidemiol* **165**, 710-8 (2007).
143. Yokozaki, H. Molecular characteristics of eight gastric cancer cell lines established in Japan. *Pathol Int* **50**, 767-77 (2000).
144. Oda, T., Kanai, Y., Oyama, T., Yoshiura, K., Shimoyama, Y., Birchmeier, W. *et al.* E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1858-62 (1994).
145. Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S., Clements, J., Pettett, R., Dogan, A. *et al.* The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* **91**, 355-8 (2004).
146. DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. and Calos, M.P. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**, 379-87 (1987).
147. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74 (1977).
148. Applied Biosystems, Life Technologies Corporation. Online Selection Guide for TaqMan® Gene Expression Assay [cms\_050267.pdf]. (2008) Zugriff am 21.08.2009
149. Specht, K., Richter, T., Muller, U., Walch, A., Werner, M. and Hofler, H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am J Pathol* **158**, 419-29 (2001).
150. Applied Biosystems, Life Technologies Corporation. TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array [cms\_043661.pdf]. (2008) Zugriff am 28.08.2012
151. SABiosciences. Human Stem Cell PCR Array PAHS-405 (2009) [http://www.sabiosciences.com/rt\\_pcr\\_product/HTML/PAHS-405A.html](http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-405A.html), Zugriff am 17.07.2009
152. Uemori, T., Asada, K., Kato, I. and Harasawa, R. Amplification of the 16s-23s Spacer Region in Ribosomal-Rna Operons of Mycoplasmas by the Polymerase Chain-Reaction. *Systematic and Applied Microbiology* **15**, 181-186 (1992).
153. Bauer, P., Rolf, A., Regitz-Zagrosek, V., Hildebrandt, A. and Fleck, E. Use of manganese in RT-PCR eliminates PCR artifacts resulting from DNase I digestion. *Biotechniques* **22**, 1128-32 (1997).
154. Applied Biosystems, Life Technologies Corporation. User Bulletin Applied Biosystems TaqMan® Low Density Array [cms\_042326.pdf, Rev. A vom 03.02.2006]. (2006) Zugriff am 01.06.2009
155. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034 (2002).

156. Remmele, W. and Stegner, H.E. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* **8**, 138-40 (1987).
157. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
158. Mutze, K., Langer, R., Schumacher, F., Becker, K., Ott, K., Novotny, A. *et al.* DNA methyltransferase 1 as a predictive biomarker and potential therapeutic target for chemotherapy in gastric cancer. *Eur J Cancer* **47**, 1817-25 (2011).
159. Roche Diagnostics. Cell Proliferation Kit II (XTT)-Colorimetric assay (XTT based) for the non-radioactive quantification of cell proliferation and viability [11465015001\_en\_15.pdf]. (2005) Zugriff am 03.03.2009
160. DCTD/NCI/NIH. NCI-60 DTP Human Tumor Cell Line Screen (2009) <http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>, Zugriff am 10.02.2009
161. Ji, Q., Hao, X., Meng, Y., Zhang, M., Desano, J., Fan, D. *et al.* Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC Cancer* **8**, 266 (2008).
162. Baumgart, A., Seidl, S., Vlachou, P., Michel, L., Mitova, N., Schatz, N. *et al.* ADAM17 regulates epidermal growth factor receptor expression through the activation of Notch1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **70**, 5368-78 (2010).
163. Hothorn, T. and Zeileis, A. Generalized maximally selected statistics. *Biometrics* **64**, 1263-9 (2008).
164. de Hoon, M.J., Imoto, S., Nolan, J. and Miyano, S. Open source clustering software. *Bioinformatics* **20**, 1453-4 (2004).
165. Saldanha, A.J. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **20**, 3246-8 (2004).
166. Bland, J.M. and Altman, D.G. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* **310**, 170 (1995).
167. Cho, J.Y., Lim, J.Y., Cheong, J.H., Park, Y.Y., Yoon, S.L., Kim, S.M. *et al.* Gene expression signature-based prognostic risk score in gastric cancer. *Clin Cancer Res* **17**, 1850-7 (2011).
168. McShane, L.M., Altman, D.G., Sauerbrei, W., Taube, S.E., Gion, M. and Clark, G.M. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer* **93**, 387-91 (2005).
169. Zhao, Y. and Simon, R. BRB-ArrayTools Data Archive for human cancer gene expression: a unique and efficient data sharing resource. *Cancer Inform* **6**, 9-15 (2008).
170. Chen, X., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Chu, K.M., Ji, J., Li, R. *et al.* Variation in gene expression patterns in human gastric cancers. *Mol Biol Cell* **14**, 3208-15 (2003).
171. Tetsu, O. and McCormick, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422-6 (1999).
172. van der Flier, L.G., Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegebarth, A., De Palo, M., Anti, M. *et al.* The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology* **132**, 628-32 (2007).
173. Greve, B., Kelsch, R., Spaniol, K., Eich, H.T. and Gotte, M. Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytometry A* **81**, 284-93 (2012).
174. Mutze, K., Langer, R., Becker, K., Ott, K., Novotny, A., Lubber, B. *et al.* Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 expression and chemotherapy in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **17**, 3336-43 (2010).
175. Darken, M.A. Puromycin Inhibition of Protein Synthesis. *Pharmacol Rev* **16**, 223-43 (1964).
176. Siddik, Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265-79 (2003).
177. Langer, R., Specht, K., Becker, K., Ewald, P., Ott, K., Lordick, F. *et al.* Comparison of pretherapeutic and posttherapeutic expression levels of chemotherapy-associated genes in adenocarcinomas of the esophagus treated by 5-fluorouracil- and cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Am J Clin Pathol* **128**, 191-7 (2007).
178. Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337-42 (2011).
179. Forde, J.E. and Dale, T.C. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1930-44 (2007).
180. Vandesompele, J., Kubista, M. and Pfaffl, W. in Real-time PCR : current technology and applications (eds. Logan, J., Edwards, K. & Saunders, N.) VII, 284, A-4 S. (Caister Acad. Press, Norfolk, 2009).
181. Cho, Y.J., Kim, J.H., Yoon, J., Cho, S.J., Ko, Y.S., Park, J.W. *et al.* Constitutive activation of glycogen synthase kinase-3beta correlates with better prognosis and cyclin-dependent kinase inhibitors in human gastric cancer. *BMC Gastroenterol* **10**, 91 (2010).
182. Espinosa, I., Catusus, L., Canet, B., D'Angelo, E., Munoz, J. and Prat, J. Gene expression analysis identifies two groups of ovarian high-grade serous carcinomas with different prognosis. *Mod Pathol* **24**, 846-54 (2011).
183. Naito, S., Bilim, V., Yuuki, K., Ugolkov, A., Motoyama, T., Nagaoka, A. *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta: a prognostic marker and a potential therapeutic target in human bladder cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 5124-32 (2010).

