

Aus dem
CharitéCentrum für Magen-, Darm, Nieren- und Stoffwechselmedizin
Klinik für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie Campus Benjamin Franklin
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. H.J. Buhr

Habilitationsschrift

Untersuchung des Zusammenhangs zwischen differentieller Genexpression und phänotypischen Veränderungen solider Karzinome am Beispiel des kolorektalen Karzinoms

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Jörn Gröne
geboren am 10. Mai 1972 in Celle

Eingereicht: Mai 2011
Dekanin: Frau Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Hans K. Schackert
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Hans-Peter Bruch

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis	2
2.	Abkürzungsverzeichnis	4
3.	Einleitung und Stand der Forschung	7
3.1	Das kolorektale Karzinom	7
3.1.1	Epidemiologie & Ätiologie	7
3.1.2	Therapie & Prognose	9
3.1.3	Molekulare Pathogenese	13
3.2	Genexpressionsanalyse - Gene Expression Profiling	16
3.2.1	Microarray-Technologie	16
3.2.2	Erwartungen & Anwendungsbereiche	18
3.2.3	Grenzen & Herausforderungen	21
4.	Ziele, Patientenkollektiv & Ergebnisse	24
4.1	Zielstellung	24
4.1.1	Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Normal- und Tumorepithel	24
4.1.2	Untersuchung des Zusammenhangs zwischen differentieller Genexpression und etablierten klinisch-pathologischen Stadien (UICC)	24
4.1.3	Etablierung von Genexpressionssignaturen zur Vorhersage des klinischen Verlaufs	25
4.2	Patientenkollektiv	25
4.3	Ergebnisse	26
4.3.1	Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Normal- und Tumorepithel	26
4.3.2	Untersuchung des Zusammenhangs zwischen differentieller Genexpression und etablierten klinisch-pathologischen Stadien (UICC)	63
4.3.3	Etablierung von Genexpressionssignaturen zur Vorhersage des klinischen Verlaufs	73

5.	Diskussion	87
5.1	Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Normal- und Tumorepithel	87
5.2	Untersuchung des Zusammenhangs zwischen differentieller Genexpression und etablierten klinisch-pathologischen Stadien (UICC)	94
5.3	Etablierung von Genexpressionssignaturen zur Vorhersage des klinischen Verlaufs	98
6.	Zusammenfassung	103
7.	Literatur	105
8.	Verwendete eigene Arbeiten	121
9.	Danksagung	123
10.	Erklärung	124

2. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
AAPC	Attenuierte Familiäre Adenomatöse Polyposis
ANOVA	Methode: Univariate Varianzanalyse (Analysis of Variance)
APC	Gen: Adenomatosis Polyposis Coli
bp	Basenpaar (aus komplementären Nukleotiden)
CA2	Gen: Carbonic Anhydrase II
cDNA	Copy-DNA (wird mittels der reversen Transkriptase aus RNA synthetisiert)
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CEA	Tumormarker: Carcino-Embryonales Antigen
CGH	Methode: Comparative Genomic Hybridisation; vergleichende genomische Hybridisierung zur Untersuchung genetischer Veränderungen
CIMP	CpG-Insel-Methylator-Phänotyp
CIMP-H	CpG-Insel-Methylator-Phänotyp mit hoher Methylierung
CIMP-L	CpG-Insel-Methylator-Phänotyp mit niedriger Methylierung
cRNA	Copy-RNA (die komplementär zur cDNA)
Cy3 und Cy5	Wasserlöslicher, synthetischer, organischer Farbstoff (Cy3 ist grün, Cy5 rötlich)
DCC	Gen: Deleted in Colorectal Cancer
DNA	Desoxynukleinsäure
DEG	Differentiell exprimiertes Gen
DPC4	Gen: Deleted in Pancreatic Carcinoma, locus 4
EGFR	Gen: Epidermal-Growth-Factor-Receptor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
EU	Europäische Union
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FFPE	Formalin fixiert, Paraffin eingebettet
FJP	Familiäre Juvenile Polyposis Coli
FOLFIRI	Therapieschema zur adjuvanten Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms mit den Wirkstoffen Folinsäure (Leucovorin), Fluorouracil (5-FU) und Irinotecan

5-FU	Fluorouracil / 5-Fluoruracil
GEO	Gene Expression Omnibus (Öffentliche Datenbank für funktionelle genomische Daten)
GSPT2	Gen: G1 to S Phase Transition 2
HER2/neu	Gen: Epidermal Growth Factor Receptor 2
HMPS	Hereditary-Mixed-Polyposis Syndrome
HNPCC	Hereditäres Nicht Polypöses Kolorektales Karzinom
HOXA9	Gen: Homeobox Protein Hox-A9
HPCS	Hyperplastic Polyposis Coli Syndrome
KRAS	Gen: Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
LOH	Loss of Heterozygosity
MAP	MUTHY assoziierte Polyposis
MCC	Gen: Mutated in Colorectal Cancer
miRNA	Micro RNA (kurze, hoch konservierte, nicht kodierende RNA)
MMR	Mismatch-Repair (DNA-Reparatursystem)
MLH1	Gen: MutL homolog 1 (kodiert für das Protein MLH1, welches Teil des Mismatch-Repair-Systems ist)
MSH2	Gen: MutL homolog 2 (kodiert für das Protein MLH2, welches Teil des Mismatch-Repair-Systems ist)
MSH3	Gen: MutL homolog 3 (kodiert für das Protein MLH3, welches Teil des Mismatch-Repair-Systems ist)
MSH6	Gen: MutL homolog 6 (kodiert für das Protein MLH6, welches Teil des Mismatch-Repair-Systems ist)
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H	Hoch-mikrosatelliteninstabil
MSI-L	Niedrig-mikrosatelliteninstabil
MSS	Mikrosatellitenstabilität
MUTYH	Gen: MutY Homolog (E. coli)
MYC	Gen: Benannt nach der Myelocytomatose, einer Viruserkrankung von Vögeln, bei der MYC als erstes beschrieben wurde
LAPTM4b	Gen: Lysosome-associated Protein Transmembrane 4 beta
p53	Gen: Benannt nach der scheinbaren Molekularmasse von 13 kDa
PCA	Methode: Principal Component Analysis

PJS	Peutz-Jeghers-Syndrom
PMS1	Gen: Postmeiotic Segregation Increased 1 (<i>S. cerevisiae</i>) (kodiert für das Protein PMS1, welches Teil des Mismatch-Repair-Systems ist)
PMS2	Gen: Postmeiotic Segregation Increased 2 (<i>S. cerevisiae</i>) (kodiert für das Protein PMS2, welches Teil des Mismatch-Repair-Systems ist)
RNA	Ribonukleinsäure
Robo1	Gen: Roundabout homolog 1
RTq-PCR	Real-Time-quantitative-PCR (PCR-Methode, die die Amplifikation und gleichzeitige Quantifizierung von Nukleinsäuren ermöglicht)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Variationen einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang)
TME	Total mesorektale Exzision
TNM	Facettenklassifikation, die der Stadieneinteilung von malignen Tumoren dient. Die Kategorie T (Tumor) beschreibt die Ausdehnung des Primärtumors, N (Nodus/Lymphknoten) das Fehlen bzw. Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und M (Metastasen) das Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen
UICC	Union for International Cancer Control

3. Einleitung und Stand der Forschung

Das kolorektale Karzinom ist mit einer Inzidenz von ca. 70 000 Patienten / Jahr und einer Mortalitätsrate von circa 30 000 Patienten / Jahr weiterhin einer der häufigsten malignen Tumore in Deutschland. Unter leitliniengerechter, multimodaler Therapie mit onkologischer Resektion versterben heute immer noch bis zu 47 % aller Patienten tumorbedingt im Verlauf ihrer Erkrankung (Husmann et al. 2010). Bei derzeit prognostisch nahezu ausgereizten chirurgischen Therapiestrategien stellen die Identifikation und Validierung a) neuer molekularer Angriffspunkte für die medikamentöse Tumortherapie (Targets), b) neuer Marker für die individuelle Vorhersage der Verträglichkeit und des Ansprechens der medikamentösen Tumortherapie und c) neuer individueller Prognosemarker, aktuelle Herausforderungen für die Tumorforschung dar. Mit der Entwicklung von Microarrays Mitte der 90er Jahre wurde eine Technologie geschaffen, mit der die Expression von anfänglich hunderten und zuletzt zehntausenden von Genen simultan analysiert werden kann und damit die Korrelation vom Phänotyp einer Erkrankung mit dem molekularen Profil, dem Genotyp, ermöglicht (Dangond et al. 2000; Mahadevappa et al. 1999).

3.1. Das kolorektale Karzinom

3.1.1. Epidemiologie & Ätiologie

Definitionsgemäß gelten Tumore als Kolonkarzinome, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop mehr als 16 cm von der linea dentata entfernt liegt. Da anatomisch keine scharfe Grenze am Übergang vom Rektum zum Sigma besteht und die Höhe der peritonealen Umschlagfalte individuell variiert, ist für die Definition des Rektumkarzinoms entscheidend, dass der untere Tumorrand weniger als 16 cm zur linea dentata misst (Dielling et al. 1991; Soreide et al. 1997). Von den Karzinomen entfallen 69 % auf das Kolon und 31 % auf das Rektum (Coates et al. 1995). Nach der WHO werden das Adenokarzinom, welches mit über 90 % den größten Anteil ausmacht, das muzinöse Karzinom (Gallertkarzinom), das Siegelringzellkarzinom, das medulläre Karzinom, das adeno-squamöse Karzinom, das kleinzellige Karzinom, das Plattenepithelkarzinom und das undifferenzierte Karzinom unterschieden (Hamilton et al. 2000). Mit einer Inzidenz von ca. 37 000 für Männer und ca. 36 000 für Frauen pro Jahr und einer Mortalitätsrate von ca. 30 000

pro Jahr in Deutschland ist das KRK einer der häufigsten malignen Tumoren und für beide Geschlechter die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache. Das Lebenszeitrisko für einen Deutschen, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt ca. 6 %, das Risiko, daran zu versterben 2,5 - 3 %. Im Gegensatz zur Stagnation der Inzidenz nimmt die Sterberate für beide Geschlechter ab (Husmann et al. 2010). Im internationalen Vergleich findet man die höchsten Inzidenzraten in Europa, Nordamerika und Australien. Die niedrigsten Erkrankungsraten werden in Afrika, Asien und Lateinamerika verzeichnet (Karsa et al. 2010). Unter den EU-Ländern liegt die Inzidenz für Männer in Polen und Frankreich am höchsten, für Frauen in Luxemburg und Belgien. Verhältnismäßig niedrige Erkrankungsraten finden sich in Griechenland, Finnland, Spanien und der Schweiz. Die Inzidenz in Deutschland liegt im mittleren Drittel (Husmann et al. 2010).

Neben den bekannten exogenen Risikofaktoren, wie einer kalorienreichen sowie ballaststoffarmen Kost mit hohem Anteil an tierischen Proteinen und Fetten, einem erhöhten Körpergewicht, sowie einer geringen körperlichen Aktivität und sitzender Tätigkeit, die mit dadurch assoziierten genetischen Alterationen für die Entstehung des sporadischen KRK verantwortlich gemacht werden können (Almendingen et al. 2001; Norat et al. 2002), lässt sich bei bis zu 20 % aller kolorektalen Karzinome eine familiäre Häufung nachweisen, was entweder einen genetischen Hintergrund oder eine gemeinsame Exposition der Familienangehörigen bezüglich externer Risikofaktoren oder eine Kombination von beidem nahelegt (Fuchs et al. 1994; Hagggar et al. 2009). Vor allem beim frühzeitigen Auftreten kolorektaler Karzinome, das heißt vor dem 40. Lebensjahr, spielen genetische Prädispositionen eine entscheidende Rolle, was sich zumeist auch in einer erhöhten familiären Belastung widerspiegelt. Zu den häufigsten hereditären Präkanzerosen zählen die autosomal dominant vererbte Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli (FAP) und das nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC). Das HNPCC Syndrom ist für ca. 2 - 7 % aller kolorektalen Karzinome verantwortlich (Katballe et al. 2002; Lamberti et al. 2006; Lynch et al. 2003), die FAP hingegen nur für etwa 1 % aller kolorektalen Karzinome (Gibbons et al. 2010). Erbliche Syndrome wie das Peutz-Jeghers-Syndrom, die juvenile Polyposis Coli, das Turcot-Syndrom, das Muir-Torre-Syndrom und das Cronkhite-Canada Syndrom scheinen zwar auch für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms zu prädisponieren, sind jedoch aufgrund ihres seltenen Auftretens von untergeordneter Bedeutung. Ein weiterer endogener Risikofaktor ist

das Vorliegen einer CED. Patienten mit Colitis Ulcerosa weisen ein erhöhtes Risiko für ein KRK auf. In einer Metaanalyse betrug das kumulative Karzinomrisiko bei Pancolitis Ulcerosa 2 % nach zehn Jahren, 9 % nach 20 Jahren und 18 % nach 30 Jahren (Eaden et al. 2001). Beim Morbus Crohn ist ebenfalls von einem erhöhten Karzinomrisiko auszugehen, welches mit einer zwei- bis dreifachen Erhöhung im Vergleich zum Risiko bei der Colitis Ulcerosa geringer eingeschätzt wird (Laukoetter et al. 2010).

3.1.2. Therapie & Prognose

Die chirurgisch-onkologisch radikale Resektion ist bis heute das einzige potenziell kurative Therapieverfahren für das kolorektale Karzinom. Das operative Vorgehen umfasst dabei die Resektion des Tumor tragenden Darmabschnitts mit zentraler, radikulärer Ligatur der regionär versorgenden Arterien und Venen und die En-bloc-Entfernung des regionären Lymphabflussgebietes. Das Ausmaß der Darmresektion wird durch die Resektion der versorgenden Gefäße und das hierdurch definierte Lymphabflussgebiet vorgegeben. Liegt der Primärtumor zwischen zwei zentralen Gefäßen, werden beide mit entfernt. An dem Versorgungsgebiet der radikulär durchtrennten Gefäße orientiert sich das Resektionsausmaß, welches jedoch aufgrund des regionären Lymphabflussgebietes mindestens 10 cm beidseits des Tumors betragen sollte (Fielding et al. 1991; Goligher et al. 1984). Bei der Chirurgie des Rektumkarzinoms stellt neben der radikulären Ligatur der A. mesenterica inferior die En-bloc-Entfernung des Mesorektums, die totale mesorektale Exzision (TME), eine der entscheidenden Säulen für die radikale Resektion dar, da Rektumkarzinome typischerweise schon frühzeitig extramurale Satellitenmetastasen im Mesorektum bilden (Heald et al. 1982a; Heald et al. 1982b). Das Rektumkarzinom wird je nach Tumorlokalisierung und -größe klassischerweise durch die kontinenzerhaltende tiefe anteriore oder intersphinkteräre Rektumresektion und die abdomino-perineale Rektumexstirpation jeweils mit TME radikal reseziert, wobei bei Vorliegen sogenannter low-risk-Rektumkarzinome (pT1, G1-2, L0, V0, M0) eine lokale transanale chirurgische Tumorexzision in kurativer Absicht vertretbar ist (Schmiegel et al. 2010).

Bis zur Mitte der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts war die kurativ intendierte Behandlung des kolorektalen Karzinoms, wie auch anderer solider Tumore, ein monomodales Therapiekonzept. Die Prognose der Patienten mit einem KRK konnte

bis dahin therapeutisch ausschließlich durch die chirurgische Technik beeinflusst werden (Turnbull et al. 1967). Mit dem Nachweis einer Verbesserung des Überlebens beim Kolonkarzinom durch eine adjuvante Chemotherapie (Wolmark et al. 1988) und beim Rektumkarzinom durch eine adjuvante kombinierte Radiochemotherapie (Fisher et al. 1988) wurde die Ära der multimodalen Therapie beim KRK eingeläutet. Die Entwicklung neuer Substanzen führte zu einer besseren Verträglichkeit und einem weiter verbesserten 5-Jahresüberleben beim Kolon- und Rektumkarzinom. Durch Etablierung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie konnte zudem die Problematik der hohen Rate an lokalen Rezidiven im kleinen Becken nach Resektionen von Rektumkarzinomen verringert werden (Sauer et al. 2004).

Um das Risiko für ein Tumorrezidiv abschätzen zu können und entscheiden zu können, ob eine Indikation für eine adjuvante Therapie besteht, werden die Patienten anhand der pathologischen und klinischen Ausbreitung des Tumors klassifiziert. Bereits in den 30er und 40er Jahren des letzten Jahrhunderts untersuchten Dukes et al. den Zusammenhang zwischen pathologischen Charakteristika und der Prognose von Patienten mit einem Rektumkarzinom. Das Ergebnis war die Dukes-Klassifikation, die im Original (Dukes et al. 1932) und in modifizierter Version (Astler et al. 1954; Kirklin et al. 1949; Turnbull et al. 1967) bis heute Anwendung findet. In Deutschland hat sich die TNM-Klassifikation der UICC durchgesetzt, die im wesentlichen über die Infiltrationstiefe in die Darmwand bzw. die Infiltration angrenzender Strukturen (T), die Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und das Auftreten von Fernmetastasen (M) die Tumorausbreitung und die Prognose abschätzt (Denoix et al. 1959; Sobin et al. 2010). Die postoperative Tumorformel ist ein wichtiger prognostischer Faktor und stellt über die Verknüpfung eines definierten Tumorstadiums mit einer statistischen Überlebenswahrscheinlichkeit auch einen ersten Schritt in Richtung individualisierter Therapie dar.

Nach einer kompletten Entfernung des Tumors in kurativer Absicht (R0-Resektion) werden unter Einsatz der multimodalen Therapie in Abhängigkeit vom Tumorstadium Fünfjahresüberlebensraten zwischen 97 % (UICC I) und 73 % (UICC III) bei einem Gesamtüberleben von 71 % erzielt (Andreoni et al. 2007). Verbleiben postoperativ mikroskopische (R1) oder makroskopische Tumorreste (R2) im Patienten, so sinkt die Fünfjahresüberlebensrate auf 4,3 % bzw. 10,7 % (Hermanek et al. 1997).

Die derzeit gebräuchliche Beurteilung der Prognose anhand der TNM-Klassifikation wird jedoch trotz regelmäßiger Anpassungen nur unzureichend dem biologischen

Verhalten und somit den individuell variierenden Krankheitsverläufen gerecht. Als Gruppenklassifikation kann sie nur Patienten einer dem Gruppendurchschnitt entsprechenden Fünfjahresüberlebensrate zuordnen, aber nicht das individuelle Risiko für ein Tumorrezidiv voraussagen.

