

**Identifizierung und Optimierung von Biomarkern der Karzinogenese des
duktalen Pankreaskarzinoms, des Kolonkarzinoms und des Prostatakarzinoms**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich 18 – Naturwissenschaften
der Universität Kassel

Vorgelegt von

Dipl. biol.

Meike Werther

aus Kassel

Kassel, 2007

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Friedrich W. Herberg

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Josef Rüschoff

Man gab uns mancherlei auf Erden:
zum Denken gab man uns die Stirn,
man gab uns Herz- und Leibbeschwerden,
doch auch den Himmel und den Zwirn.

Heinz Erhard

Meinem Sohn Nico gewidmet

Erklärung:

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwandt und Abbildungen oder Textpassagen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe.

Meike Werther

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	7
1.1 Aufgabenstellung.....	8
1.2 Identifizierung von Tumorbiomarkern	9
1.2.1 Auswahl der relevanten Biomarker	10
1.2.2 Relevante Gene für die Tumorenstehung	11
1.2.3 Aneuploidie und Krebsentstehung.....	13
1.2.6 Translokation.....	14
1.3 Theorien zur Entstehung erworbener Hormonresistenz beim Prostatakarzinom	15
2 MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Untersuchte Gewebe	17
2.1.1 Das Pankreas.....	17
2.1.2 Das duktales Pankreaskarzinom	17
2.1.3 Die Chronische Pankreatitis	19
2.1.4 Das Kolon.....	20
2.1.5 Das Kolonkarzinom	20
2.1.6 Die Prostata	25
2.1.7 Das Prostatakarzinom	25
2.1.8 Die Benigne Prostatahyperplasie	28
2.2 Tumorbeurteilungskriterien.....	29
2.2.1 TNM-Klassifikation.....	29
2.2.2 Histologische Einteilung von Pankreaskarzinomgewebe.....	31
2.2.3 Histologische Einteilung von Prostatakarzinomgewebe	34
2.3 Präparatgewinnung	35
2.3.1 Operative Tumoresektion – des Pankreaskarzinoms	35
2.3.2 Operative Tumoresektion – des Kolonkarzinoms	36
2.3.3 Operative Tumoresektion – des Prostatakarzinoms.....	36
2.3.4 Transurethrale Resektion – bei benigner Prostatahyperplasie.....	36
2.4 Präparatfixierung.....	37
2.5 Entparaffinierung.....	37
2.6 Färbemethoden.....	38
2.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	38
2.6.2 Toluidin-Färbung.....	38
2.6.3 Methylenblau-Färbung.....	38
2.6.4 Arcturus-Färbung	39
2.7 Laser Mikrodisektion.....	39
2.7.1 Mikrodisektionsprozess	40
2.8 DNA Isolierung aus mikrodisezierten Zellen.....	40
2.9 RNA-Isolierung aus ungefärbten FFPE-Gewebeschnitten	41
2.9.1 HighPure-RNA-Paraffin-Kit (Roche, Mannheim) - zur RNA Isolierung	41
2.9.2 Paradise Reagent System (Arcturus, CA, USA) - zur RNA Isolierung.....	41
2.9.3 RNeasy-Micro-Kit (Qiagen, Hilden) - zur RNA Isolierung	42
2.9.4 RNA-Isolierung aus humanem Frischgewebe.....	42
2.10 RNA-Aufreinigung	43
2.11 Messung der RNA-Quantität mit Hilfe eines Spektralphotometers	43
2.12 PCR-Methoden	43
2.12.1 Reverse Transkription und Quantitative <i>real-time</i> -PCR.....	43
2.12.2 PEP-PCR	45
2.12.3 Mikrosatelliten-PCR.....	46
2.13 Sequenzierung.....	48
2.14 Gelelektrophorese.....	50
2.14.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	50
2.14.2 Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese	50
2.14.3 Silbergelelektrophorese	51
2.15 Fragmentanalyse.....	52
2.16 DNA-Mikroarray Untersuchungen.....	53
2.16.1 Qualitätskontrolle der RNA mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer	53
2.16.2 Amplifikation der RNA	54