184. Darrington, R.S., Campa, V.M., Walker, M.M., Bengoa-Vergniory, N., Gorrone-Etxebarria, I., Uysal-Onganer, P. *et al.* Distinct expression and activity of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  in prostate cancer. *Int J Cancer* **131**, E872-83 (2012).
185. Jope, R.S. and Johnson, G.V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* **29**, 95-102 (2004).
186. MacDonald, B.T., Tamai, K. and He, X. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **17**, 9-26 (2009).
187. Ooi, C.H., Ivanova, T., Wu, J., Lee, M., Tan, I.B., Tao, J. *et al.* Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer. *PLoS Genet* **5**, e1000676 (2009).
188. Cho, Y.J., Yoon, J., Ko, Y.S., Kim, S.Y., Cho, S.J., Kim, W.H. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  does not correlate with the expression and activity of  $\beta$ -catenin in gastric cancer. *APMIS* **118**, 782-90 (2010).
189. Espinosa, L., Ingles-Esteve, J., Aguilera, C. and Bigas, A. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3  $\beta$  down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J Biol Chem* **278**, 32227-35 (2003).
190. Takayama, T., Shiozaki, H., Shibamoto, S., Oka, H., Kimura, Y., Tamura, S. *et al.*  $\beta$ -catenin expression in human cancers. *Am J Pathol* **148**, 39-46 (1996).
191. Grabsch, H., Takeno, S., Noguchi, T., Hommel, G., Gabbert, H.E. and Mueller, W. Different patterns of  $\beta$ -catenin expression in gastric carcinomas: relationship with clinicopathological parameters and prognostic outcome. *Histopathology* **39**, 141-9 (2001).
192. Nabais, S., Machado, J.C., Lopes, C., Seruca, R., Carneiro, F. and Sobrinho-Simoes, M. Patterns of  $\beta$ -catenin expression in gastric carcinoma: clinicopathological relevance and mutation analysis. *Int J Surg Pathol* **11**, 1-9 (2003).
193. Filiz, A.I., Senol, Z., Sucullu, I., Kurt, Y., Demirbas, S. and Akin, M.L. The survival effect of E-cadherin and catenins in colorectal carcinomas. *Colorectal Dis* **12**, 1223-30 (2010).
194. de Sousa, E.M.F., Colak, S., Buikhuisen, J., Koster, J., Cameron, K., de Jong, J.H. *et al.* Methylation of cancer-stem-cell-associated Wnt target genes predicts poor prognosis in colorectal cancer patients. *Cell Stem Cell* **9**, 476-85 (2011).
195. Etoh, T., Kanai, Y., Ushijima, S., Nakagawa, T., Nakanishi, Y., Sasako, M. *et al.* Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol* **164**, 689-99 (2004).
196. Yang, J., Wei, X., Wu, Q., Xu, Z., Gu, D., Jin, Y. *et al.* Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer. *Mol Med Report* **4**, 1139-43 (2011).
197. Kanai, Y. Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers. *Pathol Int* **58**, 544-58 (2008).
198. Jiang, Y., He, Y., Li, H., Li, H.N., Zhang, L., Hu, W. *et al.* Expressions of putative cancer stem cell markers ABCB1, ABCG2, and CD133 are correlated with the degree of differentiation of gastric cancer. *Gastric Cancer* **15**, 440-50 (2012).
199. Li, F., Zeng, H. and Ying, K. The combination of stem cell markers CD133 and ABCG2 predicts relapse in stage I non-small cell lung carcinomas. *Med Oncol* **28**, 1458-62 (2011).
200. Seko, N., Oue, N., Noguchi, T., Sentani, K., Sakamoto, N., Hinoi, T. *et al.* Olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) is an independent prognostic marker for survival in patients with colorectal cancer. *Exp Ther Med* **1**, 73-78 (2010).
201. Liu, W., Zhu, J., Cao, L. and Rodgers, G.P. Expression of hGC-1 is correlated with differentiation of gastric carcinoma. *Histopathology* **51**, 157-65 (2007).
202. Tseng, Y.C., Tsai, Y.H., Tseng, M.J., Hsu, K.W., Yang, M.C., Huang, K.H. *et al.* Notch2-induced COX-2 expression enhancing gastric cancer progression. *Mol Carcinog* **51**, 939-51 (2011).
203. Yeh, T.S., Wu, C.W., Hsu, K.W., Liao, W.J., Yang, M.C., Li, A.F. *et al.* The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2. *Cancer Res* **69**, 5039-48 (2009).
204. Tchorz, J.S., Tome, M., Cloetta, D., Sivasankaran, B., Grzmil, M., Huber, R.M. *et al.* Constitutive Notch2 signaling in neural stem cells promotes tumorigenic features and astroglial lineage entry. *Cell Death Dis* **3**, e325 (2012).
205. Dill, M.T., Tornillo, L., Fritzius, T., Terracciano, L., Semela, D., Bettler, B. *et al.* Constitutive Notch2 signaling induces hepatic tumors in mice. *Hepatology* (2012).
206. Panelos, J. and Massi, D. Emerging role of Notch signaling in epidermal differentiation and skin cancer. *Cancer Biol Ther* **8**, 1986-93 (2009).
207. Breit, S., Stanulla, M., Flohr, T., Schrappe, M., Ludwig, W.D., Tolle, G. *et al.* Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood* **108**, 1151-7 (2006).
208. Paganin, M. and Ferrando, A. Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev* **25**, 83-90 (2011).
209. Reedijk, M., Odorcic, S., Chang, L., Zhang, H., Miller, N., McCreedy, D.R. *et al.* High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res* **65**, 8530-7 (2005).
210. Kwon, C., Cheng, P., King, I.N., Andersen, P., Shenje, L., Nigam, V. *et al.* Notch post-

- translationally regulates beta-catenin protein in stem and progenitor cells. *Nat Cell Biol* **13**, 1244-51 (2011).
211. Blok, P., Craanen, M.E., van Diest, P.J., Dekker, W. and Tytgat, G.N. Lack of cyclin D1 overexpression in gastric carcinogenesis. *Histopathology* **36**, 151-5 (2000).
212. Müller, W., Noguchi, T., Wirtz, H.C., Hommel, G. and Gabbert, H.E. Expression of cell-cycle regulatory proteins cyclin D1, cyclin E, and their inhibitor p21 WAF1/CIP1 in gastric cancer. *J Pathol* **189**, 186-93 (1999).
213. Saigusa, S., Tanaka, K., Toiyama, Y., Yokoe, T., Okugawa, Y., Ioue, Y. *et al.* Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* **16**, 3488-98 (2009).
214. Matsuoka, J., Yashiro, M., Sakurai, K., Kubo, N., Tanaka, H., Muguruma, K. *et al.* Role of the stemness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma. *J Surg Res* **174**, 130-5 (2012).
215. Lin, T., Ding, Y.Q. and Li, J.M. Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *Med Oncol* **29**, 878-85 (2012).
216. Yamanoi, K., Fukuma, M., Uchida, H., Kushima, R., Yamazaki, K., Katai, H. *et al.* Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in gastric cancer. *Pathol Int* **63**, 13-9 (2013).
217. Ishigami, S., Ueno, S., Arigami, T., Uchikado, Y., Setoyama, T., Arima, H. *et al.* Prognostic impact of CD133 expression in gastric carcinoma. *Anticancer Res* **30**, 2453-7 (2010).
218. Lee, H.H., Seo, K.J., An, C.H., Kim, J.S. and Jeon, H.M. CD133 expression is correlated with chemoresistance and early recurrence of gastric cancer. *J Surg Oncol* **106**, 999-1004 (2012).
219. Wakamatsu, Y., Sakamoto, N., Oo, H.Z., Naito, Y., Uraoka, N., Anami, K. *et al.* Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathol Int* **62**, 112-9 (2011).
220. Yu, J.W., Zhang, P., Wu, J.G., Wu, S.H., Li, X.Q., Wang, S.T. *et al.* Expressions and clinical significances of CD133 protein and CD133 mRNA in primary lesion of gastric adenocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* **29**, 141 (2010).
221. Medema, J.P. Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nat Cell Biol* **15**, 338-44 (2013).
222. Gonzalez-Angulo, A.M., Iwamoto, T., Liu, S., Chen, H., Do, K.A., Hortobagyi, G.N. *et al.* Gene expression, molecular class changes, and pathway analysis after neoadjuvant systemic therapy for breast cancer. *Clin Cancer Res* **18**, 1109-19 (2012).
223. Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Azmi, A.S. *et al.* Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Res* **69**, 2400-7 (2009).
224. Wolfe, M.S. gamma-Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease. *J Neurochem* **120 Suppl 1**, 89-98 (2011).
225. Borggrefe, T. and Oswald, F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* **66**, 1631-46 (2009).
226. D'Souza, B., Meloty-Kapella, L. and Weinmaster, G. Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr Top Dev Biol* **92**, 73-129 (2010).
227. Arduini, B.L. and Brivanlou, A.H. Modulation of FOXD3 activity in human embryonic stem cells directs pluripotency and paraxial mesoderm fates. *Stem Cells* **30**, 2188-98 (2012).
228. Palma, C.S., Tannous, M.A., Malta, T.M., Russo, E.M., Covas, D.T. and Picanco-Castro, V. Forced expression of OCT4 influences the expression of pluripotent genes in human mesenchymal stem cells and fibroblasts. *Genet Mol Res* **12**, 1054-60 (2013).
229. Cheng, A.S., Li, M.S., Kang, W., Cheng, V.Y., Chou, J.L., Lau, S.S. *et al.* Helicobacter pylori causes epigenetic dysregulation of FOXD3 to promote gastric carcinogenesis. *Gastroenterology* **144**, 122-133 e9 (2013).
230. Leushacke, M. and Barker, N. Lgr5 and Lgr6 as markers to study adult stem cell roles in self-renewal and cancer. *Oncogene* **31**, 3009-22 (2012).
231. Saigusa, S., Inoue, Y., Tanaka, K., Toiyama, Y., Kawamura, M., Okugawa, Y. *et al.* Significant correlation between LKB1 and LGR5 gene expression and the association with poor recurrence-free survival in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* **139**, 131-8 (2013).
232. Kobayashi, S., Yamada-Okabe, H., Suzuki, M., Natori, O., Kato, A., Matsubara, K. *et al.* LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells* **30**, 2631-44 (2012).
233. Wang, J., Zhou, D., He, X., Wang, Y., Hu, W., Jiang, L. *et al.* Effect of downregulated beta-catenin on cell proliferative activity, the sensitivity to chemotherapy drug and tumorigenicity of ovarian cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **57 Suppl**, OL1606-13 (2011).
234. Wu, J., Liao, Q., He, H., Zhong, D. and Yin, K. TWIST interacts with beta-catenin signaling on osteosarcoma cell survival against cisplatin. *Mol Carcinog* (2012).
235. Johnson-Holiday, C., Singh, R., Johnson, E.L., Grizzle, W.E., Lillard, J.W., Jr. and Singh, S. CCR9-CCL25 interactions promote cisplatin resistance in breast cancer cell through Akt activation in a PI3K-dependent and FAK-