Auf der Suche nach unabhängigen Prognoseparametern wurden zahlreiche histopathologische Veränderungen, wie z. B. der histologische Differenzierungsgrad, Veneneinbrüche, Lymphgefäß- und Perineuralscheideninvasion, die histologische Beschaffenheit des Tumorrandes und das Ausmaß der peritumorösen lymphozytären Infiltration beschrieben. Auch wenn innerhalb der Studien ein UICC-Stadium unabhängiger prognostischer oder prädiktiver Wert gezeigt werden konnte, steht eine externe Validierung der Parameter für den täglichen Gebrauch aus (Compton et al. 2003). Tumor-, Patienten- und Behandlungs-assoziierten Kriterien, wie die Lokalisation des Primärtumors, Tumorileus / Tumorperforation, das Geschlecht des Patienten, die Technik der Tumormobilisation, die intraoperative Tumorzell-dissemination, der Chirurg und die Erfahrung der behandelnden Klinik scheinen ebenfalls prognostisches Potential zu besitzen und stellen beispielsweise in der Situation des Kolonkarzinoms im Stadium UICC II mit Kolonperforation oder Ileus eine Entscheidungshilfe zu Gunsten einer adjuvanten Chemotherapie dar (Hermanek et al. 1997; Schmiegel et al. 2010).

Neben neuen und etablierten histopathologischen und anderen Parametern wurden in zahlreichen Studien molekulare Marker mit diagnostischem, prädiktivem, prognostischem und therapeutischen Potenzial beschrieben, deren klinische Relevanz möglich bis wahrscheinlich ist, aber in unabhängigen Studien noch bestätigt werden muss. Die potenziell relevanten molekularen Marker umfassen Onkogene, Tumorsuppressorgene, Angiogenese-, Adhäsions-, Apoptosefaktoren, Proteasen, Proteaseinhibitoren sowie die entsprechenden Rezeptoren. Zu den am besten untersuchten prognostischen und prädiktiven Faktoren gehören der Verlust der Heterozygotie am Chromosom 18q, die Mutation von p53, die KRAS-Mutation, die Mikrosatelliteninstabilität und die Thymidilatsynthase. Obwohl sich für einige Gene und Genprodukte Alterationen in kolorektalen Karzinomen regelmäßig nachweisen ließen, blieb deren prognostische Relevanz aufgrund uneinheitlicher Studienergebnisse letztendlich ungeklärt. So zeigten Studien widersprüchliche Ergebnisse für den prognostischen Wert von KRAS-Mutationen (Andreyev et al. 2001; Andreyev et al. 1998; Ince et al. 2005), zur prognostischen Relevanz von p53

(Munro et al. 2005) sowie der sogenannten Loss-of-Heterozygosity von Chromosom 18q (Popat et al. 2005; Popat et al. 2007). In zahlreichen Studien konnte eine signifikante Korrelation des krankheitsfreien Überlebens bzw. des Gesamtüberlebens mit einer erhöhten Expression der Thymidilatsynthase, einem der am besten evaluierten prognostischen Marker für 5-FU. Jedoch ist im Hinblick auf die Heterogenität der vorliegenden Studien und dem damit verbundenen Bias eine Übertragung der Ergebnisse in die klinische Situation nur eingeschränkt möglich (Popat et al. 2004). Zudem konnten aktuellere retrospektive Analysen keine prognostischen Wertigkeit von TYMS beim KRK herausarbeiten (Koopman et al. 2009). Andere Ansätze haben versucht, durch Kombination verschiedener molekularer Marker bei Patienten mit einem Kolonkarzinom im UICC Stadium III und bei Patienten im UICC Stadium II mit einem erhöhten Rezidivrisiko ("High Risk") die Prognose durch Indikatoren eines fortgeschrittenen Tumorstadiums, einer aggressiven Tumorbiologie, einer gesteigerten Proliferation, einer gesteigerten Migration und Invasivität und aus Indikatoren einer verminderten Apoptose abzuschätzen (Watanabe et al. 2001). Jedoch steht auch hier die Validierung für den klinischen Gebrauch aus.

Unter der Plethora analysierter molekularbiologischer prognostischer Marker wurde bisher lediglich die Bestimmung des CEA-Serumspiegels in die Klinik übertragen, die nach Empfehlungen des American Joint Committee aus dem Jahr 2000, das etablierte, auf den TNM Kategorien basierende, Stadieneinteilungssystem für das kolorektale Karzinom ergänzen soll (Compton et al. 2000; Compton et al. 2000; Hermanek et al. 1997). Als Beispiel für einen prädiktiven Marker mit klinischem Einsatz ist die Bestimmung des Mutationsstatus des KRAS-Gens im Tumorgewebe zur Abklärung des Ansprechens einer Antikörper basierten EGFR-Rezeptorblockade hervorzuheben.

In der Zusammenfassung stellt weiterhin die TNM-Klassifikation die Basis zur Abschätzung der Prognose und zur Therapieplanung des KRK dar, molekulare Marker spielen noch eine untergeordnete Rolle. Unter den zahlreichen Markern mit potentiell prädiktivem und prognostischem Wert gibt es jedoch vielversprechende Ansätze, die die Identifikation von Risikogruppen innerhalb der UICC-Stadien als auch unabhängig von den etablierten Klassifikationen in Zukunft erlauben könnten. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Kenntnis, Untersuchung und Nutzung der molekularen Veränderungen eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis

der Karzinogenese und damit für die Entwicklung neuer diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Ansätze für die Behandlung des KRK darstellen.

3.1.3 Molekulare Pathogenese

Die sequenzielle Entwicklung vom normalen Epithel über den adenomatösen Polypen und das Adenom mit intraepithelialer Neoplasie (Dysplasie) bis zum invasiven kolorektalen Karzinom wurde erstmals 1951 von Jackmann et al. beschrieben und galt lange Zeit als das Progressions-Modell für die Mehrheit der KRK (Jackman et al. 1951). Analog konnte auf molekularer Ebene gezeigt werden, dass Adenome über eine Inaktivierung des APC-Gens initiiert und die Tumorprogression durch linear sequenzielle molekulare Alterationen vorangetrieben werden (Vogelstein et al. 1988). Dieser später als sogenannter Gatekeeper Pathway beschriebene Mechanismus umfasst Gene mit Zellzyklus regulierender Funktion, auch sogenannte Protoonko- und Tumorsuppressorgene (Kinzler et al. 1997; Lengauer et al. 1998). Durch Mutation von Protoonkogenen entstehen Onkogene, die eine abnorm gesteigerte Zellproliferation und das autonome Wachstum der Zelle induzieren. Da dieser Effekt bereits durch Mutation eines der beiden Allele eintritt, handelt es sich um einen dominanten Wirkungsmechanismus. Typischerweise zeigen die sporadischen Karzinome des Gatekeeper Pathways Allelverluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 und 17 und auf dem langen Arm von Chromosom 5, 18 und 22, die mit den genannten Genmutationen assoziiert sind. Aufgrund dieser chromosomalen Instabilität (CIN) werden die genetischen Alterationen auch als CIN-Phänotyp zusammengefasst. Eines der bekanntesten Onkogene ist KRAS. Genprodukte von Tumorsuppressorgenen schützen die Zelle vor maligner Entartung, indem sie in genetisch veränderten Zellen die Apoptose einleiten und somit negativ regulierend auf die Zellproliferation wirken. Zum Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen kommt es erst durch die Mutation bzw. Verlust beider Allele, weshalb auch von einem rezessiven Wirkungsmechanismus gesprochen wird. Die für die Genese des Kolonkarzinoms wichtigsten Tumorsuppressorgene sind das p53, das DCC, das MCC und das APC-Gen. Kommt es also beim einem Gatekeeper zur Akkumulation von Mutationen nach dem Modell von Vogelstein (Kinzler et al. 1997) oder zu einer Änderung epigenetischer Regulationsmechanismen der Expression (z. B. durch DNA-Methylierung) (Jubb et al. 2001), hat dies einen Ausfall der Proliferationskontrolle und somit eine klonale Expansion von Zellen als

Ausgangspunkt der malignen Transformation zur Folge. Dabei ist die Mutation des Tumorsuppressorgens APC, welches über Vermittlung des proteosomalen Abbaus von β -Catenin maßgeblich dessen intrazelluläre Konzentration reguliert (Munemitsu et al. 1995), ein Schlüsselereignis des Gatekeeper Pathway (Bodmer et al. 1987; Groden et al. 1991). Dieser Pathway wird bei ungefähr 85 - 90 % der sporadischen kolorektalen Karzinome besprochen und ist bei den hereditären KRK für die autosomal-dominant vererbte familiäre adenomatöse Polyposis Coli (FAP), bei der eine Keimbahnmutation des APC-Gens zugrunde liegt, verantwortlich. Im Jahre 2002 wurde eine weitere hereditäre Polyposis-Form beschrieben, die dem CIN-Phänotyp zugeordnet wird. Dabei handelt es sich um die autosomal-rezessiv vererbte MUTYH-assoziierte Polyposis mit einer Mutation des MUTYH-Gens auf Chromosom 1, welche in die DNA-Reparatur involviert ist (de Miranda et al. 2009). Neben dem APC-Gen, welches bei 35 - 80 % aller sporadischen Karzinome und bei 29 - 63 % der sporadischen Adenome mutiert ist, sind zahlreiche weitere Tumorsuppressorgene (u.a. MCC, DCC, DPC4 und p53) und Protoonkogene (u.a. KRAS, MYC und HER2/neu) über diverse Signalwege in die Genese des kolorektalen Karzinoms involviert. Beispielsweise werden Mutationen des KRAS-Gens in etwa 10 % der Adenome kleiner als 1 cm, in 40 - 58 % der Adenome größer als 1 cm und in 47 - 60 % der KRK beschrieben (Vogelstein et al. 1988).

Neben dem Gatekeeper Pathway entstehen etwa 10 - 15 % aller sporadischen KRK über einen alternativen Mechanismus, den sogenannten Caretaker Pathway, bei dem es mutationsbedingt zu Funktionsstörungen von DNA-Reparaturenzymen (MMR) kommt, die während der Replikation entstandene Basenfehlpaarungen korrigieren (Kinzler et al. 1997). Die Mutationen in den MMR-Genen (hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, hMSH3, hMSH6) können spontan wie im Fall des sporadischen KRK auftreten oder autosomal dominant vererbt werden (HNPCC-Syndrom) (Lynch et al. 2003). Eine Inaktivierung der MMR-Gene führt zu einer Akkumulation von Mutationen in Protoonko- und Tumorsuppressorgenen, wodurch die betroffene Zelle einen malignen Phänotyp entwickelt. Neben den resultierenden Mutationen innerhalb kodierender Sequenzen kommt es charakteristischerweise auch zu Veränderungen in repetitiven Sequenzelementen nichttranskribierter Bereiche des Genoms, den sogenannten Mikrosatelliten, die etwa 10 % des humanen Genoms ausmachen. Die Alterationen zeigen sich in der DNA der Tumorzellen als Veränderung der Länge der repetitiven Sequenz im Vergleich zur

DNA aus gesundem Gewebe desselben Patienten. Diese Längendifferenz wird auch als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet. Dieses auch als MSI-Phänotyp bezeichnete Charakteristikum wird beim HNPCC-Syndrom in 80 - 90 % aber auch in 10 - 15 % der sporadischen kolorektalen Karzinome beschrieben (de la Chapelle et al. 2010; Liu et al. 1995).

Neben dem CIN- und MSI-Phänotyp wurde als dritter verantwortlicher Mechanismus für die Tumorprogression beim KRK die fehlerhafte DNA-Methylierung von Cytosin-Guanin(CpG)-reichen Promotor-Regionen bzw. -Inseln definierter Gene, unter anderem zahlreicher Tumorsuppressorgene, beschrieben. Durch die aberrante DNA-Methylierung der CpG-Inseln, die die Transkription vor allem von Reparaturgenen (z. B. hMLH1) regulieren, kommt es zum „Abschalten“ (Silencing) der Transkription der betroffenen Gene (Toyota et al. 1999), was im Fall von MMR-Genen zum Auftreten von MSI führt. Dieser Weg wird unter dem Begriff des CIMP-Pathway zusammengefasst (Kondo et al. 2004). Ähnlich wie bei der Mikrosatelliteninstabilität lassen sich ein CIMP-Phänotyp mit einer hohen (CIMP-H) und einer niedrigen Methylierung (CIMP-L) unterscheiden. Über die Rolle des CIMP für das KRK existiert eine kontroverse Diskussion. Während Toyota et al. die fehlerhafte Methylierung als alternatives und eigenständiges Progressionsmodell für das KRK beschrieben (Toyota et al. 1999), zeigen neuere Arbeiten eine Normalverteilung des CIMP über das KRK ohne Betonung bestimmter Subgruppen und stellen den CIMP als eigenständigen Signalweg in Frage (Hawkins et al. 2002; Yamashita et al. 2003).

Der serratierte Phänotyp mit Entwicklung des Adenokarzinoms aus einem serratiertem Polypen wurde als ein weiterer distinkter Subtyp des KRK erstmalig 2000 beschrieben (Yao et al. 2000) und ist mittlerweile ein akzeptierter alternativer Karzinogeneseweg zur Adenom-Karzinom-Sequenz (Makinen et al. 2001). Der serratierte Phänotyp kann bei 7,5 % aller KRK nachgewiesen werden (Makinen et al. 2007) und unterscheidet sich pathohistologisch und auch auf molekularer Ebene vom klassischen Adenom. Aufgrund morphologischer und molekulargenetischer Charakteristika werden nach Jass drei Typen des serratierten Phänotyps mit distinkten prognostischen und molekularen Charakteristika unterschieden, die zusammen mit dem CIN- und dem MSI-Phänotyp, mit nicht serratierten, klassischen Adenomen als Vorstufe, eine Klassifikation des KRK auf dem Boden klinischer, morphologischer und molekularer Kriterien mit fünf Subgruppen vorschlägt (Jass et al. 2007). Somit hat sich das lange bestehende Bild des kolorektalen Karzinoms als

eine morphologisch und molekular homogene Tumorentität im Laufe der letzten 20 Jahre deutlich gewandelt. Die Deutung und der Impact der neuen molekularen Erkenntnisse für die Diagnostik und Therapie des KRK sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

3.2. Genexpressionsanalyse - Gene Expression Profiling

Durch die moderne Molekularbiologie lassen sich globale als auch detaillierte molekulare Veränderungen im Rahmen der Tumorprogression darstellen, was ein besseres Verständnis der Karzinogenese und die Identifikation neuer molekularer Marker für Diagnose und Prognose und Therapie-Targets ermöglicht. Durch neue Erkenntnisse über die molekulare Heterogenität von Tumoren ergeben sich Ansätze zu alternativen Klassifikationen für Therapie und Prognose von Tumorerkrankungen, die die etablierten klinisch-pathologischen Parameter ergänzen oder in Zukunft auch ersetzen können. Die molekulare Analyse komplexer Signalwege ist darüber hinaus eine Voraussetzung für die Identifikation von potentiellen Angriffspunkten für die Tumorthherapie als auch für die Entwicklung neuer Medikamente im Hinblick auf die individualisierte Therapie von Tumorerkrankungen. In diesem Zusammenhang stellt die Genexpressionsanalyse mit Hilfe der Microarray-Technologie, die die simultane Untersuchung des Expressionsniveaus zehntausender Gene einer Tumorprobe in nur einem Experiment erlaubt, das sogenannte Gene Expression Profiling, einen innovativen und vielversprechenden Ansatz dar.

3.2.1. Microarray-Technologie

Ein Array ist eine Matrix, auf der Gensonden definierter Gene aufgebracht sind. Mit Entwicklung der sogenannten Genchip Arrays Mitte der neunziger Jahre war es mit dieser Untersuchungsplattform möglich, das Expressionsniveau hunderter Gene in Gewebeproben in Form von RNA-Transkripten simultan zu untersuchen. Durch Weiterentwicklung dieser Technologie ist es mittlerweile möglich, zehntausende Gensonden auf die Arrays aufzubringen, so dass durch die sogenannten Microarrays das genomweite Expressionsprofil von Zellen in einem Experiment simultan abgebildet werden kann und molekulare Gesichter bzw. Phänotypen mit phänotypischen Veränderungen korreliert werden können. Die annotierten Gensonden sind dabei je nach Microarray-Technologie auf einer festen Oberfläche

aus Kunststoff, Glas oder Silizium von ca. 2 cm² aufgebracht. Als Ausgangsmaterial können Zellen aus Blut, Gewebe, Knochenmark oder Zellkulturen eingesetzt werden, die frisch gewonnen, Kryo asserviert oder auch in Paraffin eingebettet wurden. Aus diesen Zellen wird zunächst die Gesamt-RNA extrahiert, die nach Umschreibung in cDNA und cRNA schließlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wird. Nach Vorbereitung der Transkripte erfolgte die Hybridisierung der markierten cDNA mit den annotierten Gensonden auf dem Microarray. Die Intensität der spezifischen Hybridisierung jeder annotierten Gensonde wird nach einem Waschvorgang, der nicht gebundene Transkripte entfernt, mit einem Scanner erfasst und als relatives Expressionsniveau jedes einzelnen Gens dokumentiert.

Die gegenwärtig am häufigsten eingesetzten Plattformen sind die cDNA-Arrays und hochdichte Oligonukleotid-Arrays. Beide Verfahren sind effektiv und unterscheiden sich insbesondere bezüglich ihres Designs, Herstellung und ihrer Messprinzipien. Während kurze Oligonukleotide (20 - 60 bp) für die Herstellung der Oligonukleotid-Arrays mit Hilfe photolithographischer Techniken direkt auf der Oberfläche des Arrays synthetisiert werden (Fodor et al. 1993), werden auf der Oberfläche von cDNA-Arrays lange cDNA-Fragmente (500 - 5 000 bp) Roboter gesteuert auf definierte Felder aufgebracht, die für jeweils ein Gen spezifisch sind (Duggan et al. 1999). Im Vergleich zu den cDNA-Arrays haben Oligonukleotidarrays den Vorteil, dass die kürzeren Sonden gezielt sequenzspezifisch aus dem Genom ausgewählt werden können und sich damit das Problem der Kreuzhybridisierung reduzieren lässt und die Hybridisierung auf Oligonukleotidarrays spezifischer ist (Golub et al. 1999). Oligonukleotidarrays werden mit nur einer Probe farbmarkierter cRNA hybridisiert (Farbstoff Biotin), so dass bei der Messung die Intensität des Fluoreszenzsignals der Stärke der Genexpression des jeweilige Gens entspricht (Lockhart et al. 1996). Bei cDNA-Arrays erfolgt die Hybridisierung der annotierten Gensonden mit einem Gemisch aus der zu analysierenden cRNA und einer Referenz-RNA, die mit jeweils einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff (Cy3 und Cy5) markiert werden. Die relative Genexpressionshöhe wird hierbei über den Quotienten der Fluoreszenz-intensitäten errechnet (Schena et al. 1995). Die Menge der hybridisierten cRNA ist bei beiden Methoden proportional zur Menge der Stärke der jeweiligen Genexpression in den zu untersuchenden Zellen. Mit beiden Methoden kann aber nur die relative Genexpression und keine absoluten Mengen oder gar die Kopienzahl bestimmt und miteinander verglichen werden.