2.16.3 Auswertung von Affymetrix Oligonukleotid-Mikroarrays.....	56
2.16.4 Vergleichende Expressions-Analyse.....	57
2.16.5 Synthese und Fragmentierung der Biotin-markierten cRNA	59
2.16.6 Hybridisierung, Waschen und Scannen der Genechips.....	59
2.17 Statistische Algorithmen für die Auswertung der Microarrays.....	61
2.17.1 Skalierung:	61
2.17.2 Expressionsmatrix:	62
2.17.3 Korrelationsmatrix:	62
2.17.4 SAM-Algorithmus:	62
2.17.5 Kombination aus RMA- und dem MAS5 Algorithmus zur Identifizierung exprimierter Gene.....	63
2.17.6 Clusteralgorithmen	63
2.17.7 HOPACH-Analyse.....	64
2.17.8 Standardabweichung.....	65
2.18 Immunhistochemie (IHC).....	65
2.18.1 Immunhistochemische Expressionsanalysen	65
2.18.2 Protein-Überexpression	65
2.19 Interphase-Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	66
2.20 Patientenkollektive.	68
2.20.1 Patienten mit chronischer Pankreatitis.	68
2.20.2 Patienten mit normaler Kolon Mucosa und Kolonkarzinom	69
2.20.2 Patienten mit Prostatakarzinom.....	70
2.20.3 Patienten mit hormonsensitivem Prostatakarzinom.....	70
2.20.4 Patienten mit frühem hormonrefraktärem Prostatakarzinom	70
2.20.5 Patienten mit spätem hormonrefraktärem Prostatakarzinom.....	71
2.20.6 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie	71
2.21 Substanzen und Geräte.	71
3 ERGEBNISSE	73
3.1 Untersuchungen zur Wertigkeit von Biomarkern der frühen Karzinogenese beim duktalen Pankreaskarzinom, in Geweben chronischer Pankreatitis sowie kolorektalen Karzinomen und hormonresistenten Prostatakarzinomen.	73
3.1.1 Immunhistochemische Expressionsanalysen der Tumor-Suppressor-Gene <i>p16^{INK4}</i> , <i>p53</i> und <i>DPC4</i> in Geweben chronischer Pankreatitis.....	73
3.1.2 Molekulargenetische Analysen von Geweben mit chronischer Pankreatitis	74
3.1.3 Interphase-FISH bei chronischer Pankreatitis.	80
3.2 Mikroarray-Expressionsanalysen von Kolon- und Prostatakarzinomgewebe	83
3.2.1 RNA-Qualitätskriterien.....	83
3.2.2 Identifizierung differenziell regulierter Gene in Kolonkarzinomgeweben.....	84
3.2.3 RNA-Qualität von Formalin-fixiertem Kolon-Gewebe	89
3.2.4 RNA Qualität von transurethral resezierten Prostata-Gewebeproben	92
3.2.5 Qualitätskontrolle von Mikroarray Daten der Prostata-Gewebeproben.....	92
3.2.6 Reproduzierbarkeit.....	94
3.2.7 Hierarchisches Clustern der Replikate	95
3.2.8 Vergleich von Expressionsprofilen transurethral gewonnener Resektate mit chirurgisch extrahierten Prostata-Gewebeproben	96
3.2.9 Cluster Analyse der BPH, PCa und HRPC Proben	98
3.2.10 Identifizierung von Genen, die an der Entstehung von hormonresistenten Prostatakarzinomen beteiligt sind	101
3.2.11 HRPC spezifische Gene	101
3.2.12 Vergleich der Genexpressionsprofile der fünf verschiedenen Krankheitsstufen: benigne Prostatahyperplasie BPH, Prostatakarzinom PCa, hormonsensitives Prostatakarzinom hsPCA, frühes hormonresistentes Prostatakarzinom fHRPC und spätes hormonresistentes Prostatakarzinom sHRPC.....	102
3.2.13 Bestätigung der Array-Ergebnisse aus Prostata-Gewebeproben der differenziell regulierten Transkripte mittels RT-PCR	110
3.2.14 Differenziell regulierte Signalwege im Verlauf der Hormonresistenz der Prostatakarzinoms	110
4 DISKUSSION	113