- independent fashion. *World J Surg Oncol* **9**, 46 (2011).
236. Litviakov, N.V., Cherdynitseva, N.V., Tsyganov, M.M., Denisov, E.V., Garbukov, E.Y., Merzliakova, M.K. *et al.* Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response. *Cancer Chemother Pharmacol* **71**, 153-63 (2013).
237. Liu, Y.P., Yang, C.J., Huang, M.S., Yeh, C.T., Wu, A.T., Lee, Y.C. *et al.* Cisplatin Selects for Multidrug-Resistant CD133+ Cells in Lung Adenocarcinoma by Activating Notch Signaling. *Cancer Res* **73**, 406-416 (2013).
238. Ehata, S., Johansson, E., Katayama, R., Koike, S., Watanabe, A., Hoshino, Y. *et al.* Transforming growth factor-beta decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells. *Oncogene* **30**, 1693-705 (2011).
239. Schmidt, C.S., Bultmann, S., Meilinger, D., Zacher, B., Tresch, A., Maier, K.C. *et al.* Global DNA hypomethylation prevents consolidation of differentiation programs and allows reversion to the embryonic stem cell state. *PLoS One* **7**, e52629 (2012).
240. Vogel, C. and Marcotte, E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* **13**, 227-32 (2012).
241. Sun, Y., Gao, X., Liu, J., Kong, Q.Y., Wang, X.W., Chen, X.Y. *et al.* Differential Notch1 and Notch2 expression and frequent activation of Notch signaling in gastric cancers. *Arch Pathol Lab Med* **135**, 451-8 (2011).
242. Cao, H., Hu, Y., Wang, P., Zhou, J., Deng, Z. and Wen, J. Down-regulation of Notch receptor signaling pathway induces caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in lung squamous cell carcinoma cells. *APMIS* **120**, 441-50 (2012).
243. Zagouras, P., Stifani, S., Blaumueller, C.M., Carcangiu, M.L. and Artavanis-Tsakonas, S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6414-8 (1995).
244. Bancroft, J.D. and Gamble, M. Theory and practice of histological techniques (Churchill Livingstone Elsevier, Edinburgh, 2008).
245. Wu, G., Lyapina, S., Das, I., Li, J., Gurney, M., Pauley, A. *et al.* SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol Cell Biol* **21**, 7403-15 (2001).
246. Kurreck, J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 1378-98 (2009).
247. Sigma-Aldrich. Product Information MISSION® shRNA Plasmid DNA [shclndbul.pdf, Katalog Nummer: SHCLND]. (2010) Zugriff am 12.04.2013
248. Wang, F., Xia, X., Wang, J., Sun, Q., Luo, J. and Cheng, B. Notch1 signaling contributes to the oncogenic effect of HBx on human hepatic cells. *Biotechnol Lett* **35**, 29-37 (2012).
249. Cho, S., Lu, M., He, X., Ee, P.L., Bhat, U., Schneider, E. *et al.* Notch1 regulates the expression of the multidrug resistance gene ABCC1/MRP1 in cultured cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20778-83 (2011).
250. Chen, J., Kesari, S., Rooney, C., Strack, P.R., Shen, H., Wu, L. *et al.* Inhibition of notch signaling blocks growth of glioblastoma cell lines and tumor neurospheres. *Genes Cancer* **1**, 822-35 (2010).
251. Fan, X., Khaki, L., Zhu, T.S., Soules, M.E., Talsma, C.E., Gul, N. *et al.* NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells* **28**, 5-16 (2010).
252. Lino, M.M., Merlo, A. and Boulay, J.L. Notch signaling in glioblastoma: a developmental drug target? *BMC Med* **8**, 72 (2010).
253. Liu, J., Fan, H., Ma, Y., Liang, D., Huang, R., Wang, J. *et al.* Notch1 is a 5-Fluorouracil resistant and poor survival marker in human esophagus squamous cell carcinomas. *PLoS One* **8**, e56141 (2013).
254. Naoi, T., Shibuya, N., Inoue, H., Mita, S., Kobayashi, S., Watanabe, K. *et al.* The effect of tert-butylhydroquinone-induced oxidative stress in MDBK cells using XTT assay: implication of tert-butylhydroquinone-induced NADPH generating enzymes. *J Vet Med Sci* **72**, 321-6 (2009).
255. Tan, I.B., Ivanova, T., Lim, K.H., Ong, C.W., Deng, N., Lee, J. *et al.* Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology* **141**, 476-85, 485 e1-11 (2011).
256. Wang, Z., Zhang, Y., Li, Y., Banerjee, S., Liao, J. and Sarkar, F.H. Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* **5**, 483-93 (2006).
257. Burkert, J., Otto, W.R. and Wright, N.A. Side populations of gastrointestinal cancers are not enriched in stem cells. *J Pathol* **214**, 564-73 (2008).
258. Mitsutake, N., Iwao, A., Nagai, K., Namba, H., Ohtsuru, A., Saenko, V. *et al.* Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively. *Endocrinology* **148**, 1797-803 (2007).
259. Morita, Y., Ema, H., Yamazaki, S. and Nakauchi, H. Non-side-population hematopoietic stem cells in mouse bone marrow. *Blood* **108**, 2850-6 (2006).
260. Ibrahim, S.F., Diercks, A.H., Petersen, T.W. and van den Engh, G. Kinetic analyses as a critical parameter in defining the side population (SP) phenotype. *Exp Cell Res* **313**, 1921-6 (2007).

261. Montanaro, F., Liadaki, K., Schienda, J., Flint, A., Gussoni, E. and Kunkel, L.M. Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters. *Exp Cell Res* **298**, 144-54 (2004).
262. Mayer, B., Klement, G., Kaneko, M., Man, S., Jothy, S., Rak, J. *et al.* Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. *Gastroenterology* **121**, 839-52 (2001).
263. Song, Z., Yue, W., Wei, B., Wang, N., Li, T., Guan, L. *et al.* Sonic hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *PLoS One* **6**, e17687 (2011).
264. Farnie, G. and Clarke, R.B. Mammary stem cells and breast cancer--role of Notch signalling. *Stem Cell Rev* **3**, 169-75 (2007).
265. Lee, S.H., Hong, H.S., Liu, Z.X., Kim, R.H., Kang, M.K., Park, N.H. *et al.* TNFalpha enhances cancer stem cell-like phenotype via Notch-Hes1 activation in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **424**, 58-64 (2012).
266. Cao, L., Zhou, Y., Zhai, B., Liao, J., Xu, W., Zhang, R. *et al.* Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol* **11**, 71 (2011).
267. Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Polesso, F., Sridharan, R., Mason, M.J., Heidersbach, A. *et al.* Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* **460**, 863-8 (2009).
268. Wei, D., Kanai, M., Huang, S. and Xie, K. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis* **27**, 23-31 (2006).
269. Takebe, N., Harris, P.J., Warren, R.Q. and Ivy, S.P. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* **8**, 97-106 (2011).
270. Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K.G., Rangell, L., Klein, O.D. *et al.* A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* **478**, 255-9 (2011).
271. Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111-5 (2007).
272. Tong, X., Gui, H., Jin, F., Heck, B.W., Lin, P., Ma, J. *et al.* Ataxin-1 and Brother of ataxin-1 are components of the Notch signalling pathway. *EMBO Rep* **12**, 428-35 (2011).
273. van der Flier, L.G., Haegebarth, A., Stange, D.E., van de Wetering, M. and Clevers, H. OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology* **137**, 15-7 (2009).
274. Tsukamoto, T., Mizoshita, T. and Tatematsu, M. Gastric-and-intestinal mixed-type intestinal metaplasia: aberrant expression of transcription factors and stem cell intestinalization. *Gastric Cancer* **9**, 156-66 (2006).
275. Liebermann, D.A., Tront, J.S., Sha, X., Mukherjee, K., Mohamed-Hadley, A. and Hoffman, B. Gadd45 stress sensors in malignancy and leukemia. *Crit Rev Oncog* **16**, 129-40 (2011).
276. Napieralski, R., Ott, K., Kremer, M., Specht, K., Vogelsang, H., Becker, K. *et al.* Combined GADD45A and thymidine phosphorylase expression levels predict response and survival of neoadjuvant-treated gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* **11**, 3025-31 (2005).
277. Challen, G.A., Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J.S. *et al.* Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet* **44**, 23-31 (2011).
278. Paziienza, V., Tavano, F., Benegiamo, G., Vinciguerra, M., Burbaci, F.P., Copetti, M. *et al.* Correlations among PPARgamma, DNMT1, and DNMT3B Expression Levels and Pancreatic Cancer. *PPAR Res* **2012**, 461784 (2012).
279. Szakacs, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C. and Gottesman, M.M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 219-34 (2006).
280. Luo, J. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett* **273**, 194-200 (2009).
281. Schlüter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M.H., Key, G., Flad, H.D. *et al.* The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* **123**, 513-22 (1993).
282. Jurkin, J., Zupkovitz, G., Lagger, S., Grausenburger, R., Hagelkruys, A., Kenner, L. *et al.* Distinct and redundant functions of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 in proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* **10**, 406-12 (2011).
283. Dovey, O.M., Foster, C.T. and Cowley, S.M. Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8242-7 (2010).