3.2.2. Erwartungen & Anwendungsbereiche

Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001) und der Entwicklung der Microarray-Technologie war man davon überzeugt, dass die Ursachen von Tumorerkrankungen auf molekulargenetischer Ebene bald aufgeklärt sein würden. Der simultanen Analyse der genomweiten Genexpression von Tumoren wurde ein großes translationales Potential zugesprochen. Das Anwendungsspektrum reichte von der molekularen Diagnose und molekularen Klassifikation von Erkrankungen über die molekulare Stratifizierung in Bezug auf die Prognose, die Therapie-Response und Patientenselektion hin zur Entdeckung neuer Therapie-Targets (Target Discovery) (Wadlow et al. 2005). Auch wenn heute das Verständnis der molekularen Veränderungen bei Tumoren seit Einführung der großformatigen Analysetechniken gewachsen ist und bei einer Vielzahl von Anwendungen ein klinischer Nutzen ableitbar ist, kann der Stellenwert des Gene Expression Profiling für die Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen noch nicht abschließend bewertet werden.

Das KRK stellt aus mehreren Gründen ein interessantes Gebiet für die Mikroarray-Technologie dar. Zum einen zeigen Daten zur molekularen Karzinogenese, dass parallel zur klassischen pathohistologischen und molekularen Progression des KRK im Sinne der Adenom-Karzinom-Sequenz (Vogelstein et al. 1988) alternative molekulare Veränderungen vorliegen, die potenzielle Subtypen charakterisieren (siehe Abschnitt 3.1.3). Des Weiteren stoßen auf der einen Seite etablierte klinische und pathologische Klassifikationen bei der individuellen Vorhersage des klinischen Verlaufs und der Diskriminierung zwischen Patienten mit einem hohen und einem niedrigen Rezidivrisiko an ihre Grenzen. Auf der anderen Seite gibt es derzeit noch keine validierten molekularen Marker mit prognostischem Potenzial. Auch sind die Daten zu molekularen Marker für die Vorhersage der Therapie-Response auf zytotoxische und biologische Medikamente noch widersprüchlich (Spano et al. 2008). Die potenziellen Anwendungsgebiete für die Microarray-Technologie beim KRK lassen sich somit in Studien zur Karzinogenese, Studien zur Vorhersage der Therapie-Response und Studien zur Vorhersage der Prognose gliedern.

Vergleichende Genexpressionsanalysen zur Karzinogenese beim KRK haben die differenzielle Geneexpression zwischen normaler Schleimhaut, Adenomen und Karzinomen (Alon et al. 1999; Bertucci et al. 2004; Croner et al. 2005; Kitahara et al. 2001; Kwon et al. 2004; Lin et al. 2002; Notterman et al. 2001; Williams et al. 2003;

Zou et al. 2002), zwischen Primärtumor und Metastasen (Agrawal et al. 2002; Ki et al. 2007; Kleivi et al. 2007; Koehler et al. 2004; Li et al. 2004; Lin et al. 2007; Yanagawa et al. 2001) als auch zwischen Karzinomen unterschiedlicher Lokalisation untersucht (Croner et al. 2008; Frederiksen et al. 2003; Friederichs et al. 2005; Kwong et al. 2005). Aus den zahlreichen Studien der letzten zehn Jahre ist erkennbar, dass neben einigen Transkripten mit bislang unklarer Funktion die meisten Gene, die in die Karzinogenese involviert sind, der Zellproliferation, der Zellmigration und der Zelladhäsion zugeordnet werden können. Sie stellen damit eine Basis für die Entwicklung von neuen molekularen Markern und neuen Therapie Targets dar. Auch wenn eine Metaanalyse von Expressionsstudien beim KRK eine signifikante Überlappung der Datensätze bei der Unterscheidung zwischen Tumor- und Normalgewebe und zwischen Adenom und normaler Mukosa zeigen konnte (Chan et al. 2008), muss jedoch festgehalten werden, dass bislang kein Marker und auch keine Signatur für die klinische Anwendung daraus hervorgegangen ist.

Die Entwicklung der rein chirurgischen Therapie des kolorektalen Karzinoms zur multimodalen Therapie impliziert heutzutage die Anwendung zytotoxischer und zytostatischer Medikamente in der neoadjuvanten, adjuvanten und palliativen Situation. Die Response und die Nebenwirkungen sind individuell unterschiedlich, so dass im Hinblick auf den medizinischen Nutzen für den einzelnen Patienten und auch auf die entstehenden Kosten eine Vorhersage der Response von großem Nutzen wäre. Ein gutes Beispiel für die Übersetzung molekularer Erkenntnisse in den klinischen Alltag ist die Bestimmung des Status des Onkogens KRAS vor Einleitung einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen den EGFR. Die Bindung der Antikörper am Rezeptor blockiert die EGFR-Signale und hemmt so die nachgeschalteten intrazellulären Signale, die unter anderem für das Zellwachstum verantwortlich sind. Das KRAS-Gen ist an dieser Signalkette maßgeblich beteiligt. Sofern die nicht mutierte Variante (Wildtyp) vorliegt, kann diese Kette durch die Signalblockade ausgeschaltet werden. Mutationen im KRAS-Gen dagegen führen zu einem ständig angeschalteten KRAS-Protein, das Signale auch ohne vorhergehende EGFR-Signale weiterleitet. Die Anti-Tumor-Effekte, die durch die EGFR-Blockierung vermittelt werden, werden durch das mutierte KRAS wieder aufgehoben (Siddiqui et al. 2010). Microarray-Studien zur Response-Vorhersage auf FOLFIRI und Cetuximab beim fortgeschrittenen KRK (Del Rio et al. 2007; Khambata-Ford et al. 2007), aber auch zur Vorhersage des Ansprechens auf eine neoadjuvante Radiochemotherapie

beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (Ghadimi et al. 2005) sind trotz ausstehender Validierung der Daten vielversprechende Ansätze für eine klinische Anwendung.

Microarray-Studien zur Prognose untersuchen die differentielle Genexpression zwischen zwei vorgegebenen Gruppen mit unterschiedlichen klinischen Verläufen. Ziel der sogenannten supervidierten Analysen ist die Identifikation eines sogenannten Classifiers, mit dessen Hilfe eine Stratifizierung von Patienten nach der Höhe des Risikos für ein Rezidiv möglich ist. Dies ist insbesondere in den Bereichen der Tumorthherapie interessant, wo Patienten anhand etablierter klinisch-pathologischer Klassifikationen in prognostische Gruppen zusammengefasst werden, und trotz eines individuellen Risikoprofils und unterschiedlichen klinischen Verlaufs der gleichen Therapie zugeführt werden. Beispielsweise wird der Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie beim Kolonkarzinom im Stadium UICC II weiter kontrovers diskutiert und es gelang bislang nicht, einen Vorteil über alle Patienten in diesem Stadium nachzuweisen (Gill et al. 2004). Neben dem Versuch mit klinisch-pathologischen Parametern Risikogruppen zu definieren, die einer adjuvanten Chemotherapie zugeführt werden (Schmiegel et al. 2010), wurden mehrere Classifier zur Risikostratifizierung auf molekularer Ebene beschrieben (Barrier et al. 2006; Barrier et al. 2007; Cavalieri et al. 2007; D'Arrigo et al. 2005; Eschrich et al. 2005; Wang et al. 2004), wovon einer die Grundlage für die Entwicklung eines diagnostischen Test bildete (Salazar et al. 2010).

Neben dem kolorektalen Karzinom ist das Mammakarzinom ebenfalls ein führendes Beispiel für die translationale Forschung auf dem Gebiet des Gene Expression Profiling. Nach Etablierung und Validierung von prognostischen Gensignaturen zur Risikostratifizierung von Patientinnen mit einem Mammakarzinom im Frühstadium (UICC I und II) (van 't Veer et al. 2002) wurde basierend auf diesen Signaturgenen ein kommerzieller Test entwickelt (MammaPrint®) (Glas et al. 2006). Ziel der laufenden internationalen EORTC Phase III-Studie „MINDACT“ (Microarray for Node negative Disease may Avoid Chemo Therapy) ist die prospektive Validierung des Tests, um die klinische Relevanz und den Stellenwert im Verhältnis zu etablierten prognostischen Parametern zu evaluieren (Cardoso et al. 2007).

3.2.3. Grenzen & Herausforderungen

Trotz vielversprechender Ergebnisse ist die Microarray-Technologie noch nicht im klinischen Alltag angekommen. Dafür gibt es zahlreiche Gründe. Zum einen trägt das heterogene Studiendesign der einzelnen Arbeiten dazu bei, dass die Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar sind und nicht beziehungsweise nur teilweise überlappen. Die Anwendung unterschiedlicher Microarray-Plattformen, wie zum Beispiel cDNA-Arrays oder Oligonukleotid-Arrays, bedingen Unterschiede bei der RNA-Aufarbeitung, Hybridisierung, Prozessierung der Daten und deren Normalisierung. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass nach Standardisierung dieser Variablen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Labore verbessert werden konnte, lassen sich die vorhandenen Daten rückwirkend nur schwer miteinander vergleichen (Irizarry et al. 2005; Larkin et al. 2005; Bammler et al. 2005). Die Zusammensetzung und die Herkunft des analysierten Gewebes hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die Vergleichbarkeit der einzelnen Studienergebnisse. Häufig handelt es sich um Genexpressionsprofile aus heterogenen Gewebeproben, in denen neben den gewünschten Tumorzellen auch umgebende Zellen, wie zum Beispiel Bindegewebszellen das Tumor-Profil verzerren können. Andere Studien haben wiederum Techniken, wie zum Beispiel die Laser gestützte Mikrodisektion eingesetzt (Bonner et al. 1997), um in einem aufwändigen Verfahren die gewünschten Zellen anzureichern, ohne die Qualität der RNA signifikant zu beeinträchtigen (Ohyama et al. 2000). Ein weiterer entscheidender Faktor, der Einfluss auf den Vergleich der einzelnen Studien hat, ist die Qualität der RNA, die aus dem zu untersuchenden Gewebe gewonnen wird. Diese hängt maßgeblich von der Behandlung, der Asservierung (Ischämiezeit) und Konservierung des Gewebes ab (FFPE vs. -80 °C), da die RNA bekanntermaßen instabiler als die DNA ist (Huang et al. 2001; Paik et al. 2005; Specht et al. 2001).

Die beim Gene Expression Profiling gewonnenen riesigen Datenmengen stellen eine große Herausforderung für die Bioinformatik dar. Vor der eigentlichen Analyse müssen die Rohdaten vorbereitet werden (Preprocessing). Die Normalisierung stellt dabei einen entscheidenden Schritt dar, um die einzelnen Microarray-Experimente untereinander vergleichbar zu machen. Hierfür gibt es zahlreiche Methoden. Auch wenn erwartet wird, dass die Wahl der Methode für die für das Preprocessing die Kernaussagen der Microarray-Daten nicht beeinflusst, ist es doch wahrscheinlich, dass unterschiedliche Normalisierungsverfahren zu unterschiedlichen Ergebnissen

führen können (Bolstad et al. 2003). Das gleiche gilt für den Einfluss des eigentlichen Testverfahrens, welches nach Vorbereitung der Daten zur Überprüfung der Hypothese eingesetzt wird. Auch hier sind unterschiedliche Methoden beschrieben, die sich grundsätzlich in differenzielle Analysen (z. B. t-test, ANOVA), supervidierte Klassifikationsmethoden (Lineare diskriminierende Analyse), Dimensionsreduktionsmethoden (Hauptkomponentenanalyse / PCA) und nicht supervidierte Clusteranalyse (hierarchische Clusteranalyse, K-means Clusteranalyse) gliedern lassen und folglich die Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden nicht automatisch übertragen werden können.

Bei der genomweiten Chip basierten Genexpressionsanalyse tritt das Problem der hochdimensionalen Datensätze (bis zu 50 000 Transkripte auf einem Chip) bei einer in der Regel kleinen Zahl an Beobachtungen auf (Overfitting). In der Folge solcher Konstellationen besteht die Gefahr, dass sich für die supervidierte Analyse, also die Suche nach differentieller Expression zwischen vorgegebenen Gruppen, immer Signaturen finden lassen, die eine Diskriminierung möglich machen. Neben unterschiedlichen Plattformen und Probenzusammensetzungen der einzelnen Studien stellt das Overfitting daher ebenfalls ein bedeutendes Problem für die Vergleichbarkeit der Datensätze und Ergebnisse dar. Damit ein prädiktiver Classifier angewendet werden kann, muss er in der Lage sein, die Klassenzugehörigkeit neuer Proben, deren Zuordnung nicht bekannt ist, mit einer hohen Genauigkeit vorhersagen zu können (Class Prediction). Einer der am häufigsten dafür gebrauchten Ansätze ist die Teilung des Kollektivs in einen Trainingsdatensatz und in einem Testdatensatz. Der Classifier wird mit dem Trainingsdatensatz entwickelt beziehungsweise trainiert und anschließend am Testdatensatz, der nicht für das Training des Classifiers eingesetzt wurde, angewendet. Stimmt die vorhergesagte Klassenzugehörigkeit nicht mit der tatsächlichen Klassenzugehörigkeit überein, liegt ein Vorhersagefehler vor.

Bei kleinen Studien-Kollektiven und im Falle, dass kein unabhängiger Testdatensatz vorliegt, stellt das Kreuzvalidierungsverfahren (Cross Validation) einen alternativen Ansatz dar, um einen prädiktiven Classifier zu trainieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Misklassifikationsrate durch Vergrößerung des Trainingsdatensatzes prinzipiell verringert werden konnte (Michiels et al. 2005), so dass für eine effektive Cross Validation eine ausreichend großes Probenkollektiv notwendig ist. Nicht nur die Vergleichbarkeit, sondern auch Fehler bei der Anwendung von Trainings-

algorithmen für die Etablierung prädiktiver Classifier haben somit einen wesentlichen Einfluss auf die Vergleichbarkeit von Genexpressionsanalysen.

4. Ziele, Patientenkollektiv & Ergebnisse

4.1. Zielstellung

Ziel dieser prospektiven Studie war die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Veränderungen auf der Ebene der Genexpression und phänotypischen Merkmalen beim kolorektalen Karzinom durch die genomweite Analyse der Transkription, dem sog. Gene Expression Profiling. Zur Erstellung Tumorspezifischer Expressionsprofile ist Voraussetzung, dass die extrahierte RNA vornehmlich aus Tumorzellen stammt. Sämtliche intraoperativ gewonnenen und für die späteren Untersuchungen verwendeten Gewebeproben wurden daher durch den Einsatz der Laser gestützten Mikrodissektion aufbereitet, um die zu untersuchenden Zellen anzureichern.

4.1.1. Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Normal- und Tumorepithel

In einem ersten Schritt sollte die differentielle Genexpression zwischen gesundem Epithel und korrespondierendem Tumorepithel kolorektaler Karzinome untersucht werden und dabei den unterschiedlichen Regionen eines Karzinoms Rechnung getragen werden. Ziel war die Identifikation von einzelnen differentiell exprimierten Genen auf mRNA-Ebene, deren Validierung auf RNA- und Proteinebene und Bewertung in Bezug auf eine Funktion im Rahmen der Karzinogenese und eine potentielle Rolle als Zielgen für die Tumorthherapie. Hierbei war es wichtig, unterschiedliche Herangehensweisen zur Selektion von Genen, sogenannten Kandidatengenen für die weitere Validierung darzustellen.

4.1.2. Untersuchung des Zusammenhangs zwischen differentieller Genexpression und etablierten klinisch-pathologischen Prognose-Klassifikationen (TNM)

In einem zweiten Schritt der prospektiven Studie sollten in Bezug auf die Genexpression bioinformatisch zusammenhängende Gengruppen, sogenannte Gensignaturen, aus dem Tumorgewebe identifiziert werden, die mit etablierten klinisch-pathologischen Prognose-Klassifikationen korrelieren. Es sollte die Hypothese geprüft werden, ob der Tumorausbreitung (TNM-Klassifikation) zum

Zeitpunkt der Operation bzw. der Probenentnahme ein definiertes, reproduzierbares und damit Stadien-spezifisches molekulares Genexpressionsprofil zu Grunde liegt.

4.1.3. Etablierung von Genexpressionssignaturen zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs

Im letzten Schritt der Studie sollte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen Gensignaturen aus Tumorgewebe und individuellen Verlaufsdaten bzw. der Prognose hergestellt werden kann. Im Gegensatz zur Prognosevorhersage anhand der etablierten Klassifikationen (TNM), die Gruppen mit einer statistischen Überlebenswahrscheinlichkeit definiert, jedoch keine individuelle Prognoseabschätzung zulässt, sollte geprüft werden, ob anhand eines „molekularen Gesichts“ (Genexpressionssignatur) des untersuchten Resektates eine individuelle Prognosevorhersage möglich ist.

4.2. Patientenkollektiv

Für die Untersuchungen wurde das Gewebe aus Operationsresektaten von 156 Patienten mit einem histologisch gesicherten kolorektalen Adenokarzinom (G1-3), die im Zeitraum von 2001 bis 2004 in der Chirurgischen Klinik I elektiv radikal onkologisch operiert wurden und der Untersuchung schriftlich zugestimmt haben (Ethikvotum vom 08.01.2001; Ethikkommission des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der FU Berlin), verwendet. Der Anteil der Kolonkarzinome in dem Kollektiv betrug 53 % (82 / 156 Patienten) bei 74 Rektumkarzinomen. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Operation im Mittel 64 Jahre bei einer Streuung von 22 bis 87 Jahren, das Verhältnis Frauen zu Männern betrug 1,0 zu 1,16. Die Eingriffe umfassten die Hemikolektomie rechts, die erweiterte Hemikolektomie rechts, die Hemikolektomie links, die erweiterte Hemikolektomie links, die anteriore Rektumresektion und die Rektumexstirpation mit total mesorektaler Exzision. Eine adjuvante und palliative Therapie wurde im Rahmen der Vorstellung der Patienten in der interdisziplinären Tumorkonferenz am Standort empfohlen.