## Abkürzungsverzeichnis

18S	<i>18S ribosomal RNA</i>
3'UTR	<i>3' untranslated region (3' nichttranslatierte Region)</i>
5-FU	5-Fluorouracil
a	Jahr
<i>ABCB1</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1</i>
<i>ABCG2</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2</i>
ACTB	<i>Actin, beta</i>
<i>ALDH1A1</i>	<i>Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>ASCL2</i>	<i>Achaete-scute complex homolog 2</i>
<i>ATXN1</i>	<i>Ataxin 1</i>
<i>AXIN1</i>	<i>Axin 1</i>
B2M	<i>Beta-2-microglobulin</i>
bFGF	<i>Fibroblast growth factor, basic human (Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2)</i>
<i>BMI1</i>	<i>Polycomb ring finger oncogene</i>
bp	Basenpaare
BP	<i>Bad passive reference (schlechte Passiv-Referenz-Werte)</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)</i>
C	konzentration
<i>CCND1</i>	<i>Cyclin D1</i>
<i>CD133</i>	<i>PROM1 - prominin 1</i>
<i>CD24</i>	<i>CD24 molecule</i>
<i>CD34</i>	<i>CD34 molecule</i>
<i>CD44</i>	<i>CD44 molecule (Indian blood group)</i>
<i>CDH1</i>	<i>Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i>
cDNA	<i>complementary DNA (komplementäre DNA)</i>
CDS	<i>Coding DNA sequence (kodierende DNA-Sequenz)</i>
<i>CDX2</i>	<i>Caudal type homeobox 2</i>
<i>CHD1</i>	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 1</i>
Cis	Cisplatin
CRK	Cox-Regressions-Koeffizient
C <sub>t</sub>	<i>Cycle of threshold (Zyklus der Schwellenwertüberschreitung)</i>
cT	Klinische Bewertung des Tumorstadiums
<i>CTNNB1</i>	<i>Catenin (cadherin-associated protein), β 1</i>
d	Tag
DA v2.0	<i>DataAssist v2.0</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
<i>DKK3</i>	<i>Dickkopf homolog 3</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)</i>
<i>DNMT1</i>	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1</i>
<i>DNMT3A</i>	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 α</i>
<i>DNMT3B</i>	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 β</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DSHB	<i>Developmental studies hybridoma bank</i>
DTT	Dithiothreitol

E	Extinktion
ECR	<i>Electron coupling reagent</i> (Elektronenkopplungsreagenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktor)
E-PLF	Epirubicin-Platin-Leucovorin-Fluorouracil
EW	Einwohner
<i>EW</i>	<i>Empty well</i> (Leeres <i>Well</i> )
FFPE	formalinfixiert, paraffineingebettet
FKS	Fötale Kälberserum
<i>FOXD3</i>	<i>Forkhead box D3</i>
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
<i>FZD1</i>	<i>Frizzled homolog 1</i>
G	Differenzierungsgrad
<i>GADD45A</i>	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible <math>\alpha</math></i>
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
gDNA	Genomische DNA
GE	<i>General Electrics</i>
<i>GLII</i>	<i>GLI family zinc finger 1</i>
GSI	$\gamma$ -Sekretase Inhibitoren
<i>GSK3B</i>	<i>Glycogen synthase kinase 3 <math>\beta</math></i>
GUSB	<i>Glucuronidase, beta</i>
GW	Grenzwert
H <sub>2</sub> O p. a.	Reinstwasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
<i>HDAC1</i>	<i>Histone deacetylase 1</i>
<i>HDAC2</i>	<i>Histone deacetylase 2</i>
HE	Hämatoxilin-Eosin
HECP	<i>human endogenous control panel</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>HES1</i>	<i>Hairy and enhancer of split 1</i>
HMBS	<i>Hydroxymethylbilane synthase</i>
HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IC <sub>50</sub>	<i>50 % inhibitory concentration</i> (50 q% inhibierende Konzentration)
ID	Identifikationsnummer
IHC	Immunhistochemie
<i>IHH</i>	<i>Indian hedgehog homolog</i>
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
<i>IPO8</i>	<i>Importin 8</i>
IQR	<i>Interquartile range</i> (Interquartilsabstand)
<i>JAG1</i>	<i>Jagged 1</i>
<i>k</i>	Bonferroni-Korrekturfaktor
KBA	Koloniebildungsassay
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
<i>KLF4</i>	<i>Kruppel-like factor 4 (gut)</i>
<i>LGR4</i>	<i>Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4</i>
<i>LGR5</i>	<i>Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5</i>
<i>LIN28</i>	<i>Lin-28 homolog</i>
<i>M</i>	Genexpressionsstabilitätswert
m <sup>2</sup> KO	Körperoberfläche [m <sup>2</sup> ]

MA	Metabolische Aktivität
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MKI67	<i>Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67</i>
mo	Monat
MW	Mittelwert
MYC	<i>v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
n	Numerische Anzahl
n.e.	Nicht erreicht
NaCl	Natriumchlorid
NANOG	<i>Nanog homeobox</i>
NAW	<i>Non-amplified well</i> (nichtamplifiziertes <i>Well</i> )
NEXT	<i>Notch extracellular truncation</i> (Notch extrazellulär gespalten)
NICD	<i>Notch intracellular domain</i> (Notch intrazelluläre Domäne)
NOTCH1	<i>Notch homolog 1</i>
NOTCH2	<i>Notch homolog 2</i>
Nx	Unbekannter Lymphknotenmetastasenstatus
NZS	Normales Ziegen Serum
OLF	Oxaliplatin-Leucovorin-Fluorouracil
OLFM4	<i>Olfactomedin 4</i>
OS	<i>Overall survival</i> (Gesamtüberleben)
p	Signifikanzwert p
PanIN	<i>Pancreatic intraepithelial neoplasia</i>
p <sub>B</sub>	Signifikanzwert p, korrigiert nach Bonferroni
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PGK1	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>
PI	Propidiumiodid
PK	Proteinase K
PLF	Platin-Leucovorin-Fluorouracil
POLR2A	<i>Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A</i>
POU5F1	<i>POU class 5 homeobox 1</i>
PPIA	<i>Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)</i>
PTCH1	<i>Patched homolog 1</i>
px	<i>Pixel</i> (Bildpunkt)
qRT-PCR	<i>Quantitative real time PCR</i> (quantitative Echtzeit-PCR)
R	Resektionsklassifizierung
RE	Relative Genexpression
REMARK	<i>Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
RPLP0	<i>Ribosomal protein, large, P0</i>
RPMI 1640	<i>Rose Park Memorial Institute Medium 1640</i>
RQM v1.2	<i>Relative Quantification Manager v1.2</i>
RR	Relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung
SC	<i>Cell Signaling</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SDS v2.3	<i>Sequence Detections Systems v2.3</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SE	<i>standard error</i> (Standardfehler)