Die Nachsorge der Patienten erfolgte entsprechend der Vorgaben der S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom für einen postoperativen Zeitraum von fünf Jahren über die Chirurgische Poliklinik und über die weiterbehandelnden Haus- bzw. Fachärzte. Die Nachsorgedaten wurden über die Chirurgische Poliklinik und über die

weiterbehandelnden Kollegen erfasst. Das postoperative Tumorstadium verteilte sich über die UICC Stadium I - IV (26 x Stadium I, 48 x Stadium II, 58 x Stadium III und 24 x Stadium IV mit Lebermetastasen). Die Fünfjahresüberlebensrate über alle Stadien betrug 67 % (100 % im Stadium I, 83 % im Stadium II, 62 % im Stadium III und 8 % im Stadium IV). Das mediane Überleben im Stadium IV betrug 21 Monate (3 - 60 Monate).

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Normal- und Tumorepithel

Mit Hilfe der genomweiten Analyse der Genexpression in Epithelien aus kolorektalen Karzinomen und korrespondierendem Normalepithel mittels hochdichter GeneChips (Affymetrix U133 Set) konnten wir Gene mit einer signifikanten differentiellen Genexpression identifizieren (DEG). Die Mehrzahl der über 39 000 synchron analysierten Transkripte zeigte jedoch keinen Unterschied in der Expressionshöhe, also dem Aktivitätszustand des jeweils kodierenden Gens, zwischen Normal- und Tumorgewebe. Diese Beobachtung war unabhängig von dem Bereich des untersuchten Tumorgewebes (Invasionsfront oder zentraler Tumor). Diejenigen Gene, bei denen eine differentielle Expression detektiert werden konnte, wurden in Bezug auf das Ausmaß und die Richtung der differentiellen Expression (stärkere Expression im Tumor / stärkere Expression im Normalgewebe) bioinformatisch vergleichend bewertet und in einer Rangliste sortiert. Für die Auswahl von Genen, die im Rahmen einer Validierung weiter untersucht werden sollten, waren neben dem Ausmaß bzw. der Ausprägung des Expressionsunterschiedes (Ranglistenplatz) Information über die Funktion und die Assoziation mit Tumor relevanten Signalwegen ausschlaggebend. Die Transkripte von drei Membran-assoziierten Proteinen, LAPTM4b (Lysosome-associated protein transmembrane 4 beta), Robo1 (Roundabout homolog 1) und Claudin-1 zeigten im mikrodissezierten Tumorgewebe eine hoch signifikant stärkere Expression als im korrespondierenden Normalgewebe. Durch weitere Untersuchungen der LAPTM-Familie konnten wir zeigen, dass das LAPTM4b-Gen in einer Vielzahl von soliden Karzinomen, unter anderem beim Mamma-, Uterus-, Bronchial-, Ovarial- und Kolon- / Rektumkarzinom isoliert hoch-

reguliert ist, wohingegen bei weiteren Mitgliedern der LAPTM-Familie, LAPTM4a und LAPTM5 keine differentielle Expression nachgewiesen werden konnte (**Gröne I**).

Im Rahmen der Validierung der differentiellen Expression von Robo1 konnte auf RNA-Ebene mittels RTq-PCR gezeigt werden, dass neben dem Genprodukt von Robo1 auch das von Robo4 im Tumorgewebe stärker exprimiert ist als im Normalgewebe. Während Robo1 immunhistologisch im Zytoplasma der Tumorzellen angefärbt werden konnte und auf Proteinebene eine stärkere Expression im Tumorgewebe als im korrespondierenden Normalgewebe zeigte, konnte Robo4 mittels In-situ-Hybridisierung vornehmlich in den Endothelzellen der Tumorgefäße nachgewiesen werden (**Gröne II**).

Unsere Analyse des Expressionsmusters der Claudine in kolorektalem Tumorgewebe zeigte eine frequente differentielle Genexpression für Claudin-1, Claudin-8 und Claudin-12. Auf Proteinebene konnte mittels Immunhistochemie und Western Blot Analyse eine kräftige Expression von Claudin-1 im Tumorgewebe vs. Normalgewebe nachgewiesen werden, wohingegen die Proteinexpression von Claudin-8 und Claudin-12 im Western Blot keine signifikanten Änderungen zwischen Tumor- und Normalgewebe zeigte (**Gröne III**).

Wir haben uns die Frage gestellt, welchen Effekt die genetische Heterogenität des Tumors auf die Ergebnisse der genomweiten Genexpressionanalyse hat. Hierzu wurden die Tumorepithelien definierter Regionen, der Invasionsfront, welche direkt an das Normalgewebe angrenzt, und zentral gelegener, vitaler Tumorgebiete mittels Laser gestützter Mikrodissektion separat gewonnen und auf dem Genchip Arrays getrennt hybridisiert. Wir konnten dabei zeigen, dass in beiden Tumorkompartimenten, Invasionsfront und zentralem Tumor, zahlreiche Gene im Vergleich zwischen dem jeweiligen Tumor- und Normalgewebe differentiel exprimiert waren (1 128 und 1 528 differentiel exprimierte Gene). Es zeigte sich eine weit-reichende Überlappung der DEG beider Kompartimente (>80 %). Es konnte weder auf Einzelgenebene noch auf Gruppenebene eine signifikante differentielle Genexpression zwischen beiden Kompartimenten detektiert werden. Die bioinformatischen Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Genexpression zwischen beiden Kompartimenten eines Patienten waren größer als die Gemeinsamkeiten zwischen der Invasionsfront bzw. der zentralen Tumoranteile aller untersuchten

Patienten, was durch die hierarchische Clusteranalyse deutlich gemacht werden konnte (**Gröne IV**).

I

Grit Kasper, Anke Vogel, Irina Klamann, **Jörn Gröne**, Iver Petersen, Birgit Weber, Esmeralda Castanos-Velez, Eike Staub and Detlev Mennerich. The human LAPTM4b transcript is upregulated in various types of solid tumours and seems to play a dual functional role during tumour progression. Cancer Lett. 2005 Jun 16;224(1):93-103.

II

Jörn Gröne, Oliver Doebler, Christoph Loddenkemper, Birgit Hotz, Heinz-Johannes Buhr, Sarah Bhargava. Robo1/Robo4: Differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer. Oncol. Rep. 2006 Jun;15(6):1437-43.

III

J. Gröne, B. Weber, E. Staub, M. Heinze, I. Klamann, C. Pilarsky, K. Hermann, E. Castanos-Velez, S. Röppcke, B. Mann, A. Rosenthal, H. J. Buhr. Differential expression of genes encoding tight junction proteins in colorectal cancer: frequent dysregulation of claudin-1, -8 and -12. Int J Colorectal Dis. 2007 Jun;22(6):651-9.

IV

Eike Staub*, **Joern Groene***, Maya Heinze, Detlev Mennerich, Stefan Roepcke, Irina Klamann, Bernd Hinzmann, Esmeralda Castanos-Velez, Christian Pilarsky, Benno Mann, Thomas Brümmendorf, Birgit Weber, Heinz-Johannes Buhr, André Rosenthal. Genome-wide expression patterns of invasion front, inner tumor mass and surrounding normal epithelium of colorectal tumors. Mol Cancer. 2007 Dec 14;6:79.

* *Korrespondierende Autoren*

4.3.2 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen differentieller Genexpression und etablierten klinisch-pathologischen Prognose-Klassifikationen (TNM)

Beim Vergleich des Aktivitätszustandes der Gene zwischen Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe konnten wir im ersten Teil unserer Untersuchungen reproduzierbar nachweisen, dass eine Vielzahl von Genen auf RNA-Ebene differentiell exprimiert ist. Das Genexpressionsmuster aller untersuchten Gene im Tumorgewebe unterschied sich signifikant von dem des korrespondierenden Normalgewebes, vergleichbar mit einem „molekularen Gesicht“ des Phänotyps „Tumorgewebe“. Unter der Hypothese, dass der genomweite Aktivitätszustand der Gene nicht nur eine Unterscheidung zwischen Normal- und Tumorgewebe zulässt, sondern auch Rückschlüsse auf das Tumorverhalten und die Tumorausdehnung zum Zeitpunkt der Operation ermöglicht, führten wir eine Genexpressionsanalyse der Tumorgewebe unterschiedlicher klinisch-pathologischer Ausbreitungsstadien (UICC) durch. Ziel war es, eine Gensignatur zu identifizieren, die eine Diskriminierung zwischen phänotypisch und damit prognostisch unterschiedlichen Stadien erlaubt. Auf der Suche nach differentiell exprimierten Genen wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurden alle Gene mit in die Analyse einbezogen (genomweiter Ansatz). Zum anderen wurden nur zuvor definierte Gengruppen verwendet, um eine rationale Reduktion bzw. Filterung auf potentiell relevante Gene zu erzielen und damit die Analyse zu unterstützen (Ansatz Signalweg). Die insgesamt 12 Gengruppen wurden anhand ihrer Zugehörigkeit zu Signalwegen und funktionellen Gruppen ausgewählt, die mit der Progression des kolorektalen Karzinoms in der Literatur beschrieben wurden. In die Analyse wurden 18 Patienten mit einem auf die Darmwand begrenzten (UICC II) und 18 Patienten mit einem bereits nodal metastasierten kolorektalen Karzinom (UICC III) eingeschlossen. Über die Analyse der 12 Gengruppen konnte keine diskriminierende Signatur identifiziert werden. Durch den genomweiten Ansatz und Anwendung von drei Klassifikationsalgorithmen (shrunken centroids, support vector machines und penalized logistic regression) war es jedoch möglich, eine Signatur von 45 überlappenden Genen einzugrenzen, die eine korrekte Klassifizierung von Tumorproben in das Stadium UICC II oder UICC III in bis zu 80 % der Patientenproben zuließ. Zwei Gene, das GTP-bindende Protein GSPT2 und der Transkriptionsfaktor HOXA9, hatten dabei innerhalb der Signatur den größten

Einfluss auf die Trennung. Der Vergleich der Signatur mit externen publizierten Microarray-Daten zur Vorhersage von Lymphknotenmetastasen beim kolorektalen Karzinom (Croner et al. 2005) unterstrich die Gültigkeit unserer Daten, indem statistisch strukturelle Übereinstimmungen auf der Ebene der Ausrichtung der Genexpression (Fold Changes) gezeigt werden konnten (**Gröne V**). Somit konnten wir durch unsere bisherigen Untersuchungen zeigen, dass genomweite Veränderungen des Aktivitätszustandes von Genen (Genexpressionsprofile) mit morphologischen Charakteristika bzw. dem Phänotyp a) unterschiedlicher Gewebetypen (Normal- und Tumorgewebe) und b) gleicher Gewebetypen (Vergleich von Tumorgewebe unterschiedlicher Stadien untereinander) korrelieren.

V

J. Groene^{**}, U. Mansmann^{**}, R. Meister, E. Staub, S. Roepcke, M. Heinze, I. Klaman, T. Brümmendorf, K. Hermann, C. Loddenkemper, C. Pilarsky, B. Mann, H.P. Adams, H.J. Buhr, A. Rosenthal. Transcriptional census of 36 microdissected colorectal cancers yields a gene signature to distinguish UICC II and III. *Int J Cancer*. 2006 Oct 15;119(8):1829-36. Erratum in: *Int J Cancer*. 2007 Jul 15;121(2):466.

^{**} *Gemeinsame Erstautorenschaft*

4.3.3 Etablierung von Genexpressionssignaturen zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs

Durch die Klassifikation der Ausbreitung von Tumoren anhand klinischer und histopathologischer Parameter (TNM-Klassifikation) kann eine statistische Überlebenswahrscheinlichkeit, jedoch nicht der individuelle Verlauf als Grundlage einer individualisierten Tumorthherapie abgeleitet werden (Puppa et al. 2010). Entsprechende Bestrebungen, individuelle Krankheitsverläufe bei Tumorerkrankungen anhand von molekularen Veränderungen besser abschätzen zu können, haben zahlreiche vielversprechende Marker hervorgebracht, die jedoch überwiegend aufgrund der fehlenden Universalität der Befunde bislang nicht ihren Weg in die klinische Routine geschafft haben (Chan et al. 2008; Pritchard et al. 2010; Ross et al. 2010; Tejpar et al. 2010; Walther et al. 2009). Es erscheint auch unwahrscheinlich, dass die Aktivitätsänderung von nur einem Gen für den individuellen Krankheitsverlauf spezifisch ist. Nahe liegender ist vielmehr, dass sich die Vorhersage des individuellen Verlaufs auf charakteristische Genexpressionsprofile bzw. Genexpressionssignaturen, also Gruppen bioinformatisch zusammenhängender Gene, stützen wird.

Ziel der weiteren Untersuchungen war nun die Identifikation und Validierung einer Prognose-Signatur für das kolorektale Karzinom unter Nutzung eines erweiterten Datensatzes mit eigenen und öffentlich zugänglichen Daten (GEO Datenbank) mit 100 bzw. 59 Patienten unterschiedlicher Stadien kolorektaler Karzinome (Ayers et al. 2007; Kaiser et al. 2007). Basierend auf den Expressionsdaten beider externen Datensätze wurde in einem ersten Schritt eine Prognose-Signatur von 112 ko-exprimierten Genen entwickelt und validiert. Unter den Signatur-Genen fand sich eine Anreicherung bekannter transkriptioneller Zielgene von MYC, ESR1 und p53. Im zweiten Schritt erfolgte mit Hilfe des k-Nearest-Neighbor-Algorithmus die Klassifizierung eines eigenen gemischten Genexpressionsdatensatzes von 62 Patienten (29 Kolon & 33 Rektum; 13 x UICC I, 21 x UICC II, 23 x UICC III, 5 x UICC IV) anhand der zuvor etablierten Prognosesignatur in zwei Cluster. Patienten mit einer geringen Expression der Signatur (Cluster A; n=9) hatten dabei eine vergleichsweise günstigere Prognose als die 53 Patienten des Cluster B (p=0.011).

Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass eine geringe Expression der auf dem Boden von Genexpressionsdaten kolorektaler Karzinome generierten Prognose-

signatur auch bei öffentlich verfügbaren Genexpressionsdatensätzen anderer Tumorentitäten, wie dem Mammakarzinom (Wang et al. 2005) und dem Glioblastom (Phillips et al. 2006), mittels Cox Regression in prognostisch differente Gruppen signifikant trennt (**Gröne VI**).

VI

Staub E**, **Groene J****, Heinze M, Mennerich D, Roepcke S, Klamann I, Hinzmann B, Castanos-Velez E, Pilarsky C, Mann B, Brümmendorf T, Weber B, Buhr HJ, Rosenthal A. An expression module of WIPF1-coexpressed genes identifies patients with favorable prognosis in three tumor types. J Mol Med. 2009 Jun;87(6):633-44. Epub 2009 Apr 28.

***Gemeinsame Erstautorenschaft*

5. Diskussion

Trotz eines innerhalb der letzten 30 Jahre gestiegenen Verständnis der molekularen Veränderungen im Rahmen der Tumorgenese und Progression des kolorektalen Karzinoms und zahlreicher beschriebener molekularer Marker (Gryfe et al. 2009; Markowitz et al. 2009) hat sich das molekulare Wissen noch nicht nachhaltig auf die Therapie und Prognose ausgewirkt. Das kolorektale Karzinom ist mit einer Inzidenz von ca. 70 000 Patienten / Jahr und einer Mortalitätsrate von circa 30 000 Patienten pro Jahr weiterhin einer der häufigsten malignen Tumore in Deutschland. Unter leitliniengerechter, multimodaler Therapie mit onkologischer Resektion versterben heute immer noch bis zu 47 % aller Patienten tumorbedingt im Verlauf ihrer Erkrankung (Husmann et al. 2010). Bei derzeit prognostisch nahezu ausgereizten chirurgischen Therapiestrategien stellen daher die Identifikation und Validierung a) neuer molekularer Angriffspunkte für die medikamentöse Tumortherapie (Targets), b) neuer Marker für die individuelle Vorhersage der Verträglichkeit und des Ansprechens der medikamentösen Tumortherapie und c) neuer individueller Prognosemarker aktuelle Herausforderungen für die Tumorforschung dar. Mit der Entwicklung von Microarrays Mitte der 90er-Jahre wurde die Möglichkeit geschaffen, die Expression von anfänglich hunderten und zuletzt zehntausenden von Genen synchron zu analysieren und damit nahezu das gesamte Genom auf Genexpressionsebene analysieren zu können (Dangond et al. 2000; Mahadevappa et al. 1999). Durch Nutzung dieser Technologie, dem Gene Expression Profiling, konnten wir im Rahmen der Untersuchungen beim kolorektalen Karzinom einen Zusammenhang zwischen Veränderungen auf der Ebene der Genexpression und phänotypischen Merkmalen im Hinblick auf potentielle Marker für Therapie und Prognose und das Verständnis der Karzinogenese nachweisen.

5.1. Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Normal- und Tumorepithel

Durch Einsatz hochdichter Microarrays, welche mehr als 39 000 Transkripte abbilden, konnte bei bis zu 1 500 Transkripten eine differentielle Expression zwischen kolorektalem Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe detektiert werden. Unter den Transkripten mit einer stark ausgeprägten Aktivitätsänderung fanden sich neben zahlreichen bekannten Genen, die bereits im Zusammenhang mit der

Karzinogenese solider Tumore und im Speziellen der des kolorektalen Karzinoms beschrieben wurden, auch Gene ohne bislang beschriebenen onkologischen Bezug. Die weitere Bearbeitung und Interpretation der großen Datenmengen erforderte im ersten Schritt eine Sortierung und Wertung. Die Gene wurden heuristisch mittels drei verschiedener statistischer Tests (Wilcoxon-Test, Diskriminanzscore nach Golub (Golub et al. 1999) und Tumor-Normalgewebe-Quotient / Fold Change) nach dem Ausmaß und der Ausrichtung ihrer differentiellen Expression in einer Gesamtrangliste geordnet. Durch dieses Vorgehen wollten wir eine größtmögliche Wertung der differentiellen Expression auf bioinformatischer Ebene erzielen.

In einem zweiten Schritt erfolgte eine Zuordnung der in der Rangliste geordneten Gene zu publizierten funktionellen Gruppen im Sinne einer biologischen Plausibilitätsprüfung der Ergebnisse. Die funktionelle Annotation der im Tumor herunter regulierten Gene ergab eine im Vergleich zu den hochregulierten Genen geringere Anzahl an signifikant vertretenen Gengruppen. Darunter fanden sich u.a. Gruppen, die herunterregulierte Gene des Wnt/ β -Catenin Signalwegs umfassten. Eine solche Deregulation vergleichbarer Gene konnte im Tiermodell ebenfalls gezeigt werden (Sansom et al. 2004). Interessanterweise wird der Wnt/ β -Catenin Signalweg beim kolorektalen Karzinom jedoch häufig Mutations-bedingt als aktiviert beschrieben (Herbst et al. 2007). Diese unterschiedlichen Befunde werfen die Frage auf, ob für die kolorektale Karzinogenese eher eine Suppression als eine Verstärkung der Expression des Wnt/ β -Catenin Signalwegs eine entscheidende Rolle spielt.