<i>SFRP1</i>	<i>Secreted frizzled-related protein 2</i>
<i>SHH</i>	<i>Sonic hedgehog homolog</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
<i>SMO</i>	<i>Smoothened homolog</i>
<i>SOX2</i>	<i>Sex determining region Y-box 2</i>
SP	<i>Side-population</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (TRIS-gepufferte Salzlösung)
TBST	TBS mit Tween
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFRC	<i>Transferrin receptor (p90, CD71) [Homo sapiens]</i>
TLDA	<i>TaqMan<sup>®</sup> Low Density Array</i>
T-PLF	Paclitaxel/Docetaxel-Platin-Leucovorin-Fluorouracil
TRC	<i>The RNAi Consortium</i>
TRG	Tumorregressionsgrad
Tris Base	Trishydroxymethylaminomethan
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethan-hydrochlorid
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
<i>UBC</i>	<i>Ubiquitin C</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
ÜL	Überleben
ÜN	Inkubation über Nacht
v	Version
% (v/v)	Volumen je Volumen (Volumenprozent)
Vol	Volumenanteile
WB	Western-Blot
% (w/v)	Masse je Volumen (Massenprozent)
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid
ypM	Pathologische Bewertung des Metastasenstatus, Zustand nach Chemotherapie
ypN	Pathologische Bewertung des Lymphknotenmetastasenstatus, Zustand nach Chemotherapie
ypT	Pathologische Bewertung des Tumorstadiums, Zustand nach Chemotherapie
YWHAZ	<i>Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide</i>
ρ	Korrelationskoeffizient Rho

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Anatomie und Histologie des Magens. ....	2
Abb. 2:	Einteilung von Adenokarzinomen des ösophagogastralen Übergangs (AEG) nach der Lokalisation bezüglich der Z-Linie. ....	5
Abb. 3:	Schematische Darstellung der histopathologischen Regressionsgraduierung von neoadjuvant behandelten Magenkarzinomen nach Becker .....	6
Abb. 4:	Vergleich des Modells der klonalen Evolution und des hierarchischen Tumorstammzellmodells. ....	8
Abb. 5:	Weiterentwicklung des Tumorstammzellmodells. ....	10
Abb. 6:	Implikationen der Tumorstammzellhypothese für die Chemotherapie. ....	12
Abb. 7:	Ermittlung der Genexpressionsstabilität potentieller Referenzgene. ....	65
Abb. 8:	Übersicht über die C <sub>T</sub> -Werte aller untersuchten Gene. ....	66
Abb. 9:	Clusteranalyse mit Genen, die in der Einzelanalyse eine Assoziation mit dem Überleben zeigten. ....	75
Abb. 10:	Assoziation der Expression von GSK3B, CTNNB1 und NOTCH2 mit dem Gesamtüberleben (OS). ....	76
Abb. 11:	Analyse eines öffentlichen Magenkarzinom-Genexpressionsdatensatzes .....	78
Abb. 12:	Antikörperspezifitätskontrolle im Western Blot und immunhistochemische Färbebeispiele für Notch1 und Notch2. ....	81
Abb. 13:	Expressionsveränderung von Notch2 zwischen zusammengehörenden prä- und posttherapeutischen Tumorproben. ....	84
Abb. 14:	Zusammenhang der Notch1- und Notch2-Proteinexpression mit dem Überleben der Patienten. ....	85
Abb. 15:	<i>Side-population</i> -Analysen an Magenkarzinomzelllinien. ....	89
Abb. 17:	Koloniebildungsassay mit <i>side-population</i> (SP)-Zellen der Zelllinie MKN1 sowie nicht-SP-Zellen und unsortierten Zellen der gleichen Zelllinie. ....	90
Abb. 17:	<i>Side-populations</i> (SP) in Zelllinien nach Cisplatinbehandlung .....	91
Abb. 18:	Beispielbilder für das Wachstumsverhalten verschiedener Magenkarzinomzelllinien unter nichtadhärenten Wachstumsbedingungen. ....	92
Abb. 19:	Dosis-Wirkungs-Kurven der Puromycinbehandlung von nativen MKN28- und AGS-Zellen. ....	94
Abb. 20:	Expression von <i>NOTCH1</i> und <i>NOTCH2</i> in den MKN28- <i>Knockdown</i> -Zelllinien MKN28-N1 <sup>59</sup> und MKN28-N1 <sup>62</sup> ( <i>NOTCH1-Knockdown</i> ) sowie MKN28-N2 <sup>94</sup> und MKN28-N2 <sup>95</sup> ( <i>NOTCH2-Knockdown</i> ). ....	95
Abb. 21:	Relative Notch1- und Notch2-Proteinexpression in MKN28- <i>Knockdown</i> -Zelllinien (Western-Blot). ....	96
Abb. 22:	Vergleich der Morphologie von MKN28- <i>Knockdown</i> -Zelllinien. ....	97
Abb. 23:	Chemosensitivität von <i>NOTCH1</i> - und <i>NOTCH2-Knockdown</i> -Zelllinien gegen Cisplatin und 5-Fluorouracil. ....	98
Abb. 24:	Koloniebildungsassays (KBA) mit MKN28- <i>Knockdown</i> -Zelllinien unter Zytostatikabehandlung. ....	99
Abb. 25:	Quantifizierung der Sphäroidbildung von MKN28- <i>Knockdown</i> -Zelllinien ohne und mit Cisplatinbehandlung (2 µM Cis). ....	100
Abb. 26:	Verteilung der Zellzyklusphasen von MKN28-N1 und MKN28-N2-Zelllinien im Vergleich mit der Kontrollzelllinie MKN28-Kon. ....	101

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Patientencharakteristika und Behandlungsschemata der Patienten mit Tumoren mit TRG2, welche in der <i>Screening</i> -Analyse untersucht wurden.....	22
Tab. 2:	Vergleich der untersuchten und nicht untersuchten Patienten mit Tumoren mit TRG2 .....	23
Tab. 3:	Patientencharakteristika und Behandlungsschemata der Patienten mit Tumoren mit TRG1b, TRG2 und TRG3 sowie primär resezierten Tumoren welche in den differentiellen Expressionsanalysen untersucht wurden .....	24
Tab. 4:	Patientencharakteristika des Kollektivs für die Bestimmung der Referenzgene .....	25
Tab. 5:	Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Zelllinien .....	26
Tab. 6:	Liste der <i>Assays</i> auf dem <i>Human Endogenous Control Panel-Array</i> .....	30
Tab. 7:	Liste der <i>Assays</i> für das Genexpressions <i>screening</i> an Resektaten von Tumoren mit TRG2.....	31
Tab. 8:	Primer für die SYBR Green-basierte qRT-PCR <sup>1</sup> .....	33
Tab. 9:	Primer für die PCR zur Detektion von Mykoplasmenkontaminationen <sup>(152)</sup> .....	33
Tab. 10:	Primer für die PCR zur Überprüfung der cDNA-Reinheit <sup>1</sup> .....	34
Tab. 11:	shRNA-Konstrukte <sup>1</sup> für die RNAi-vermittelte Herunterregulation der <i>NOTCH1</i> - und <i>NOTCH2</i> -Expression ( <i>Knockdown</i> ).....	34
Tab. 12:	Primärantikörper.....	35
Tab. 13:	Sekundärantikörper.....	35
Tab. 14:	PCR-Zusammensetzung <sup>1</sup> für die PCR zur Überprüfung der cDNA-Reinheit .....	45
Tab. 15:	Temperaturverlauf der PCR zur Überprüfung der cDNA-Reinheit.....	45
Tab. 16:	Temperaturverlauf der <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> -qRT-PCR .....	46
Tab. 17:	PCR-Zusammensetzung <sup>1</sup> für die <i>nested</i> -PCR zur Detektion von Mykoplasmenkontaminationen in Zellkulturüberständen.....	48
Tab. 18:	Temperaturverlauf der <i>nested</i> -PCR 1 und 2 zur Mykoplasmandetektion.....	48
Tab. 19:	PCR-Zusammensetzung <sup>1</sup> für die SYBR Green-basierte qRT-PCR.....	49
Tab. 20:	Temperaturverlauf der SYBR Green-basierten qRT-PCR.....	49
Tab. 21:	Daten der Referenzkurven für die relative Quantifizierung der Genexpression in Zelllinien .....	49
Tab. 22:	Zusammensetzung der Sammel- und Trenngelösungen für die Proteingelektrophorese .....	51
Tab. 23:	Makros <sup>1</sup> für die Quantifizierung von Koloniebildungs <i>assays</i> .....	54
Tab. 24:	Für XTT-basierte Chemosensitivitätsanalysen eingesetzte Zytostatikakonzentrationen.....	55
Tab. 25:	Zusammensetzung des Stammzellmediums (SZM) für die Sphäroidbildungs <i>assays</i> <sup>1</sup> .....	57
Tab. 26:	Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes für den lentiviral vermittelten <i>Knockdown</i> <sup>1</sup> .....	59
Tab. 27:	Charakteristika der Patienten mit lokal fortgeschrittenem Magenkarzinom (T3 und 4) in einem öffentlich zugänglichen Magenkarzinom-Genexpressionsdatensatz .....	62
Tab. 28:	Mittlere C <sub>t</sub> -Werte und Standardabweichungen der potentiellen Referengene .....	64
Tab. 29:	Korrelation der Expression einzelner Gene in Tumorsektaten mit TRG2.....	67
Tab. 30:	Assoziation der Genexpression mit der lokalen Tumorausdehnung (ypT).....	69
Tab. 31:	Assoziation der Genexpression mit dem Metastasenstatus (ypM) <sup>1</sup> .....	70
Tab. 32:	Assoziation der Genexpression mit dem Lymphknotenstatus (ypN).....	71
Tab. 33:	Assoziation der Genexpression mit der Laurén-Klassifikation <sup>1</sup> .....	71