Zahlreiche hochregulierte Gene konnten, wie bereits beschrieben, den Kategorien Proliferation und Tumorentstehung (maligne Transformation) zugeordnet werden (Whitfield et al. 2006). Interessanterweise fanden sich unter den hochregulierten Genen auch einige Gruppen mit Bezug zur „Degradation von Proteasomen“. Dieser Befund untermauert die Rolle von Proteasomen für die Tumorentstehung, welche bereits durch die 2003 publizierte Entwicklung des Proteasomen-Inhibitors Bortezomib gezeigt werden konnte (Paramore et al. 2003). Prognose assoziierte Gengruppen, wie z. B. eine viel diskutierte Gensignatur für das Mammakarzinom, die zahlreiche Gene aus Proliferations-Signaturen umfasst, waren ebenfalls unter den hochregulierten Genen frequent vertreten (van 't Veer et al. 2002; Whitfield et al. 2006). Die am stärksten vertretene Gengruppe unter den hochregulierten Genen beinhaltete das Tumor-Gen RAN mit seinen koexprimierten Genen (Su et al. 2004) (**Gröne IV**).

In einem dritten Schritt erfolgte der Abgleich der differentiell exprimierten Gene unserer Analysen mit publizierten Genexpressionsdatensätzen beim kolorektalen Karzinom (Birkenkamp-Demtroder et al. 2002; Chan et al. 2008; Kitahara et al. 2001; Lin et al. 2002; Notterman et al. 2001; Williams et al. 2003; Zhang et al. 1997). Dabei zeigte sich eine Übereinstimmung bei zahlreichen im Tumor hoch- und herunterregulierten Genen. Hervorzuheben war dabei die über einen Großteil der Studien konstante Suppression der Expression der Carbonic Anhydrase II (CA2). Die Carboanhydrasen sind Zink-Metalloenzyme und kommen beim Menschen in mehreren Isoformen vor. Ihre Aufgabe besteht vornehmlich in der reversiblen Katalyse der Hydratation von Kohlenstoffdioxid. CA2 kommt in nahezu allen Zelltypen des menschlichen Körpers vor und findet sich im Zytosol (Sly et al. 1995). In Übereinstimmung zu den konsistenten Befunden auf RNA-Ebene konnte in einer Studie gezeigt werden, dass unter allen immunhistochemisch untersuchten Carboanhydrasen auch CA2 eine geringere Expression im kolorektalen Tumorgewebe vs. korrespondierende gesunde Mukosa zeigte (Kivela et al. 2001). Die Expression der Carboanhydrasen 1 und 2 wurden im Zusammenhang mit Prognose und metastatischem Potential/Aggressivität beim kolorektalen Karzinom beschrieben (Bekku et al. 2000). Die prognostische Bedeutung konnte durch die Ergebnisse einer anderen Studie untermauert werden. Dort konnte gezeigt werden, dass der durchschnittliche Gehalt von CA2 im Stuhl von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom signifikant höher war als bei der gesunden Kontrollgruppe (Yokoyama et al. 1997).

Für die Selektion von Genen, die für die Identifikation potentieller Marker für die Therapie und Prognose im Rahmen unserer weiteren Untersuchungen in Frage kamen, wurden folgende Kriterien angelegt: a) Nachweis einer Hochregulation des Gens im Tumorgewebe in unseren Untersuchungen, b) Kenntnis der biologischen Funktion des Gens, c) Integration des Gens in Prozesse, die im Zusammenhang mit der Karzinogenese stehen oder denkbar sind und d) bislang fehlender Nachweis einer Assoziation des Gens mit dem kolorektalen Karzinom bzw. der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms. Die Transkripte von drei Membran-assoziierten Proteinen, LAPT4b, Robo1 und Claudin-1, zeigten im mikrodisszierten Tumorgewebe eine hoch signifikant stärkere Expression als im korrespondierenden Normalgewebe und fanden sich unter den hundert am stärksten differentiell

exprimierten Genen in unserer Rangliste. Publierte Daten zu allen drei Genen legten darüber hinaus einen Zusammenhang mit der Karzinogenese unterschiedlicher Tumorentitäten nahe. Für LAPT4b, ein Mitglied der LAPT-Familie, konnte eine Rolle für die Zellproliferation und Tumorgenese durch Regulation des Zellzyklus und der Signaltransduktion gezeigt werden (He et al. 2003; Shao et al. 2003), dem Slit/Robo Signalweg wurde eine Rolle in der Tumorgenese und Angiogenese zugeschrieben (Wang et al. 2003) und für Claudin-1 wurde eine Beteiligung am Wnt-Signalweg beschrieben werden (Dhawan et al. 2005; Miwa et al. 2001), dem eine zentrale Rolle bei verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsprozessen und bei der Karzinogenese zahlreicher Tumorentitäten zukommt (Kolligs et al. 2002; Polakis et al. 2007).

LAPT4b: Durch unsere Untersuchungen der LAPT-Familie konnten wir zeigen, dass das LAPT4b-Gen in einer Vielzahl von soliden Karzinomen, u.a. beim Mamma-, Uterus-, Bronchial-, Ovarial- und kolorektalen Karzinom isoliert hochreguliert ist, wohingegen bei weiteren Mitgliedern der LAPT-Familie, LAPT4a und LAPT5 keine differentielle Expression nachgewiesen werden konnte. Die besondere Tumor-spezifische Aktivierung von LAPT4b kann als Folge einer Promotoränderung interpretiert werden, z. B. als nachgeordnetes (downstream) Target eines Onkogens. Genauso aber kann sie als Zeichen einer essentiellen Funktion für das Wachstum und/oder das Überleben der Tumorzelle gewertet werden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten (NIH3T3 Zelllinie), die mit LAPT4b cDNA transfiziert wurden, höhere Proliferationsraten, ein verstärktes autarkes Wachstum und Veränderungen der Zellmorphologie aufwiesen (He et al. 2003). Damit in Übereinstimmung konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von LAPT4b auch in der humanen Leberzelllinie HLE ein verstärktes autarkes Wachstum begünstigt (Shao et al. 2003). Darüber hinaus konnte die Proliferation der Leberkarzinomzelllinie BEL-7402 durch Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden gegen LAPT4b gehemmt werden (Liu et al. 2000). In Zusammenschau der Ergebnisse konnten wir somit zeigen und bestätigen, dass LAPT4b neben der postulierten Rolle für die Zellproliferation und Tumorgenese (He et al. 2003; Shao et al. 2003), eine Rolle als Prognosemarker (Yang et al.; Yang et al.), als Therapietarget für das Hepatozelluläre Karzinom (Liu et al. 2009; Yang et al.) und für das Problem der Chemotherapieresistenz (Li et al. 2010), als intrazelluläres, membranassoziertes

Zielgen für die Entwicklung einer spezifischen Tumortherapie für solide Karzinome geeignet und relevant erschien (**Gröne I**).

Robo1: Im Rahmen der Validierung der differentiellen Expression von Robo1 und assoziierten Genen aus dem Slit/Robo Signalweg, der für die Neurogenese, Angiogenese, Myogenese, Leukozytenmigration und Tumorproliferation eine zum Teil bedeutende Rolle inne hat (Latil et al. 2003; Vargesson et al. 2001), konnte auf RNA-Ebene mittels RTq-PCR gezeigt werden, dass neben dem Genprodukt von Robo1 auch das von Robo4 im Tumorgewebe stärker exprimiert ist als im korrespondierenden Normalgewebe. Während Robo1 immunhistologisch im Zytoplasma der Tumorzellen angefärbt werden konnte und auf Proteinebene eine stärkere Expression im Tumorgewebe als im korrespondierenden Normalgewebe zeigte, konnte Robo4 mittels In-situ-Hybridisierung vornehmlich in den Endothelzellen der Tumorgefäße nachgewiesen werden. Dieser Befund der exklusiven Expression von Robo4 in Tumorendothelien steht im Einklang mit Daten zu Hirn-, Mamma-, Harnblasen-, Nieren- und Kolonkarzinomen (Huminiecki et al. 2002). Darüber hinaus konnte in vivo gezeigt werden, dass eine Blockade von Robo4 die Angiogenese hemmt bzw. die Koordination der Angiogenese stört (Bedell et al. 2005; Suchting et al. 2005). Ähnliche Befunde konnten zu Robo1 in vitro gezeigt werden. Durch Blockade des Robo1-Rezeptors kam es auch hier zu einer Abnahme der Dichte der Mikrogefäße und des Tumorumfanges (Wang et al. 2003). Diese funktionellen Daten gemeinsam mit unseren Ergebnissen einer erhöhten Aktivierung beider Rezeptoren in Tumorzellen und Tumorendothelien untermauern deren potentielle Rolle bei der Tumorgenese. Während wir beim kolorektalen Karzinom eine Hochregulation im Tumorgewebe und Tumorendothelien im Einklang mit der Literatur nachweisen konnten, konnte beim Prostatakarzinom eine im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe geringere Expression des Gens nachgewiesen gezeigt werden (Latil et al. 2003). Bei Robo1-Knockout-Mäusen konnte eine Hyperplasie des Bronchialgewebes nachgewiesen werden (Xian et al. 2001), was einen Zusammenhang zwischen Runterregulation bzw. Knockout von Robo1 und Tumorgenese auch beim Bronchialkarzinoms wahrscheinlich macht.

In Zusammenschau der Ergebnisse und der publizierten Daten konnten wir zeigen, dass Robo1 und Robo4 beim kolorektalen Karzinom ein spezifisches Expressionsmuster zeigen und als membranassoziierte Rezeptoren für die

Entwicklung einer spezifischen Tumorthherapie geeignet und relevant erschienen **(Grüne II)**.

Claudin-1: Unsere Analyse des Genexpressionsmusters der Claudine beim kolorektalen Karzinom zeigte eine frequente differentielle Expression für Claudin-1, Claudin-8 und Claudin-12, wohingegen beim Großteil der Claudine keine signifikante Aktivitätsänderung auf RNA-Ebene detektiert werden konnte. Der Familie der Claudine, die mittlerweile 24 Proteine umfasst, kommt eine entscheidende Aufgabe bei der Erstellung von Zell-Zell-Kontakten (Tight Junctions) zu. Die Dysregulation kodierender Gene für Proteine der Tight Junctions bei verschiedenen Tumorentitäten, die in zahlreichen Studien bestätigt werden konnte (Aung et al. 2006; de Oliveira et al. 2005; Heinzelmann-Schwarz et al. 2004; Michl et al. 2003; Michl et al. 2001; Nichols et al. 2004; Rangel et al. 2003), unterstreicht die herausragende Bedeutung von Zell-Zell-Kontakten für die Integrität der Zellen und Zellverbände im Rahmen der Karzinogenese. Interessanterweise zeigten sich zwischen den einzelnen Tumorentitäten auffällige Unterschiede im Expressionsmuster einiger Claudine u.a. in Bezug auf die Ausrichtung der Expression, so dass auch bei den Claudinen von tumorspezifischen Signaturen ausgegangen werden muss. Auch innerhalb der Tumorentitäten zeigten sich heterogene Befunde. Die Hochregulation von Claudin-1 auf RNA- und Proteinebene zeigte sich konsistent über die meisten Studien beim kolorektalen Karzinom, wohingegen die differentielle Expression der Gene für Claudin-2 bis Claudin-4 in unserer Arbeit nicht bestätigt werden konnte (Aung et al. 2006; de Oliveira et al. 2005; Dhawan et al. 2005; Miwa et al. 2001). Auf der anderen Seite konnten wir eine frequente Runterregulation des kodierenden Gens für Claudin-8 bei 90 % der untersuchten Patientenproben nachweisen, während Berichte über das Expressionsmuster von Claudin-8 bei soliden Karzinomen rar sind. Lediglich bei Mammakarzinom- und Pankreaskarzinomzelllinien konnte eine differentielle Expression von Claudin-8 nachgewiesen werden (Offner et al. 2005).

Um die potentielle Eignung von Claudin-1 als membranständige Zielstruktur für eine spezifische Tumorthherapie, wie z. B. den Einsatz von Antikörpern, abschätzen zu können, wurde die Verteilung der Expression über gesundes humanes Gewebe mittels Normalgewebe Tissue Arrays untersucht. Dabei zeigte sich eine Expression von Claudin-1 in zahlreichen Organgeweben, u.a. dem Herzmuskelgewebe. Auf der

einen Seite birgt die heterogene Verteilung der Expression das Risiko schwerer und diffuser Nebenwirkungen einer Antikörpertherapie, insbesondere vor dem Hintergrund der hohen Bedeutung von Claudin-1 für die Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere und somit für das Überleben von Säugetieren (Furuse et al. 2002). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise dafür, dass der Einsatz von Antikörpern auch bei Expression des Targets in gesundem Organgewebe denkbar ist (Offner et al. 2005) (**Größe III**).

Intratumoröse Genexpressionsunterschiede

Bei zahlreichen Tumorentitäten, wie z. B. dem Prostatakarzinom (Konishi et al. 1995), dem Mammakarzinom (Szollosi et al. 1995) und neben dem kolorektalen Karzinom (Baisse et al. 2001) auch weiteren gastrointestinalen Karzinomen (Nagel et al. 1995), konnte schon früh eine Heterogenität für genetische Abberation innerhalb von Tumoren gezeigt werden. Weitere Arbeiten unterstützen diese Beobachtung, dass unterschiedliche Regionen innerhalb eines Tumors auch unterschiedliche genetische Merkmale innehaben. Der Nachweis von Tumorzellnestern im Bereich der Invasionsfront kolorektaler Karzinome konnte mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden (Guzinska-Ustymowicz et al. 2005; Prall et al. 2005) und legt somit auch ein differentes genomische Profil dieser Tumorareale im Vergleich zum zentralen Tumor nahe. Ein weiterer Hinweis für Unterschiede in der Genexpression innerhalb desselben Tumors liefern Beobachtungen im Bereich der Tumorangiogenese. Durch Proliferation bedingte Hypoxie im zentralen Tumorgewebe kommt es zur Aktivierung der Angiogenese über Regulation der Transkription durch Hypoxie induzierte Faktoren und zur Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) (Lester et al. 2007; Liao et al. 2007). Hingegen gibt es Berichte, dass phänotypisch relevante Expressionsmuster, z. B. prognostische Genexpressionsprofile, eher durch den Großteil der Zellen von Primärtumoren als nur von ausgewählten Regionen definiert werden (Bertucci et al. 2004; Miller et al. 2007). Insgesamt fanden sich zum Zeitpunkt der durchgeführten Analysen nur wenige Daten über genomische Vergleiche zwischen Zellverbänden aus unterschiedlichen Regionen desselben Tumors. Noch spärlicher waren die Daten zu Unterschieden von Genexpressionsprofilen.

Wir hatten uns daher die Frage gestellt, welchen Effekt die genetische Heterogenität des Tumors auf die Ergebnisse der genomweiten Analyse der differentiellen

Genexpression beim kolorektalen Karzinom hat. Hierzu wurden die Tumorepithelien definierter Regionen, der Invasionsfront, welche direkt an das Normalgewebe angrenzt, und zentral gelegener, vitaler Tumorgebiete mittels Laser gestützter Mikrodisektion separat gewonnen und auf dem Genchip Array getrennt hybridisiert. Wir konnten zeigen, dass in beiden Tumorkompartimenten, Invasionsfront und zentralem Tumor, zahlreiche Gene im Vergleich zwischen dem jeweiligen Tumor- und Normalgewebe differentiell exprimiert waren (1 128 und 1 528 differentiell exprimierte Gene). Es zeigte sich eine weitreichende Überlappung der differentiell exprimierten Gene beider Kompartimente (>80 %). Es konnte weder auf Einzelgenebene noch auf Gruppenebene eine signifikante differentielle Genexpression zwischen beiden Kompartimenten detektiert werden. Die bioinformatischen Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Genexpression zwischen beiden Kompartimenten eines Patienten waren größer als die Gemeinsamkeiten zwischen der Invasionsfront bzw. der zentralen Tumoranteile aller untersuchten Patienten, was durch die hierarchische Clusteranalyse deutlich gemacht werden konnte (**Gröne IV**). Vergleichbare Arbeiten, die den Effekt der intratumorösen Heterogenität auf die Ergebnisse von Microarray basierten Genexpressionsanalysen bei zahlreichen anderen Tumorentitäten untersucht haben, konnten ebenso zeigen, dass der Einfluss der konsistent nachgewiesenen Heterogenität auf die Aussagen der Analysen in Bezug auf die differentielle Genexpression und die prognostische Wertigkeit vernachlässigbar war (Bachtiary et al. 2006; Barry et al. 2010; Francis et al. 2005; Jochumsen et al. 2007; Trautmann et al. 2005).

5.2. Untersuchung des Zusammenhangs zwischen differentieller Genexpression und etablierten klinisch-pathologischen Prognose-Klassifikationen (TNM)

Die Klassifikation von Tumoren stellt eine Voraussetzung für die Optimierung der Tumorthherapie dar. Neben der Differenzierung von Tumorentitäten wurde im Laufe der letzten Jahrzehnte die Unterscheidung von pathogenetischen Subgruppen etabliert und weiterentwickelt, um die Therapieeffizienz zu steigern, um die Nebenwirkungen der Therapie zu minimieren und somit die Therapie zu individualisieren. Die Klassifikation von Karzinomen erfolgt primär anhand des morphologischen Phänotyps des Resektates, wie z. B. der Infiltrationstiefe des

Primärtumors und dem metastatischen Befall von resezierten Lymphknoten (Sobin et al. 2010). Auf der einen Seite gelingt es mit Hilfe von Klassifikationen, Risikogruppen zu definieren und die Therapie zu adaptieren. Auf der anderen Seite ist dieser Ansatz limitiert, da sich innerhalb der morphologisch definierten Rahmen Patienten finden, die trotz gleicher Tumorausbreitung Unterschiede im klinischen Verlauf, der Prognose, als auch im Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie zeigen.

Großformatige Genexpressionsanalysen bieten die Möglichkeit eines systematischen, genomweiten Ansatzes, um Patienten-Subgruppen auf molekularer Ebene zu definieren. Golub et al. prägten bereits 1999 in diesem Zusammenhang die Begriffe der sogenannten Class Discovery, der Suche nach bislang unbekanntem Tumor-Subtypen, und der sogenannten Class Prediction, bei der Tumorproben anhand ihres Genexpressionsprofils einer bereits etablierten Tumor-Klassifikation zugeordnet werden. In dieser Studie war es erstmalig gelungen, anhand der Genexpressionsprofile von Leukämiezellen die akute lymphoblastische und akute myeloische Leukämie voneinander zu unterscheiden (Golub et al. 1999). Diese Unterscheidung war durch etablierte zytologische, histologische und immunzytologische Untersuchungstechniken natürlich vergleichsweise weniger aufwendig, schneller und vor allem kostengünstiger möglich. Dennoch hat diese Arbeit die Tür für die molekulare Klassifikation und Einschätzung der Prognose von Tumorerkrankungen durch Genexpressionssignaturen geöffnet.