---

Tab. 34:	Assoziation der Genexpression mit der Tumorlokalisierung <sup>1</sup> .....	72
Tab. 35:	Assoziation der Genexpression mit dem Geschlecht der Patienten .....	72
Tab. 36:	Assoziation der Genexpression mit dem Überleben .....	73
Tab. 37:	Univariate Cox Regressionsanalyse <sup>1</sup> und Überleben der Patienten .....	74
Tab. 38:	Multivariate Cox-Regressionanalyse <sup>1</sup> und Überleben der Patienten .....	74
Tab. 39:	Multivariate Cox-Regressionanalyse (Einschluss) .....	77
Tab. 40:	Relative Überlebensraten der Patienten nach Gruppierung anhand des Risiko-Scores <sup>1</sup> .....	77
Tab. 41:	Multivariate Cox-Regressionanalyse für öffentlich verfügbare Genexpressionsdaten <sup>(170)</sup> .....	79
Tab. 42:	Relative Überlebensraten der Patienten in der öffentlichen Datenbank nach Gruppierung anhand des Risiko-Scores <sup>1</sup> .....	79
Tab. 43:	Expressionsänderungen zwischen korrespondierenden prä- und posttherapeutischen Tumorproben .....	80
Tab. 44:	Vergleich der immunhistochemischen Färbung von Notch1 in korrespondierenden prä- und posttherapeutischen Tumorproben .....	82
Tab. 45:	Vergleich der immunhistochemische Färbung von Notch2 in korrespondierenden prä- und posttherapeutischen Tumorproben .....	83
Tab. 46:	Übersicht über die immunhistochemische Färbung von Notch1 und Notch2 in Tumorresektaten mit TRG2 (n=61) .....	85
Tab. 47:	Assoziation der Proteinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern .....	86
Tab. 48:	Korrelation zwischen der Proteinexpression und der mRNA-Expression von Notch1 und Notch2 in Tumorresektaten mit TRG2 .....	87
Tab. 49:	Mittlere Verdoppelungszeiten von SP- und nicht-SP-Zellen (n=3) .....	90
Tab. 50:	Mittlere Kolonieverdoppelungszeiten von MKN28-Knockdown-Zelllinien .....	97

## Publikationen

### Teile dieser Arbeit wurden publiziert

Bauer, L., Langer, R., Becker, K., Hapfelmeier, A., Ott, K., Novotny, A., Höfler, H., Keller, G.  
Expression Profiling of Stem Cell-Related Genes in Neoadjuvant-Treated Gastric  
Cancer: A NOTCH2, GSK3B and beta-catenin Gene Signature Predicts Survival. *PLoS  
One* 7, e44566 (2012).

### Teile dieser Arbeit wurden präsentiert

#### Vorträge

Bauer, L., Langer, R., Becker, K., Hapfelmeier, A., Ott, K., Novotny, A., Höfler, H., Keller, G.  
Expression of stem cell related genes in residual tumor cells of neoadjuvant treated  
gastric cancer patients. (Abstract erschienen in *Der Pathologe*, 32, Sonderheft 1)  
95. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 16. – 19.06.2011, Leipzig

Bauer, L., Langer, R., Mandl, M., Becker, K., Slotta-Huspenina, J., Novotny, A., Hapfelmeier, A.,  
Höfler, H., Keller, G. Notch2 expression and chemoresistance in neoadjuvant treated  
gastric cancer. (Abstract erschienen in *Der Pathologe* 33, Sonderheft 1) 95.  
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 31.05. – 03.06.2012, Berlin

Bauer, L., Müller, E., Slotta-Huspenina, J., Becker, K., Hapfelmeier, A., Novotny, A., Höfler, H.,  
Keller, G. Chemoresistance and Gastric Cancer: Role of Notch Signaling.  
10<sup>th</sup> International Gastric Cancer Conference, 19. – 22.06.2013, Verona, *Best Oral  
Presentation*

#### Posterpräsentationen

Bauer, L., Langer, R., Becker, K., Ott, K., Novotny, A., Hapfelmeier, A., Höfler, H., Keller, G.  
Differential expression of stem cell related genes in neoadjuvant treated gastric cancer.  
5<sup>th</sup> Mildred Scheel Cancer Conference, 13. – 15.07.2011, Königswinter, sowie  
53<sup>rd</sup> Symposium of the Society for Histochemistry, 12. – 15.10.2011

Bauer, L., Langer, R., Becker, K., Ott, K., Novotny, A., Hapfelmeier, A., Höfler, H., Keller, G.  
Gene expression analysis of chemotherapy resistant residual gastric cancer cells  
indicates a role for Notch and Wnt signaling. 1<sup>st</sup> Munich Biomarker Conference,  
29.11.2011, München

Bauer, L., Langer, R., Mandl, M., Becker, K., Slotta-Huspenina, J., Novotny, A., Hapfelmeier, A.,  
Höfler, H., Keller, G. Notch signaling and chemoresistance in gastric cancer. (Abstract  
erschieden in *EJC* 48, Supplement 1) 22<sup>nd</sup> Biennial Congress of the European  
Association for Cancer Research, 07. – 10.07.2012

Bauer, L., Langer, R., Becker, K., Ott, K., Novotny, A., Hapfelmeier, A., Höfler, H., Keller, G.  
Gene expression analysis in neoadjuvant treated gastric cancer: a role for Notch and  
Wnt signaling. Interact 2012 Symposium for Young Scientists, 30.03.2012, München

Bauer, L., Langer, R., Mandl, M., Becker, K., Slotta-Huspenina, J., Novotny, A., Hapfelmeier, A.,  
Höfler, H., Keller, G. Role of Notch Signaling for Chemoresistance in Gastric Cancer.  
17<sup>th</sup> International AEK Cancer Congress 20. – 22.03.2013, Heidelberg

Bauer, L., Müller, E., Mutze, K., Mandl, M., Langer, R., Becker, K., Hapfelmeier, A., Höfler, H., Keller, G.  
Expression of Notch-Signaling Genes in Chemo-Resistant Gastric Cancer Cells. (Abstract  
erschieden in *Der Pathologe* 34, Sonderheft 1) 96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für  
Pathologie, 23. – 26.05.2013, Heidelberg

## Anhang

**Tab. A1: Liste der in der *Screening*-Analyse untersuchten Gene mit kurzer Beschreibung der jeweiligen Funktion in Bezug auf Tumorstammzellen und/oder Relevanz für das Magenkarzinom**

<b>Gen</b>	<b>Funktion / Assoziation mit Tumorstammzellen</b>	<b>Referenzen <sup>1</sup></b>
<i>CHD1</i>	Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps, erhält offene Chromatinstruktur in embryonalen Stammzellen	(267)
<i>KLF4</i>	Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps, Regulation von Differenzierung und Proliferation	(60,268)
<i>NANOG</i>	Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps von embryonalen Stammzellen	(61,96)
<i>POU5F1</i>	Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps	(60,61)
<i>SOX2</i>	Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps	(60,61)
<i>BMI1</i>	Reguliert Teilungssymmetrie von hämatopoetischen Stammzellen, kennzeichnet Stammzellreserve in intestinalen Epithelien	(99,269,270)
<i>PROM1 (CD133)</i>	Potentieller Tumorstammzellmarker (Glioblastom, Kolonkarzinom und andere)	(80,271)
<i>CD24</i>	Potentieller negativer Tumorstammzellmarker für Brustkrebs (niedrige Expression in Kombination mit CD44)	(85)
<i>CD44</i>	Potentieller Tumorstammzellmarker für Brustkrebs (in Kombination mit niedriger CD4-Expression)	(85)
<i>ATXN1</i>	Regulation des Notch-Signaling: Repressor	(272)
<i>CTNNB1</i>	Wnt Signalweg Transkriptionsfaktor, Regulation von Stammzeleigenschaften	(100,101,269)
<i>DKK3</i>	Wnt Signalweg Inhibitor, involviert in Tumordifferenzierung und Angiogenese	(108)
<i>FZD1</i>	Wnt-Signalweg-Rezeptor, Regulation von Stammzellproliferation, Chemoresistenzassoziiert	(106,107,269)
<i>ASCL2</i>	Wnt-Zielgen, reguliert intestinale Stamzellen	(110)
<i>LGR4</i>	Wnt-Zielgen, nah verwandt mit LGR5, aktiviert Wnt-Signalweg	(112)
<i>LGR5</i>	Wnt-Zielgen, Biomarker für gastrointestinale Stammzellen, aktiviert Wnt-Signalweg	(111,112)
<i>OLFM4</i>	Wnt-Zielgen, Biomarker für Differenzierung in Magenkarzinomen, Biomarker für intestinale Stammzellen	(201,273)
<i>IHH</i>	Hedgehog-Signalweg: Ligand	(104,269)
<i>PTCH1</i>	Hedgehog-Signalweg: Rezeptor	(104,269)
<i>SHH</i>	Hedgehog-Signalweg: Ligand	(104,269)
<i>SMO</i>	Hedgehog-Signalweg: Signaltransduktor	(104,269)
<i>GLI1</i>	Hedgehog-Signalweg: Transkriptionsfaktor (Aktivator)	(104,269)
<i>NOTCH1</i>	Notch-Signalweg-Rezeptor und Transkriptionsfaktor	(102,269)
<i>NOTCH2</i>	Notch-Signalweg-Rezeptor und Transkriptionsfaktor	(102,269)
<i>AXIN1</i>	Wnt Signalweg Regulator, Teil des $\beta$ -Catenin-Zerstörungskomplexes	(100)
<i>CCND1</i>	Wnt-Zielgen, Zellzyklusregulator, Onkogen	(109)
<i>MYC</i>	Wnt-Zielgen, Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps, Onkogen	(60)
<i>FOXD3</i>	Beteiligt an Differenzierung und embryonaler Entwicklung, epigenetische Repression korreliert mit fortschreitendem Magenkarzinom	(229)
<i>SFRP1</i>	Löslicher Wnt-Rezeptor: kompetitiver Antagonist von FZD, Hedgehog-Zielgen	(104)
<i>LIN28</i>	Aufrechterhaltung des Stammzellphänotyps von embryonalen Stammzellen	(61)

<b>Gen</b>	<b>Funktion / Assoziation mit Tumorstammzellen</b>	<b>Referenzen <sup>1</sup></b>
<b><i>CD34</i></b>	Hämatopoetischer Differenzierungsmarker: Erhöhte Expression in Magenkarzinomgefäßen, potentieller hämatookologischer Stammzellmarker	(89,90)
<b><i>CDX2</i></b>	Intestinaler Differenzierungsmarker, wird bei intestinaler Metaplasie des Magens verstärkt exprimiert	(274)
<b><i>GADD45A</i></b>	Beteiligt an zellulärer DNA-Schaden- und Stressantwort, prädiktiver Marker für Chemotherapieresistenz im Magen	(275,276)
<b><i>DNMT3A</i></b>	Epigenetische Genexpressionsrepression, reguliert hämatopoetische Stammzellendifferenzierung	(277)
<b><i>DNMT3B</i></b>	Epigenetische Genexpressionsrepression, korreliert mit Prognose im Pankreas Karzinom	(278)
<b><i>ABCB1</i></b>	Vermittelt Chemoresistenz durch Cytostatika-Export	(279)
<b><i>ABCG2</i></b>	Vermittelt Chemoresistenz durch Cytostatika-Export	(135)
<b><i>ALDH1A1</i></b>	Potentieller Tumorstammzellmarker	(126)
<b><i>GSK3B</i></b>	Multifunktionale Kinase, Teil des $\beta$ -Catenin-Zerstörungskomplexes, tumorfördernde und tumorsuppressive Funktionen	(100,280)
<b><i>MKI67</i></b>	Proliferationsmarker	(281)
<b><i>DNMT1</i></b>	Epigenetische Genexpressionsrepression, prädiktiver Biomarker im Magenkarzinom	(158)
<b><i>CDH1</i></b>	Zelladhäsionsmolekül, Expressionsverlust häufig bei diffusem Magenkarzinom	(19,21)
<b><i>HDAC2</i></b>	Chromosomen- und Chromatin-Modulator, Apoptoseregulation	(282)
<b><i>HDAC1</i></b>	Chromosomen- und Chromatin-Modulator, Proliferations- und Differenzierungsregulation	(282,283)

<sup>1</sup> Referenzen beziehen sich auf das Literaturverzeichnis (Abschnitt 5)

Tab. A2:  $\Delta$ Rn-Grenzwerte für die C<sub>T</sub>-Wert-Bestimmung mit *TaqMan*<sup>®</sup> *Low Density Arrays*

Gen	Detektor	$\Delta$ Rn-Grenzwert <sup>1</sup>
<i>CHD1</i>	CHD1-Hs00154405_m1	0,4759771
<i>KLF4</i>	KLF4-Hs00358836_m1	0,32243829
<i>NANOG</i>	NANOG-Hs02387400_g1	0,22953704
<i>POU5F1</i>	POU5F1-Hs00999632_g1	0,43437833
<i>SOX2</i>	SOX2-Hs01053049_s1	0,63744203
<i>BMI1</i>	BMI1-Hs00180411_m1	0,33204004
<i>PROM1 (CD133)</i>	PROM1-Hs01009257_m1	0,31912617
<i>CD24</i>	CD24-Hs02379687_s1	0,41728907
<i>CD44</i>	CD44-Hs01075861_m1	0,58530845
<i>ATXN1</i>	ATXN1-Hs00165656_m1	0,23149513
<i>CTNNB1</i>	CTNNB1-Hs00355045_m1	0,42004227
<i>DKK3</i>	DKK3-Hs00247426_m1	0,41877615
<i>FZD1</i>	FZD1-Hs00268943_s1	0,2373933
<i>ASCL2</i>	ASCL2-Hs00270888_s1	0,21544323
<i>LGR4</i>	LGR4-Hs00173908_m1	0,43425732
<i>LGR5</i>	LGR5-Hs00173664_m1	0,30410135
<i>OLFM4</i>	OLFM4-Hs00197437_m1	0,34526832
<i>IHH</i>	IHH-Hs01081801_m1	0,16892519
<i>PTCH1</i>	PTCH1-Hs00970979_m1	0,40691231
<i>SHH</i>	SHH-Hs00179843_m1	0,16267449
<i>SMO</i>	SMO-Hs01090242_m1	0,34318449
<i>GLI1</i>	GLI1-Hs00171790_m1	0,38017543
<i>NOTCH1</i>	NOTCH1-Hs01062014_m1	0,34574907
<i>NOTCH2</i>	NOTCH2-Hs01050719_m1	0,23355116
<i>AXIN1</i>	AXIN1-Hs00394718_m1	0,42807922
<i>CCND1</i>	CCND1-Hs00765553_m1	0,38947503
<i>MYC</i>	MYC-Hs00905030_m1	0,436347
<i>FOXD3</i>	FOXD3-Hs00255287_s1	0,3385598
<i>SFRP1</i>	SFRP1-Hs00610060_m1	0,30410135
<i>LIN28</i>	LIN28-Hs00702808_s1	0,57064532
<i>CD34</i>	CD34-Hs02576480_m1	0,409152
<i>CDX2</i>	CDX2-Hs01078080_m1	0,423962
<i>GADD45A</i>	GADD45A-Hs00169255_m1	0,37401249
<i>DNMT3A</i>	DNMT3A-Hs01027166_m1	0,31887805
<i>DNMT3B</i>	DNMT3B-Hs00171876_m1	0,483561
<i>ABCB1</i>	ABCB1-Hs00184500_m1	0,64202325
<i>ABCG2</i>	ABCG2-Hs01053790_m1	0,35508
<i>ALDH1A1</i>	ALDH1A1-Hs00946916_m1	0,5962673
<i>GSK3B</i>	GSK3B-Hs00275656_m1	0,48248642
<i>MKI67</i>	MKI67-Hs01032443_m1	0,25532307
<i>DNMT1</i>	DNMT1-Hs00154749_m1	0,35933311
<i>CDH1</i>	CDH1-Hs01013953_m1	0,28038007