Nachdem wir zunächst die differentielle Expression einzelner Gene zwischen Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe untersucht haben galt im folgenden Abschnitt unserer Analysen unsere Aufmerksamkeit der Korrelation zwischen phänotypischen Veränderungen von Tumoren und dem Expressionsmuster von Gengruppen, sogenannten Genexpressionssignaturen. Wir haben uns die Frage gestellt, ob sich hinter den etablierten pathologischen und Prognose relevanten Klassifikationen der Tumorausbreitung, der TNM-Klassifikation der UICC, stereotype Genexpressionsmuster identifizieren lassen können und sich somit ein Zusammenhang zwischen Tumorprogression und molekularen Veränderungen auf Genexpressionsebene darstellen ließ (Class Prediction). Wir konnten zeigen, dass sich das Stadium UICC II, bei dem keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden (N0), vom Stadium UICC III mit Metastasen in den entnommenen Lymphknoten (N1) mittels einer 45-Gen Signatur signifikant separieren lassen. Das bedeutet letztendlich, dass sich hinter den phänotypischen Veränderungen und der

Progression des kolorektalen Karzinoms von einem lokal begrenzten Tumorwachstum ohne Lymphknotenmetastasierung hin zu einer fortgeschrittenen Erkrankung uniforme Veränderungen auf Genexpressionsebene darstellen lassen. Vergleichbare Untersuchungen beim kolorektalen Karzinom stützen diese Beobachtung (Agrawal et al. 2002; Bertucci et al. 2004; Birkenkamp-Demtroder et al. 2002; Croner et al. 2008; Croner et al. 2005; Frederiksen et al. 2003; Friederichs et al. 2005; Habermann et al. 2007; Zou et al. 2002) und zeigen beim Vergleich der Signaturen untereinander zumindest eine strukturelle Übereinstimmung der Ausrichtung der differentiellen Expression, was im Sinne einer externen Validierung der eigenen Daten gewertet werden kann (Croner et al. 2005) **(Gröne V)**. Interessant ist dieser Zusammenhang insbesondere vor dem Hintergrund der Heterogenität der Genexpression innerhalb der Tumoren (Baisse et al. 2001). Wir konnten zeigen, dass vorgegebene Gengruppen und Signalwege von 43 bis 315 Genen mit einer zweifellosen Bedeutung für die Genese und Progression des kolorektalen Karzinoms, wie z. B. Wnt-, p53- und KRAS-Signalwege, innerhalb der Patienten einer prognostischen Gruppe (UICC II bzw. UICC III) unterschiedlich reguliert sind. Das heißt, dass wir innerhalb der analysierten Signalwege keinen homogenen Effekt darstellen konnten, der eine Diskriminierung des Stadium UICC II und UICC III erlaubte. Dieser Befund unterstreicht die Heterogenität der molekularen Veränderungen beim KRK.

Im Gegensatz zum sogenannten supervidierten Ansatz (Golub et al. 1999) konnten wir durch Analyse aller (>20 000) synchron untersuchten Gene, dem sogenannten nicht supervidierten Ansatz, eine aus 45 Genen bestehende diskriminierende Signatur identifizieren. Einige der Gene dieser Signatur, bei denen wir in UICC III Tumoren eine stärkere Expression nachweisen konnten, wurden bereits im Zusammenhang mit der Entstehung und der Progression des kolorektalen Karzinoms beschrieben, wie z. B. Amphiregulin (AREG) und Epiregulin (EREG) (Baba et al. 2000; Cook et al. 1992). Den stärksten biomathematischen Einfluss auf die diskriminatorische Power der Signatur konnte für den Transkriptionsfaktor HOXA9 und das regulatorische Zellzyklus-Gen GSPT2 gezeigt werden, welches bereits im Zusammenhang mit der Genese anderer gastrointestinaler Tumore beschrieben wurde (Brito et al. 2005; Jakobsen et al. 2001; Wallrapp et al. 1997). Eine Änderung der Genexpression von HOXA9 und anderen Mitgliedern der HOX-Familie wurde bei zahlreichen Tumorentitäten, wie dem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, dem

Bronchialkarzinoms und der Leukämie, beschrieben, wobei beides, die verstärkte Expression als auch der Verlust der Genexpression, mit der Karzinogenese assoziiert wurde (Abate-Shen et al. 2002; Abate-Shen et al. 2003; Ayton et al. 2003; Calvo et al. 2000; Chen et al. 2005).

Bei der Bewertung der eigenen Ergebnisse und der publizierten Daten muss das Problem der kleinen Gruppen bei hochdimensionalen Datensätzen berücksichtigt werden. Bei der genomweiten Chip basierten Genexpressionsanalyse tritt das Problem der großen Zahl an Parametern (bis zu 50 000 Transkripte auf einem Chip) bei einer in der Regel kleinen Zahl an Beobachtungen (Patientenproben) auf, da aus einer Vielzahl von Gründen (u.a. technischer und finanzieller Aufwand) die Anzahl der zu untersuchenden Proben immer deutlich geringer sein wird als die Anzahl der Parameter. In der Folge solcher Konstellationen besteht die Gefahr, dass sich für die supervidierte Analyse, also die Suche nach differentieller Expression zwischen vorgegebenen Gruppen (z. B. UICC II vs. UICC III), immer Signaturen finden lassen, die eine Diskriminierung möglich machen (Overfitting). Neben unterschiedlichen Plattformen und Probenzusammensetzungen der einzelnen Studien stellt das Overfitting daher ein weiteres bedeutendes Problem für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen dar. Auch in unserer Studie lagen die Zahl der Beobachtungen im zweistelligen und die der Parameter im fünfstelligen Bereich, was auf der einen Seite als Schwachpunkt bewertet werden muss. Auf der anderen Seite ist es statistisch gelungen mit Hilfe der internen Kreuzvalidierung die Aussagekraft der eigenen Ergebnisse zu stärken. Darüber hinaus konnte durch Einbeziehung externer Datensätze in Teilaspekten eine Konformität der Ergebnisse gezeigt werden, was diese Daten weiter stützt (**Gröne V**). Auch wenn die Ergebnisse großformatiger Genexpressionsanalysen auf dem Feld der Class Prediction im Detail auf Einzelgenebene nicht überlappen und heterogen erscheinen, macht die Summe an Untersuchungen auf der Ebene der Chromosomen, der Genexpression und der Proteinexpression einen Zusammenhang zwischen molekularen Veränderungen und klinisch-pathologischen Parametern, und somit der Progression des kolorektalen Karzinoms, evident und stellt damit eine Grundlage für die Entwicklung prognostischer Signaturen dar.

5.3. Etablierung von Genexpressionssignaturen zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs

Durch die Klassifikation der Ausbreitung von soliden Karzinomen anhand etablierter klinischer und histopathologischer Parameter (TNM-Klassifikation) kann eine statistische Überlebenswahrscheinlichkeit bzw. das mediane Risiko für das Auftreten eines Tumorrezidivs, jedoch nicht der individuelle Verlauf als Grundlage einer individualisierten Tumortherapie abgeleitet werden (Puppa et al. 2010). Entsprechende Bestrebungen, individuelle Krankheitsverläufe von Tumorerkrankungen anhand von molekularen Veränderungen besser abschätzen zu können, haben in der letzten Dekade mit Hilfe der Microarray-Technologie bei einer Vielzahl von Tumorentitäten sogenannte Prognosesignaturen hervorgebracht (Kim et al. 2010; Nannini et al. 2009; Subramanian et al. 2010; Timar et al. 2010; Yeh et al. 2009). Die gemeinsame Hypothese dieser Studien war, dass die Transkripte des Primärtumors Informationen über die Prognose enthalten. Das gemeinsame Ziel dieser Studien war, Veränderungen der Genexpression zu identifizieren, mit deren Hilfe es möglich war, I) Patienten mit einem hohen von Patienten mit einem niedrigen Rezidivrisiko unterscheiden zu können, II) eine Risikostratifizierung bezüglich des klinischen Verlaufs vornehmen zu können, und III) das metastatische Potential des Primärtumors einschätzen zu können. Diese Art von Studien arbeiten nach dem Prinzip der Class Prediction und verwenden dabei zum Training einer prognostischen Signatur, einem sogenannten Classifier, diejenigen Gene, die eine differentielle Expression zwischen definierten Gruppen, z. B. Patienten mit versus ohne Rezidiv, zeigen. Dieser supervidierte Ansatz ist im Gegensatz zur Analyse der differentiellen Genexpression zwischen Tumor- und Normalgewebe deutlich komplexer. Während beim Vergleich zwischen Karzinomzellen und korrespondierendem gesundem Epithel zwei makros- und mikroskopisch klar voneinander zu differenzierende Gewebetypen analysiert werden, werden bei der Etablierung von Prognosesignaturen Tumoren miteinander verglichen, die trotz eines unterschiedlichen postoperativen Verlaufs mitunter derselben klinisch-pathologischen Klassifikation bzw. demselben Tumorstadium zugeordnet werden. Der Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen besteht somit nicht in morphologisch fassbaren Kriterien, sondern in einem hypothetischen metastatischen bzw. malignen Potential des Primarius. Vor dem Hintergrund dieser Komplexität muss hervorgehoben werden, dass in den genannten Arbeiten Entitäten übergreifend übereinstimmend gezeigt werden konnte,

dass sich ein definiertes Ereignis, wie z. B. der postoperative Verlauf, über ein spezifisches Genexpressionsmuster innerhalb der jeweiligen Studie mit variierender Trennschärfe charakterisieren ließ. Ein Großteil dieser Signaturen hat jedoch überwiegend aufgrund der kleinen Kollektive und der ausstehenden Reproduzierbarkeit und externen Validierung bislang nicht seinen Weg in die klinische Routine geschafft und kommt derzeit nicht über den Status eines sogenannten Proof of Principle hinaus. Voraussetzung für eine Weiterentwicklung, also für einen klinisch anwendbaren diagnostischen Test, ist, dass der vorgeschlagene Classifier die Gruppen-zugehörigkeit (Patienten mit versus ohne Rezidiv) von neuen bzw. prospektiven Proben, deren klinischer Verlauf noch unbekannt ist, voraussagen kann.

Ziel unserer Arbeit war die Identifikation und Validierung einer Prognose-Signatur für das kolorektale Karzinom. Dabei haben wir den Ansatz verfolgt, dem „Problem der kleinen Zahlen“ mit einer Erweiterung des eigenen Datensatzes durch öffentlich verfügbare externe Datensätze zu begegnen. Basierend auf zwei publizierten kolorektalen Genexpressionsdatensätzen (Ayers et al. 2007; Kaiser et al. 2007) konnte in einem ersten Schritt eine Prognose-Signatur von 112 Genen entwickelt und intern validiert werden. Im zweiten Schritt erfolgte mit Hilfe des k-Nearest-Neighbor-Algorithmus im Sinne der externen Validierung die Klassifizierung eines eigenen kolorektalen Genexpressionsdatensatzes anhand des zuvor etablierten Classifiers in zwei Gruppen (Cluster). Patienten mit einer geringen Expression der Signatur (Cluster A) hatten dabei eine signifikant günstigere Prognose als Patienten des Cluster B. Somit war anhand unseres Classifiers eine Stadien unabhängige Stratifizierung von Patienten in unterschiedliche Risikogruppen möglich. Mit unserem Ansatz konnten wir zeigen, dass öffentlich gemachte Genexpressionsdatensätze in eigene Analysen erfolgreich integriert werden können (In Silico Validierung) und auf diesem Weg die Fallzahl signifikant erhöht werden kann. Das Ergebnis des ersten Teils unserer Analyse, dass komplexe Phänotypen, wie die individuelle Prognose, durch eine Signatur abgebildet werden können, bestätigt zahlreiche Publikationen zum Thema Gene Expression Profiling und Prognose beim KRK. Hier finden sich prinzipiell zwei Ansätze, mit denen das prognostische Potential von Microarrays analysiert wurde. In der ersten Gruppe lassen sich Arbeiten zusammenfassen, die Stadien übergreifend nach einer Prognosesignatur suchen. Bertucci et al. beschrieben bei 22 Patienten mit einem kolorektalen Karzinom mit und ohne

Metastasen eine Signatur von 194 diskriminierenden Genen, die eine signifikante Unterscheidung zwischen Patienten mit einem unterschiedlichen 5-Jahresüberleben ermöglichte (Bertucci et al. 2004). Eschrich et al. publizierten eine Signatur mit 43 Genen, die das 3-Jahres-Gesamtüberleben von Patienten mit einem KRK im Stadium UICC II und III mit einer Genauigkeit von 90 % voraussagen konnte (Eschrich et al. 2005). Cavalieri et al. konnten eine Assoziation zwischen der Prognose von Patienten mit einem KRK im Stadium UICC III und IV und einer 8-Gen-Signatur zeigen (Cavalieri et al. 2007). Weitere Arbeiten konnten einen Bezug zwischen dem metastatischen Potential des Primärtumors und molekularen Signaturen zeigen (D'Arrigo et al. 2005; Yamasaki et al. 2007). Die zweite Gruppe der Analysen fokussierte sich auf definierte UICC-Stadien auf der Suche nach prognostischen Subgruppen. Beim Kolonkarzinom im Stadium UICC III, in dem der Nutzen einer adjuvanten Therapie eindeutig belegt ist (Gill et al. 2004), wurden Classifier beschrieben, die mit 17 (Arango et al. 2005) und 30 Genen (Barrier et al. 2005) Patienten mit unterschiedlichem Rezidivrisiko signifikant diskriminieren konnten. Die bis heute geführte Kontroverse über die Indikation und den Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie bei Patienten mit einem Kolonkarzinom im Stadium UICC II bzw. Dukes B (Gill et al. 2004) führte auch hier zur Suche nach Risikofaktoren, um Patienten innerhalb dieser prognostischen Gruppe in Bezug auf ihr individuelles Risiko für ein postoperatives Rezidiv und eine potentielle adjuvante Therapie stratifizieren zu können. Durch Einsatz der Microarray-Technologie konnten Wang et al. 2004 bei 74 Primärtumoren im Stadium UICC II eine Prognosesignatur von 23 Genen identifizieren, die das Rezidiv mit einer Genauigkeit (Accuracy) von 78 % voraussagen konnte (Wang et al. 2004). Barrier et al. entwickelten zwei Prognosesignaturen anhand eines kleinen Kollektivs aus 18 Kolonkarzinomen im Stadium UICC II und III (Barrier et al. 2005). Der erste Classifier basierte auf der differentiellen Expression von 30 Genen im Tumorgewebe mit einer Genauigkeit der Diskriminierung von 78 %. Der zweite Classifier, bestehend aus 70 Genen, wurde an einem Genexpressionsdatensatz aus korrespondierenden gesunden Normalepithel trainiert und zeigte eine Genauigkeit von 83 %. Die Genauigkeit beider Signaturen konnten an einem prospektiven Kollektiv von Patienten mit einem Kolonkarzinom im Stadium UICC II durch die Autoren validiert werden (Barrier et al. 2006; Barrier et al. 2007). Das positive Ergebnis des Normalgewebe-Classifiers ist unerwartet und daher bemerkenswert. Es wirft auf der einen Seite die Frage auf, inwieweit das „molekulare

Gesicht“ des metastatischen Potentials von Tumorerkrankungen bereits in gesunden Epithelien erkennbar ist. Daten zum Tumor umgebenden Stromagewebe beim Mammakarzinom sprechen zumindest für einen Einfluss von nicht neoplastischen Zellen auf die Tumorprogression (Kim et al. 2005). Auf der anderen Seite steht ein solcher Befund vor dem Hintergrund der kleinen Fallzahl und der fehlenden externen Validierung bei kritischer Betrachtung für die Gefahr der Beliebigkeit der Ergebnisse und für eine Überreizung der statistischen Möglichkeiten. Das gleiche Problem muss auch im Hinblick auf die Gültigkeit der zuvor genannten Tumor-Signaturen berücksichtigt werden. Durch Integration eines dritten, eigenen Datensatzes konnten wir den zuvor im ersten Teil unserer Studie entwickelten Classifier anwenden und seine Gültigkeit an einem neuen Kollektiv im Sinne einer externen Validierung testen. Neben den eigenen Ergebnissen gibt es jedoch auch unter den zahlreichen Genexpressionsstudien beim kolorektalen Karzinom andere Beispiele für eine externe Validierung von Prognosesignaturen. Lin et al. haben zwei unabhängige Genexpressionsdatensätze kolorektaler Karzinome aus Neuseeland auf In-House Oligonukleotid-Arrays und aus Deutschland auf Affymetrix U133A Chips generiert. Mit Hilfe der klinischen Daten und der Expressionsdaten wurden unabhängig vom jeweils anderen Datensatz Classifier berechnet. Die Classifier aus Neuseeland bzw. Deutschland zeigten eine Vorhersage-Power von 77 % bzw. 84 %. Bemerkenswert hierbei war, dass die Vorhersage-Power nicht abfiel, nachdem die Classifier an dem jeweils anderen Datensatz angewandt wurden (Lin et al. 2007). Eine ebenfalls international angelegte Studie konnte die Robustheit ihres Classifiers für die Vorhersage der Prognose beim KRK durch Validierung an einem externen Datensatz eindrucksvoll belegen. Die 18 Gene des Classifiers bildeten die Grundlage für die Entwicklung eines diagnostischen Assays (Coloprint®). Der Test klassifizierte ca. zwei Drittel der Patienten mit einem KRK im Stadium UICC II als Patienten mit einem geringen Rezidiv-Risiko, von denen 91 % tatsächlich rezidivfrei blieben (Salazar et al. 2010). Mit der Etablierung solcher Assays ist ein großer Schritt „From bench to bedside“ im Bereich der klinischen Evaluierung des prognostischen Gene Expression Profiling getan und die Hypothese, dass die Transkripte des Primärtumors Informationen über die Prognose enthalten, wird damit untermauert. Inwieweit sich die Ergebnisse der Microarray-Technologie in Zukunft in die klinische Routine integrieren lassen und somit einen Beitrag zur individualisierten Tumorthherapie

leisten werden, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend beurteilt werden und muss in weiteren Validierungsstudien analysiert werden.

6. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist einer der häufigsten malignen Tumore weltweit mit einer weiterhin hohen Mortalitätsrate. Bei derzeit prognostisch nahezu ausgereizten chirurgischen Therapiestrategien stellen die Identifikation und Validierung a) neuer molekularer Angriffspunkte für die medikamentöse Tumorthherapie (Targets), b) neuer Marker für die individuelle Vorhersage der Verträglichkeit und des Ansprechens der medikamentösen Tumorthherapie und c) neuer individueller Prognosemarker, aktuelle Herausforderungen für die Tumorforschung dar. Ziel unserer Arbeiten war die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Veränderungen auf der Ebene der Genexpression und phänotypischen Merkmalen beim kolorektalen Karzinom durch die genomweite Microarray basierte Analyse der Transkription, dem sog. Gene Expression Profiling. In einem ersten Schritt konnten zahlreiche differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, deren Validierung auf RNA- und Proteinebene eine Bewertung in Bezug auf funktionelle Einordnung in die Karzinogenese und eine Evaluierung in Bezug auf eine potentielle Rolle als Zielgen für die Tumorthherapie ermöglichte. Wir konnten darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen Tumorprogression und molekularen Veränderungen auf Genexpressionsebene darstellen und anhand einer 45-Gen-Signatur zeigen, dass sich hinter den phänotypischen Veränderungen und der Progression des kolorektalen Karzinoms von einem lokal begrenzten Tumorwachstum ohne Lymphknotenmetastasierung hin zu einer fortgeschrittenen Erkrankung uniforme Veränderungen auf Genexpressionsebene abspielen. Interessant ist dieser Zusammenhang insbesondere vor dem Hintergrund der Heterogenität der Genexpression innerhalb der Tumoren, die wir im Rahmen der Analyse von Signalwegen belegen konnten.

Durch unsere Ergebnisse im Bereich der prognostischen Signaturen konnten wir die Hypothese unterfüttern, dass die Transkripte des Primärtumors Informationen über die Prognose enthalten, die über die Genexpressionsanalyse gelesen werden können. Die große Liste der identifizierten Gene im Rahmen der Genexpressionsanalysen stellt eine Quelle für potenzielle Therapie-Targets dar, da die meisten der Gene in Schlüsselmechanismen der Tumorentstehung und Tumorprogression, von der Zellproliferation und Zelldifferenzierung bis hin zum Überleben der Zelle, involviert sind. Das systematische Verständnis der molekularen Basis einer jeden Tumorentität erfordert letztendlich drei Schritte. Eine umfassende

Analyse charakteristischer genomischer Abberationen, die Interpretation der biologischen Rolle bei der Karzinogenese und die Evaluation der Einsetzbarkeit für die Entwicklung von Diagnostika, Prognoseparametern und Therapeutika. Daher ist eine umfassende Charakterisierung des Genoms und des Proteoms mithilfe neuer Technologien, wie GenChip Arrays, miRNA Arrays, Array-CGH und SNP Arrays notwendig, um neue Therapie-Targets zu identifizieren und die Möglichkeiten für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms zu erweitern. Im Gegensatz zur Prognosevorhersage anhand der etablierten Tumor-Klassifikationen, die Gruppen über pathomorphologische Befunde und Fünfjahresüberlebensraten definiert, jedoch keine individuelle Prognoseabschätzung zulässt, sollte geprüft werden, ob anhand eines „molekularen Gesichts“ der Erkrankung eine individuelle Prognosevorhersage ergänzend oder unabhängig möglich wird. Inwieweit sich die Ergebnisse der Microarray-Technologie in Zukunft in die klinische Routine für Diagnostik, Prognostik und Therapie integrieren lassen, und somit einen Beitrag zur individualisierten Tumorthherapie leisten, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend beurteilt werden und muss in weiteren Validierungsstudien analysiert werden.

7. Literatur

- Abate-Shen C. (2002). "Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence?" Nat Rev Cancer **2**(10): 777-85.
- Abate-Shen C. (2003). "Homeobox genes and cancer: new OCTaves for an old tune." Cancer Cell **4**(5): 329-30.
- Agrawal D, Chen T, et al. (2002). "Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling." J Natl Cancer Inst **94**(7): 513-21.
- Almendingen K, Hofstad B, et al. (2001). "Current diet and colorectal adenomas: a case-control study including different sets of traditionally chosen control groups." Eur J Cancer Prev **10**(5): 395-406.
- Alon U, Barkai N, et al. (1999). "Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6745-50.
- Andreoni B, Chiappa A, et al. (2007). "Surgical outcomes for colon and rectal cancer over a decade: results from a consecutive monocentric experience in 902 unselected patients." World J Surg Oncol **5**73.
- Andreyev HJ, Norman AR, et al. (2001). "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study." Br J Cancer **85**(5): 692-6.
- Andreyev HJ, Norman AR, et al. (1998). "Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study." J Natl Cancer Inst **90**(9): 675-84.
- Arango D, Laiho P, et al. (2005). "Gene-expression profiling predicts recurrence in Dukes' C colorectal cancer." Gastroenterology **129**(3): 874-84.
- Astler VB, Coller FA. (1954). "The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum." Ann Surg **139**(6): 846-52.
- Aung PP, Mitani Y, et al. (2006). "Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas." Virchows Arch **448**(4): 428-34.
- Ayers M, Fargnoli J, et al. (2007). "Discovery and validation of biomarkers that respond to treatment with brivanib alaninate, a small-molecule VEGFR-2/FGFR-1 antagonist." Cancer Res **67**(14): 6899-906.

- Ayton PM, Cleary ML. (2003). "Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9." Genes Dev **17**(18): 2298-307.
- Baba I, Shirasawa S, et al. (2000). "Involvement of deregulated epiregulin expression in tumorigenesis in vivo through activated Ki-Ras signaling pathway in human colon cancer cells." Cancer Res **60**(24): 6886-9.
- Bachtiary B, Boutros PC, et al. (2006). "Gene expression profiling in cervical cancer: an exploration of intratumor heterogeneity." Clin Cancer Res **12**(19): 5632-40.
- Baisse B, Bouzourene H, et al. (2001). "Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma." Int J Cancer **93**(3): 346-52.
- Bammler T, Beyer RP, et al. (2005). "Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms." Nat Methods **2**(5): 351-6.
- Barrier A, Boelle PY, et al. (2006). "Stage II colon cancer prognosis prediction by tumor gene expression profiling." J Clin Oncol **24**(29): 4685-91.
- Barrier A, Lemoine A, et al. (2005). "Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling." Oncogene **24**(40): 6155-64.
- Barrier A, Roser F, et al. (2007). "Prognosis of stage II colon cancer by non-neoplastic mucosa gene expression profiling." Oncogene **26**(18): 2642-8.
- Barry WT, Kernagis DN, et al. (2010). "Intratumor heterogeneity and precision of microarray-based predictors of breast cancer biology and clinical outcome." J Clin Oncol **28**(13): 2198-206.
- Bedell VM, Yeo SY, et al. (2005). "roundabout4 is essential for angiogenesis in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(18): 6373-8.
- Bekku S, Mochizuki H, et al. (2000). "Expression of carbonic anhydrase I or II and correlation to clinical aspects of colorectal cancer." Hepatogastroenterology **47**(34): 998-1001.
- Bertucci F, Salas S, et al. (2004). "Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters." Oncogene **23**(7): 1377-91.
- Birkenkamp-Demtroder K, Christensen LL, et al. (2002). "Gene expression in colorectal cancer." Cancer Res **62**(15): 4352-63.
- Bodmer WF, Bailey CJ, et al. (1987). "Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5." Nature **328**(6131): 614-6.

- Bolstad BM, Irizarry RA, et al. (2003). "A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias." Bioinformatics **19**(2): 185-93.
- Bonner RF, Emmert-Buck M, et al. (1997). "Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue." Science **278**(5342): 1481,3.
- Brito M, Malta-Vacas J, et al. (2005). "Polyglycine expansions in eRF3/GSPT1 are associated with gastric cancer susceptibility." Carcinogenesis **26**(12): 2046-9.
- Calvo R, West J, et al. (2000). "Altered HOX and WNT7A expression in human lung cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12776-81.
- Cardoso F, Piccart-Gebhart M, et al. (2007). "The MINDACT trial: the first prospective clinical validation of a genomic tool." Mol Oncol **1**(3): 246-51.
- Cavalieri D, Dolara P, et al. (2007). "Analysis of gene expression profiles reveals novel correlations with the clinical course of colorectal cancer." Oncol Res **16**(11): 535-48.
- Chan SK, Griffith OL, et al. (2008). "Meta-analysis of colorectal cancer gene expression profiling studies identifies consistently reported candidate biomarkers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **17**(3): 543-52.
- Chen KN, Gu ZD, et al. (2005). "Expression of 11 HOX genes is deregulated in esophageal squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **11**(3): 1044-9.
- Coates RJ, Greenberg RS, et al. (1995). "Anatomic site distribution of colon cancer by race and other colon cancer risk factors." Dis Colon Rectum **38**(1): 42-50.
- Compton C, Fenoglio-Preiser CM, et al. (2000). "American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group." Cancer **88**(7): 1739-57.
- Compton CC. (2003). "Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features." Mod Pathol **16**(4): 376-88.
- Compton CC, Fielding LP, et al. (2000). "Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999." Arch Pathol Lab Med **124**(7): 979-94.
- Cook PW, Pittelkow MR, et al. (1992). "Amphiregulin messenger RNA is elevated in psoriatic epidermis and gastrointestinal carcinomas." Cancer Res **52**(11): 3224-7.

- Croner RS, Foertsch T, et al. (2005). "Common denominator genes that distinguish colorectal carcinoma from normal mucosa." Int J Colorectal Dis **20**(4): 353-62.
- Croner RS, Fortsch T, et al. (2008). "Molecular signature for lymphatic metastasis in colorectal carcinomas." Ann Surg **247**(5): 803-10.
- Croner RS, Peters A, et al. (2005). "Microarray versus conventional prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma." Cancer **104**(2): 395-404.
- Dangond F. (2000). "Chips around the world: proceedings from the Nature Genetics microarray meeting." Physiol Genomics **2**(2): 53-8.
- D'Arrigo A, Belluco C, et al. (2005). "Metastatic transcriptional pattern revealed by gene expression profiling in primary colorectal carcinoma." Int J Cancer **115**(2): 256-62.
- de la Chapelle A, Hampel H. (2010). "Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer." J Clin Oncol **28**(20): 3380-7.
- de Miranda NF, Nielsen M, et al. (2009). "MUTYH-associated polyposis carcinomas frequently lose HLA class I expression - a common event amongst DNA-repair-deficient colorectal cancers." J Pathol **219**(1): 69-76.
- de Oliveira SS, de Oliveira IM, et al. (2005). "Claudins upregulation in human colorectal cancer." FEBS Lett **579**(27): 6179-85.
- Del Rio M, Molina F, et al. (2007). "Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan." J Clin Oncol **25**(7): 773-80.
- Denoix PF, Schwartz D. (1959). "[General rules for classification of cancers and presentation of the therapeutic results]." Mem Acad Chir (Paris) **85**(15-16): 415-24.
- Dhawan P, Singh AB, et al. (2005). "Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer." J Clin Invest **115**(7): 1765-76.
- Duggan DJ, Bittner M, et al. (1999). "Expression profiling using cDNA microarrays." Nat Genet **21**(1 Suppl): 10-4.
- Dukes CE. (1932). "The classification of cancer of the rectum." J Path Bact **85**:323-32.
- Eaden JA, Abrams KR, et al. (2001). "The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis." Gut **48**(4): 526-35.
- Eschrich S, Yang I, et al. (2005). "Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients." J Clin Oncol **23**(15): 3526-35.

- Fielding LP, Arsenault PA, et al. (1991). "Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT)." J Gastroenterol Hepatol **6**(4): 325-44.
- Fisher B, Wolmark N, et al. (1988). "Postoperative adjuvant chemotherapy or radiation therapy for rectal cancer: results from NSABP protocol R-01." J Natl Cancer Inst **80**(1): 21-9.
- Fodor SP, Rava RP, et al. (1993). "Multiplexed biochemical assays with biological chips." Nature **364**(6437): 555-6.
- Francis P, Fernebro J, et al. (2005). "Intratumor versus intertumor heterogeneity in gene expression profiles of soft-tissue sarcomas." Genes Chromosomes Cancer **43**(3): 302-8.
- Frederiksen CM, Knudsen S, et al. (2003). "Classification of Dukes' B and C colorectal cancers using expression arrays." J Cancer Res Clin Oncol **129**(5): 263-71.
- Friederichs J, Rosenberg R, et al. (2005). "Gene expression profiles of different clinical stages of colorectal carcinoma: toward a molecular genetic understanding of tumor progression." Int J Colorectal Dis **20**(5): 391-402.
- Fuchs CS, Giovannucci EL, et al. (1994). "A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer." N Engl J Med **331**(25): 1669-74.
- Furuse M, Hata M, et al. (2002). "Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice." J Cell Biol **156**(6): 1099-111.
- Ghadimi BM, Grade M, et al. (2005). "Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy." J Clin Oncol **23**(9): 1826-38.
- Gibbons DC, Sinha A, et al. (2010). "Colorectal cancer: no longer the issue in familial adenomatous polyposis?" Fam Cancer.
- Gill S, Loprinzi CL, et al. (2004). "Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much?" J Clin Oncol **22**(10): 1797-806.
- Glas AM, Floore A, et al. (2006). "Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test." BMC Genomics **7**278.

- Goligher J. Studies of lymphatic dissemination of colorectal carcinoma. In: Surgery of the Anus, Rectum and Colon. London: Bailliere Tindall; 1984.
- Golub TR, Slonim DK, et al. (1999). "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring." Science **286**(5439): 531-7.
- Groden J, Thliveris A, et al. (1991). "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." Cell **66**(3): 589-600.
- Gryfe R. (2009). "Overview of colorectal cancer genetics." Surg Oncol Clin N Am **18**(4): 573-83.
- Guzinska-Ustymowicz K. (2005). "The role of tumour budding at the front of invasion and recurrence of rectal carcinoma." Anticancer Res **25**(2B): 1269-72.
- Habermann JK, Paulsen U, et al. (2007). "Stage-specific alterations of the genome, transcriptome, and proteome during colorectal carcinogenesis." Genes Chromosomes Cancer **46**(1): 10-26.
- Hagggar FA, Boushey RP. (2009). "Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors." Clin Colon Rectal Surg **22**(4): 191-7.
- Hamilton SR, Aaltonen LA. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, eds. WHO Classification of Tumours. Lyon: IARC Press; 2000.
- Hawkins N, Norrie M, et al. (2002). "CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability." Gastroenterology **122**(5): 1376-87.
- He J, Shao G, et al. (2003). "[Effects of the novel gene, LAPTM4B, highly expression in hepatocellular carcinoma on cell proliferation and tumorigenesis of NIH3T3 cells]." Beijing Da Xue Xue Bao **35**(4): 348-52.
- Heald RJ, Husband EM, et al. (1982a). "The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence?" Br J Surg **69**(10): 613-6.
- Heald RJ, Ryall R. (1982b). "Recurrent cancer after restorative resection of the rectum." Br Med J (Clin Res Ed) **284**(6318): 826-7.
- Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, et al. (2004). "Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer." Clin Cancer Res **10**(13): 4427-36.
- Herbst A, Kolligs FT. (2007). "Wnt signaling as a therapeutic target for cancer." Methods Mol Biol **361**: 63-91.

- Hermanek P. (1997). "[Prognostic factors in colorectal carcinoma]." Zentralbl Chir **122** **Suppl**20-5.
- Huang J, Qi R, et al. (2001). "Effects of ischemia on gene expression." J Surg Res **99**(2): 222-7.
- Huminiecki L, Gorn M, et al. (2002). "Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis." Genomics **79**(4): 547-52.
- Husmann G, Kaatsch P, et al. (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends. Berlin: Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.
- Ince WL, Jubb AM, et al. (2005). "Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab." J Natl Cancer Inst **97**(13): 981-9.
- Irizarry RA, Warren D, et al. (2005). "Multiple-laboratory comparison of microarray platforms." Nat Methods **2**(5): 345-50.
- Jackman RJ, Mayo CW. (1951). "The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon." Surg Gynecol Obstet **93**(3): 327-30.
- Jakobsen CG, Seggaard TM, et al. (2001). "[Identification of a novel termination release factor eRF3b expressing the eRF3 activity in vitro and in vivo]." Mol Biol (Mosk) **35**(4): 672-81.
- Jass JR. (2007). "Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features." Histopathology **50**(1): 113-30.
- Jochumsen KM, Tan Q, et al. (2007). "Gene expression in epithelial ovarian cancer: a study of intratumor heterogeneity." Int J Gynecol Cancer **17**(5): 979-85.
- Jubb AM, Bell SM, et al. (2001). "Methylation and colorectal cancer." J Pathol **195**(1): 111-34.
- Kaiser S, Park YK, et al. (2007). "Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer." Genome Biol **8**(7): R131.
- Karsa LV, Lignini TA, et al. (2010). "The dimensions of the CRC problem." Best Pract Res Clin Gastroenterol **24**(4): 381-96.
- Katballe N, Christensen M, et al. (2002). "Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer in Danish colorectal cancer patients." Gut **50**(1): 43-51.

- Khambata-Ford S, Garrett CR, et al. (2007). "Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab." J Clin Oncol **25**(22): 3230-7.
- Ki DH, Jeung HC, et al. (2007). "Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures in colorectal cancer." Int J Cancer **121**(9): 2005-12.
- Kim JB, Stein R, et al. (2005). "Tumour-stromal interactions in breast cancer: the role of stroma in tumorigenesis." Tumour Biol **26**(4): 173-85.
- Kim K, Zakharkin SO, et al. (2010). "Expectations, validity, and reality in gene expression profiling." J Clin Epidemiol **63**(9): 950-9.
- Kinzler KW, Vogelstein B. (1997). "Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers." Nature **386**(6627): 761, 3.
- Kirklin JW, Dockerty MB, et al. (1949). "The role of the peritoneal reflection in the prognosis of carcinoma of the rectum and sigmoid colon." Surg Gynecol Obstet **88**(3): 326-31.
- Kitahara O, Furukawa Y, et al. (2001). "Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia." Cancer Res **61**(9): 3544-9.
- Kivela AJ, Saarnio J, et al. (2001). "Differential expression of cytoplasmic carbonic anhydrases, CA I and II, and membrane-associated isozymes, CA IX and XII, in normal mucosa of large intestine and in colorectal tumors." Dig Dis Sci **46**(10): 2179-86.
- Kleivi K, Lind GE, et al. (2007). "Gene expression profiles of primary colorectal carcinomas, liver metastases, and carcinomatoses." Mol Cancer **62**.
- Koehler A, Bataille F, et al. (2004). "Gene expression profiling of colorectal cancer and metastases divides tumours according to their clinicopathological stage." J Pathol **204**(1): 65-74.
- Kolligs FT, Bommer G, et al. (2002). "Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis." Digestion **66**(3): 131-44.
- Kondo Y, Issa JP. (2004). "Epigenetic changes in colorectal cancer." Cancer Metastasis Rev **23**(1-2): 29-39.