<b>Gen</b>	<b>Detektor</b>	<b><math>\Delta Rn</math>-Grenzwert<sup>1</sup></b>
<i>HDAC2</i>	HDAC2-Hs00231032_m1	0,306689
<i>HDAC1</i>	HDAC1-Hs00606262_g1	0,28083509
<i>JAG1</i>	JAG1-Hs01070032_m1	0,284787
<i>HES1</i>	HES1-Hs00172878_m1	0,236528
<i>GAPDH</i>	GAPDH-Hs99999905_m1	0,28052432
<i>IPO8</i>	IPO8-Hs00183533_m1	0,42385511
<i>POLR2A</i>	POLR2A-Hs00172187_m1	0,39708105
<i>UBC</i>	UBC-Hs00824723_m1	0,70418223

<sup>1</sup>  $\Delta Rn$  ist der Basislinien-korrigierte Quotient aus den Fluoreszenzen des Detektors und der passiven Referenz.

**Tab. A3: Optimale Grenzwerte der Genexpression bezogen auf das Gesamtüberleben der Patienten mit TRG2-Tumoren sowie zugehörige p-Werte des konditionellen Inferenztests. Zur Veranschaulichung sind auch die aufgrund der multiplen Testung invaliden p-Werte der Log-Rang-Statistik aufgeführt.**

Gen	GW	n<GW	n≥GW	p (KIT)	p (LR)
<i>ABCB1</i>	0,305	7	56	0,247	0,144
<i>ABCG2</i>	4,24	54	9	0,051	0,026
<i>ALDH1A1</i>	1,034	16	47	0,842	0,096
<i>ASCL2</i>	0,21	9	54	0,765	0,159
<i>ATXN1</i>	1,363	39	24	0,554	0,151
<i>AXIN1</i>	0,884	35	28	0,544	0,094
<i>BMI1</i>	0,181	11	52	0,793	0,062
<i>CCND1</i>	1,24	50	13	0,220	0,019
<i>CD24</i>	0,154	8	55	0,992	0,686
<i>CD34</i>	1,572	53	10	0,412	0,342
<i>CD44</i>	0,079	9	54	0,610	0,130
<i>CDH1</i>	2,247	36	27	0,224	0,093
<i>CDX2</i>	3,41	48	15	0,153	0,072
<i>CHD1</i>	2,743	49	14	0,104	0,056
<i>CTNNB1</i>	0,9	15	48	0,043	0,000
<i>DKK3</i>	1,581	53	10	0,770	0,118
<i>DNMT1</i>	1,299	53	10	0,041	0,005
<i>DNMT3A</i>	1,416	30	33	0,977	0,009
<i>DNMT3B</i>	0,349	7	56	0,836	0,085
<i>FOXD3</i>	0,239	7	56	0,715	0,287
<i>FZD1</i>	1,59	51	12	0,897	0,469
<i>GADD45A</i>	0,209	8	55	0,488	0,215
<i>GAPDH</i>	0,597	16	47	0,759	0,368
<i>GLI1</i>	1,688	42	21	0,920	0,294
<i>GSK3B</i>	1,119	40	23	0,006	0,007
<i>HDAC1</i>	0,439	42	21	0,773	0,042
<i>HDAC2</i>	0,484	11	52	0,954	0,219
<i>IHH</i>	1,016	19	44	0,865	0,210
<i>KLF4</i>	1,872	24	39	0,559	0,278
<i>LGR4</i>	1,027	39	24	0,879	0,085
<i>LGR5</i>	0,476	29	34	0,888	0,118
<i>LIN28</i>	0,402	20	43	0,683	0,051
<i>MKI67</i>	1,532	52	11	0,340	0,193
<i>MYC</i>	2,449	42	21	0,765	0,050
<i>NANOG</i>	1,15	49	14	0,463	0,149
<i>NOTCH1</i>	0,696	46	17	0,109	0,224
<i>NOTCH2</i>	0,553	31	32	0,071	0,012
<i>OLFM4</i>	14,69	53	10	0,055	0,038
<i>POU5F1</i>	0,897	48	15	0,575	0,000
<i>PROM1</i>	0,096	23	40	0,540	0,288

<b>Gen</b>	<b>GW</b>	<b>n&lt;GW</b>	<b>n≥GW</b>	<b>p (KIT)</b>	<b>p (LR)</b>
<i>PTCH1</i>	1,155	12	51	0,524	0,033
<i>SFRP1</i>	12,81	53	10	0,693	0,730
<i>SHH</i>	2,872	55	8	0,822	0,164
<i>SMO</i>	1,884	49	14	0,432	0,125
<i>SOX2</i>	0,45	8	55	0,885	0,210

**GW**: Grenzwert, **KIT**: konditionaler Inferenztest, **LR**: Log Rank



## Danksagungen

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Gisela Keller für die exzellente Betreuung meiner Arbeit und die Überlassung des spannenden Themas. Ich weiß die vielen Freiräume, die abwechslungsreiche Arbeit und vor allem das stets freundschaftliche Arbeitsverhältnis sehr zu schätzen.

Herrn Prof. Michael Groll danke ich für die Bereitschaft diese Doktorarbeit als Erstprüfer zu begutachten.

Herrn Prof. Heinz Höfler danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie durchzuführen.

Mein Dank gilt auch den vielen Unterstützern aus anderen Instituten, ohne die meine Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Herrn Dr. Alexander Nowotny und Frau Prof. Katja Ott danke ich für die Bereitstellung der klinischen Daten zu den Tumorproben. Alexander Hapfelmeier danke ich für die stets schnelle und ausführliche Hilfe bei statistischen Fragestellungen. Herrn PD Dr. Tobias Dechow und Frau Dr. Anja Baumgart danke ich für die Beratung in Sachen *NOTCH-Knockdown* sowie die unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Transfektion. Herrn Dr. Joachim Ellwart danke ich für die Bereitstellung und Einweisung in das FACS Gerät für die SP-Analysen. Herrn Prof. Achim Krüger danke ich für die Bereitstellung der Geräte und Frau Katja Honert danke ich für die technische Assistenz bei der Durchführung der TLDA-Analysen.

Ich danke „unseren assoziierten Pathologen“ Rupert Langer und Julia Slotta-Huspenina für die Beantwortung meiner pathologischen und histologischen Fragen sowie für die wertvolle Unterstützung bei der Kennzeichnung der Tumoreale und der Auswertung der immunhistochemischen Analysen.

Kathrin Mutze, meine Vorgängerin und Wegbegleiterin, möchte ich für die Einführung in diverse Methoden, die vielen fachlichen und nicht fachlichen Diskussionen und Gespräche und die vielen Lacher danken.

Ich danke Susanne Plaschke für ihre Hilfe und Unterstützung während des Projekts. Besonders natürlich für ihr fröhliches „Kein Problem!“ wenn ich mal wieder was zum schneiden hatte oder Unterstützung bei der Extraktion brauchte.

Ich habe mich an diesem Institut stets wohl gefühlt. Ganz besonders ist dies einer Reihe von Kollegen zu verdanken, mit denen ich viel Spaß hatte, aber auch Ernstes bereden konnte und die ich nun Freunde nenne. Danke Simone, Katharina, Claudia, Angie, Sonja, Kathrin, Bosse, Julia und Susanne. Aber auch alle anderen Beschäftigten des Instituts waren stets freundlich, hilfs- und gesprächsbereit mir gegenüber. Danke.

Meinen Eltern danke ich für die großartige Unterstützung auf meinem langen Weg hierher.

Meiner lieben Eva danke ich für den Rückhalt, den Glauben an mich, den Zuspruch und Trost und vor allem für ihre Geduld und Rücksichtnahme, wenn ich mal wieder mehr Abende im Labor als bei ihr verbracht habe.

Danke