- Konishi N, Hiasa Y, et al. (1995). "Intratumor cellular heterogeneity and alterations in ras oncogene and p53 tumor suppressor gene in human prostate carcinoma." Am J Pathol **147**(4): 1112-22.
- Koopman M, Venderbosch S, et al. (2009). "Predictive and prognostic markers for the outcome of chemotherapy in advanced colorectal cancer, a retrospective analysis of the phase III randomised CAIRO study." Eur J Cancer **45**(11): 1999-2006.
- Kwon HC, Kim SH, et al. (2004). "Gene expression profiling in lymph node-positive and lymph node-negative colorectal cancer." Dis Colon Rectum **47**(2): 141-52.
- Kwong KY, Bloom GC, et al. (2005). "Synchronous global assessment of gene and protein expression in colorectal cancer progression." Genomics **86**(2): 142-58.
- Lamberti C, Mangold E, et al. (2006). "Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer among unselected patients with colorectal cancer in Germany." Digestion **74**(1): 58-67.
- Lander ES, Linton LM, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- Larkin JE, Frank BC, et al. (2005). "Independence and reproducibility across microarray platforms." Nat Methods **2**(5): 337-44.
- Latil A, Chene L, et al. (2003). "Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors." Int J Cancer **103**(3): 306-15.
- Laukoetter MG, Mennigen R, et al. (2010). "Intestinal Cancer Risk in Crohn's Disease: A Meta-Analysis." J Gastrointest Surg.
- Lengauer C, Kinzler KW, et al. (1998). "Genetic instabilities in human cancers." Nature **396**(6712): 643-9.
- Lester RD, Jo M, et al. (2007). "uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells." J Cell Biol **178**(3): 425-36.
- Li L, Wei XH, et al. (2010). "LAPTM4B: A novel cancer-associated gene motivates multidrug resistance through efflux and activating PI3K/AKT signaling." Oncogene.
- Li M, Lin YM, et al. (2004). "Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray." Int J Oncol **24**(2): 305-12.

- Liao D, Johnson RS. (2007). "Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer." Cancer Metastasis Rev **26**(2): 281-90.
- Lin HM, Chatterjee A, et al. (2007). "Genome wide expression profiling identifies genes associated with colorectal liver metastasis." Oncol Rep **17**(6): 1541-9.
- Lin YH, Friederichs J, et al. (2007). "Multiple gene expression classifiers from different array platforms predict poor prognosis of colorectal cancer." Clin Cancer Res **13**(2 Pt 1): 498-507.
- Lin YM, Furukawa Y, et al. (2002). "Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas." Oncogene **21**(26): 4120-8.
- Liu B, Nicolaidis NC, et al. (1995). "Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability." Nat Genet **9**(1): 48-55.
- Liu J, Zhou R, et al. (2000). "Biological function of a novel gene overexpressed in human hepatocellular carcinoma." Chin Med J (Engl) **113**(10): 881-5.
- Liu X, Xiong F, et al. (2009). "LAPTM4B-35, a novel tetratransmembrane protein and its PPRP motif play critical roles in proliferation and metastatic potential of hepatocellular carcinoma cells." Cancer Sci **100**(12): 2335-40.
- Lockhart DJ, Dong H, et al. (1996). "Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays." Nat Biotechnol **14**(13): 1675-80.
- Lynch HT, de la Chapelle A. (2003). "Hereditary colorectal cancer." N Engl J Med **348**(10): 919-32.
- Mahadevappa M, Warrington JA. (1999). "A high-density probe array sample preparation method using 10- to 100-fold fewer cells." Nat Biotechnol **17**(11): 1134-6.
- Makinen MJ. (2007). "Colorectal serrated adenocarcinoma." Histopathology **50**(1): 131-50.
- Makinen MJ, George SM, et al. (2001). "Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis." J Pathol **193**(3): 286-94.
- Markowitz SD, Bertagnolli MM. (2009). "Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer." N Engl J Med **361**(25): 2449-60.
- Michiels S, Koscielny S, et al. (2005). "Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy." Lancet **365**(9458): 488-92.

- Michl P, Barth C, et al. (2003). "Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer." Cancer Res **63**(19): 6265-71.
- Michl P, Buchholz M, et al. (2001). "Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin." Gastroenterology **121**(3): 678-84.
- Miller LD, Liu ET. (2007). "Expression genomics in breast cancer research: microarrays at the crossroads of biology and medicine." Breast Cancer Res **9**(2): 206.
- Miwa N, Furuse M, et al. (2001). "Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers." Oncol Res **12**(11-12): 469-76.
- Munemitsu S, Albert I, et al. (1995). "Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 3046-50.
- Munro AJ, Lain S, et al. (2005). "P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review." Br J Cancer **92**(3): 434-44.
- Nagel S, Borisch B, et al. (1995). "Somatic mutations detected by mini- and microsatellite DNA markers reveal clonal intratumor heterogeneity in gastrointestinal cancers." Cancer Res **55**(13): 2866-70.
- Nannini M, Pantaleo MA, et al. (2009). "Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: results and perspectives." Cancer Treat Rev **35**(3): 201-9.
- Nichols LS, Ashfaq R, et al. (2004). "Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target." Am J Clin Pathol **121**(2): 226-30.
- Norat T, Lukanova A, et al. (2002). "Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies." Int J Cancer **98**(2): 241-56.
- Notterman DA, Alon U, et al. (2001). "Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays." Cancer Res **61**(7): 3124-30.
- Offner S, Hekele A, et al. (2005). "Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancarcinoma therapy." Cancer Immunol Immunother **54**(5): 431-45.

- Ohyama H, Zhang X, et al. (2000). "Laser capture microdissection-generated target sample for high-density oligonucleotide array hybridization." Biotechniques **29**(3): 530-6.
- Paik S, Kim CY, et al. (2005). "Technology insight: Application of molecular techniques to formalin-fixed paraffin-embedded tissues from breast cancer." Nat Clin Pract Oncol **2**(5): 246-54.
- Paramore A, Frantz S. (2003). "Bortezomib." Nat Rev Drug Discov **2**(8): 611-2.
- Phillips HS, Kharbanda S, et al. (2006). "Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis." Cancer Cell **9**(3): 157-73.
- Polakis P. (2007). "The many ways of Wnt in cancer." Curr Opin Genet Dev **17**(1): 45-51.
- Popat S, Houlston RS. (2005). "A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis." Eur J Cancer **41**(14): 2060-70.
- Popat S, Matakidou A, et al. (2004). "Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis." J Clin Oncol **22**(3): 529-36.
- Popat S, Zhao D, et al. (2007). "Relationship between chromosome 18q status and colorectal cancer prognosis: a prospective, blinded analysis of 280 patients." Anticancer Res **27**(1B): 627-33.
- Prall F, Nizze H, et al. (2005). "Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma." Histopathology **47**(1): 17-24.
- Pritchard CC, Grady WM. (2010). "Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice." Gut.
- Puppa G, Sonzogni A, et al. (2010). "TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues." Arch Pathol Lab Med **134**(6): 837-52.
- Rangel LB, Agarwal R, et al. (2003). "Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas." Clin Cancer Res **9**(7): 2567-75.
- Ross JS, Torres-Mora J, et al. (2010). "Biomarker-based prediction of response to therapy for colorectal cancer: current perspective." Am J Clin Pathol **134**(3): 478-90.

- Salazar R, Roepman P, et al. (2010). "Gene Expression Signature to Improve Prognosis Prediction of Stage II and III Colorectal Cancer." J Clin Oncol.
- Sansom OJ, Reed KR, et al. (2004). "Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration." Genes Dev **18**(12): 1385-90.
- Sauer R, Becker H, et al. (2004). "Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer." N Engl J Med **351**(17): 1731-40.
- Schena M, Shalon D, et al. (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." Science **270**(5235): 467-70.
- Schmiegel W, Pox C, et al. (2010). "S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on February 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII)." Z Gastroenterol **48**(1): 65-136.
- Shao GZ, Zhou RL, et al. (2003). "Molecular cloning and characterization of LAPTM4B, a novel gene upregulated in hepatocellular carcinoma." Oncogene **22**(32): 5060-9.
- Siddiqui AD, Piperdi B. (2010). "KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy." Ann Surg Oncol **17**(4): 1168-76.
- Sly WS, Hu PY. (1995). "Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies." Annu Rev Biochem **64**:375-401.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, et al. (2010). TNM classification of malignant tumours. Oxford: Blackwell.
- Soreide, Norstein J, et al. International standardization and documentation of the treatment of rectal cancer. In: Soreide O, Norstein J, eds. Rectal cancer surgery Optimisation – standardization – documentation. Berlin Heidelberg New York: Springer; 1997:405-45.
- Spano JP, Milano G, et al. (2008). "Potential predictive markers of response to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer." Crit Rev Oncol Hematol **66**(1): 21-30.
- Specht K, Richter T, et al. (2001). "Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue." Am J Pathol **158**(2): 419-29.
- Su AI, Wiltshire T, et al. (2004). "A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6062-7.

- Subramanian J, Simon R. (2010). "Gene expression-based prognostic signatures in lung cancer: ready for clinical use?" J Natl Cancer Inst **102**(7): 464-74.
- Suchting S, Heal P, et al. (2005). "Soluble Robo4 receptor inhibits in vivo angiogenesis and endothelial cell migration." Faseb J **19**(1): 121-3.
- Szollosi J, Balazs M, et al. (1995). "ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer." Cancer Res **55**(22): 5400-7.
- Tejpar S, Bertagnolli M, et al. (2010). "Prognostic and predictive biomarkers in resected colon cancer: current status and future perspectives for integrating genomics into biomarker discovery." Oncologist **15**(4): 390-404.
- Timar J, Gyorffy B, et al. (2010). "Gene signature of the metastatic potential of cutaneous melanoma: too much for too little?" Clin Exp Metastasis **27**(6): 371-87.
- Toyota M, Ahuja N, et al. (1999). "CpG island methylator phenotype in colorectal cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8681-6.
- Trautmann K, Steudel C, et al. (2005). "Expression profiling of gastric cancer samples by oligonucleotide microarray analysis reveals low degree of intra-tumor variability." World J Gastroenterol **11**(38): 5993-6.
- Turnbull RB, Jr., Kyle K, et al. (1967). "Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates." Ann Surg **166**(3): 420-7.
- van 't Veer LJ, Dai H, et al. (2002). "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." Nature **415**(6871): 530-6.
- Vargesson N, Luria V, et al. (2001). "Expression patterns of Slit and Robo family members during vertebrate limb development." Mech Dev **106**(1-2): 175-80.
- Venter JC, Adams MD, et al. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Vogelstein B, Fearon ER, et al. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." N Engl J Med **319**(9): 525-32.
- Wadlow R, Ramaswamy S. (2005). "DNA microarrays in clinical cancer research." Curr Mol Med **5**(1): 111-20.
- Wallrapp C, Muller-Pillasch F, et al. (1997). "Characterization of a high copy number amplification at 6q24 in pancreatic cancer identifies c-myc as a candidate oncogene." Cancer Res **57**(15): 3135-9.

- Walther A, Johnstone E, et al. (2009). "Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer." Nat Rev Cancer **9**(7): 489-99.
- Wang B, Xiao Y, et al. (2003). "Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity." Cancer Cell **4**(1): 19-29.
- Wang Y, Jatkoe T, et al. (2004). "Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer." J Clin Oncol **22**(9): 1564-71.
- Wang Y, Klijn JG, et al. (2005). "Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer." Lancet **365**(9460): 671-9.
- Watanabe T, Wu TT, et al. (2001). "Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer." N Engl J Med **344**(16): 1196-206.
- Whitfield ML, George LK, et al. (2006). "Common markers of proliferation." Nat Rev Cancer **6**(2): 99-106.
- Williams NS, Gaynor RB, et al. (2003). "Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference." Clin Cancer Res **9**(3): 931-46.
- Wolmark N, Fisher B, et al. (1988). "Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01." J Natl Cancer Inst **80**(1): 30-6.
- Xian J, Clark KJ, et al. (2001). "Inadequate lung development and bronchial hyperplasia in mice with a targeted deletion in the Dutt1/Robo1 gene." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15062-6.
- Yamasaki M, Takemasa I, et al. (2007). "The gene expression profile represents the molecular nature of liver metastasis in colorectal cancer." Int J Oncol **30**(1): 129-38.
- Yamashita K, Dai T, et al. (2003). "Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype." Cancer Cell **4**(2): 121-31.
- Yanagawa R, Furukawa Y, et al. (2001). "Genome-wide screening of genes showing altered expression in liver metastases of human colorectal cancers by cDNA microarray." Neoplasia **3**(5): 395-401.
- Yang H, Xiong F, et al. (2010). "LAPTM4B-35 is a novel prognostic factor of hepatocellular carcinoma." J Surg Oncol **101**(5): 363-9.

- Yang H, Xiong F, et al. (2010). "Overexpression of LAPTM4B-35 promotes growth and metastasis of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo." Cancer Lett **294**(2): 236-44.
- Yang H, Xiong FX, et al. (2010). "LAPTM4B-35 overexpression is a risk factor for tumor recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma." J Cancer Res Clin Oncol **136**(2): 275-81.
- Yao T, Nishiyama K, et al. (2000). "Multiple 'serrated adenocarcinomas' of the colon with a cell lineage common to metaplastic polyp and serrated adenoma. Case report of a new subtype of colonic adenocarcinoma with gastric differentiation." J Pathol **190**(4): 444-9.
- Yeh JJ. (2009). "Prognostic signature for pancreatic cancer: are we close?" Future Oncol **5**(3): 313-21.
- Yokoyama S, Shatney CH, et al. (1997). "The potential role of fecal carbonic anhydrase II in screening for colorectal cancer." Am Surg **63**(3): 243-6; discussion 6-7.
- Zhang L, Zhou W, et al. (1997). "Gene expression profiles in normal and cancer cells." Science **276**(5316): 1268-72.
- Zou TT, Selaru FM, et al. (2002). "Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon." Oncogene **21**(31): 4855-62.

8. Verwendete eigene Arbeiten

- I Grit Kasper, Anke Vogel, Irina Klamann, **Jörn Gröne**, Iver Petersen, Birgit Weber, Esmeralda Castanos-Velez, Eike Staub and Detlev Mennerich
The human LAPTM4b transcript is upregulated in various types of solid tumours and seems to play a dual functional role during tumour progression
Cancer Lett. 2005 Jun 16;224(1):93-103.
- II **Jörn Gröne**, Oliver Doebler, Christoph Loddenkemper, Birgit Hotz, Heinz-Johannes Buhr, Sarah Bhargava
Robo1/Robo4: Differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer
Oncol. Rep. 2006 Jun;15(6):1437-43.
- III **J. Gröne**, B. Weber, E. Staub, M. Heinze, I. Klamann, C. Pilarsky, K. Hermann, E. Castanos-Velez, S. Röpcke, B. Mann, A. Rosenthal, H. J. Buhr
Differential expression of genes encoding tight junction proteins in colorectal cancer: frequent dysregulation of claudin-1, -8 and -12
Int J Colorectal Dis. 2007 Jun;22(6):651-9.
- IV Eike Staub*, **Joern Groene***, Maya Heinze, Detlev Mennerich, Stefan Roepcke, Irina Klamann, Bernd Hinzmann, Esmeralda Castanos-Velez, Christian Pilarsky, Benno Mann, Thomas Brümmendorf, Birgit Weber, Heinz-Johannes Buhr, André Rosenthal
Genome-wide expression patterns of invasion front, inner tumor mass and surrounding normal epithelium of colorectal tumors
Mol Cancer. 2007 Dec 14;6:79.
- V **J. Groene****, U. Mansmann**, R. Meister, E. Staub, S. Roepcke, M. Heinze, I. Klamann, T. Brümmendorf, K. Hermann, C. Loddenkemper, C. Pilarsky, B. Mann, H.P. Adams, H.J. Buhr, A. Rosenthal
Transcriptional census of 36 microdissected colorectal cancers yields a gene signature to distinguish UICC II and III
Int J Cancer. 2006 Oct 15;119(8):1829-36. Erratum in: Int J Cancer. 2007 Jul 15;121(2):466.

VI Staub E**, **Groene J****, Heinze M, Mennerich D, Roepcke S, Klaman I, Hinzmann B, Castanos-Velez E, Pilarsky C, Mann B, Brümmendorf T, Weber B, Buhr HJ, Rosenthal A. An expression module of WIPF1-coexpressed genes identifies patients with favorable prognosis in three tumor types
J Mol Med. 2009 Jun;87(6):633-44.

* *Korrespondierende Autoren*

** *Gemeinsame Erstautorenschaft*

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir auf meinem bisherigen akademischen Weg hilfreich zur Seite gestanden und damit zum Gelingen dieser Habilitation beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Chef, chirurgischen Lehrer und wissenschaftlichen Mentor Herrn Professor Dr. Heinz Johannes Buhr, der mir durch seine kontinuierliche Unterstützung und Beratung die Möglichkeit eröffnete, diese Arbeit zu erstellen. Er hat gemeinsam mit PD Dr. Benno Mann durch Schaffung einer wissenschaftlichen Kooperation mit der Firma metaGen im Jahr 2000 die Grundlage für die dargestellten Untersuchungen zum "Zusammenhang zwischen differentieller Genexpression und phänotypischen Veränderungen am Beispiel des kolorektalen Karzinoms" geschaffen. In unruhigen Zeiten und der damit verbundenen Unsicherheit in Bezug auf die Fortsetzung des Projekts unterstützte er das Angebot der Firma Bayer Schering Pharma, die wissenschaftlichen Fragestellungen im Rahmen einer neuen Forschungs Kooperation fortzusetzen. Durch seine Vermittlung zum Institut für Pathologie im Hause von Herrn Professor Stein entstand eine intensive Zusammenarbeit mit Herrn Professor Michael Hummel und seinen Mitarbeitern, den ich sehr für die lebhafteste Unterstützung in den gemeinsamen Projekten danken möchte.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Kollegen, Doktoranden, Kooperationspartnern, und Mitarbeitern im chirurgischen Forschungslabor bedanken, die mich durch dieses Projekt begleitet haben und unterstützt haben. Ihr großes Engagement hat mich stets motiviert, und ihre konstruktiven Anregungen sowie die kritischen Auseinandersetzungen mit ihnen waren mir immer sehr wichtig.

Mein Dank gilt ebenfalls meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Heinz Becker und seiner Mitarbeiterin Frau Professor Dr. Annegret Müller, die mich im Rahmen meiner Doktorarbeit an das wissenschaftlich-analytische Denken herangeführt haben.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Frau und meinen Kindern für ihre andauernde Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld.

10. Erklärung

§4 Abs. 3(k) der HabOMed der Charité Berlin

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie der verwendeten Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

12. Mai 2011

Datum

.....

Unterschrift