4.1 Mögliche Testsysteme zur Untersuchungen von Genmutationen in komplexen Gewebeerständen.....	114
4.1.1 Molekulargenetische Analysen von Signaturmutationen (<i>p16^{INK4}</i> , <i>p53</i> und <i>DPC4</i>) für das Pankreaskarzinom in Geweben chronischer Pankreatitis	114
4.2 Aneuploidie und Krebs	125
4.2.1 Welches Ereignis erfolgt zuerst: LOH oder Basenmutation?	128
4.2.2 Analysen chromosomaler Alterationen in PanINs in Geweben chronischer Pankreatitis.....	136
4.3 Gen-Expressionsanalysen mittels Mikroarray-Technik von Kolonkarzinomgewebe und Hyperplasie- und Karzinomgewebe der Prostata	140
4.3.1 RNA Qualität und Quantität von Formalin fixierten Paraffin Gewebeblöcken .	140
4.3.2 Expressionsanalysen von Kolonkarzinom-Gewebeprobe.....	141
4.3.3 Microarray Untersuchungen von Kolonkarzinom Gewebeprobe	143
4.4 Gen-Expressionsanalysen zur Aufklärung der Hormonresistenz des Prostatakarzinoms.....	150
4.4.1 Untersuchungen zur transurethralen Resektionsmethode	152
4.4.2 Evaluierung von Prostatakarzinom-Biomarkern in einer Zeitreihenanalyse....	152
4.4.3 Differenziell exprimierte Pathways	155
4.5 Theorien zur Entstehung der Hormonresistenz	156
II. ZUSAMMENFASSUNG	162
III. DANKSAGUNG	166
IV. LITERATURVERZEICHNIS	167

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABCE1	engl. ATP-binding cassette, sub-family E, member 1
ABL	engl. alias v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
AMACR	Alpha-Methylacyl-CoA Racemase
APC	engl. anaphase-promoting-komplex
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ARE	engl. Androgen-responsive Element
aRNA	antisense-RNA
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	engl. area under curve
bp	Basenpaare
BCL1,2	engl. B-cell lymphoma 1 oder 2
BCR	engl. breakpoint cluster region
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumine)
BPH	benigne Prostatahyperplasie
Ca	Karzinom (engl. carcinoma)
cDNA	komplementäre DNA
CGH	comparative genomische Hybridisierung
CEP	chromosome enumeration probe
Ch	Chromosom
CIN	Chromosomeninstabilität
CKI	Cyclin-Kinase-Inhibitoren
CDK	Cyclin abhängige Kinase (engl. cykline depend kinasis)
COX6C	engl. cytochrome c oxidase subunit VIc
CP	chronische Pankreatitis
CTD	carboxylterminale Domäne
Da	Dalton (Molekulargewicht)
DDX21	engl. DEAD box polypeptide 21
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest	destilliert
DHT	Dihydrotestosteron
DM	Duktale Metaplasie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
DPC4	engl. deleted in pancreas carcinoma
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
<i>et al.</i>	und andere (lat. et alii)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ERCP	Endoskopisch- retrograde- Cholangio- Pankreaticographie
FAA	Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese
FDR	engl. false discovery rate
fHRPC	frühes hormonresistentes Prostatakarzinom
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormons
GSN	Gelsolin
GTF	genereller Transkriptionsfaktor
HAT	Histon-Acetyltransferase
HE	Hämatoxylin Eosin
het	heterozygot
HIF-1	engl. hypoxia inducible factor 1
HNPCC	hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom

HOPE	engl. Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRPC	hormonresistentes Prostatakarzinom
HSD17B12	Hydroxy Steroid-17 β -Dehydrogenase 12
HSP	Heat-shock-proteine
HSPD1	Heat shock 60 kD protein 1
hsPCa	hormonsensitives Prostatakarzinom
IM	intragenetische Mutation
INK4	Inhibitoren der Kinase 4
I-PEP-PCR	engl. improved primer extension preamplification-PCR
DM	Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
JAK1	Janus Kinase 1
KLF4	kuppel like factor 4
K-ras	Kirsten RAS Onkogen
Lef	lymphoid enhancing factor
LHRH	engl. luteinising hormone releasing hormone
LOH	engl. loss of heterozgosity
m	milli
M	Mol
MAB	maximale Androgenblockade
MEIS1	engl. myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog (mouse)
MM	engl. mismatch
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
MYK	engl. alias v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
MYLK	engl. myosine light chain kinase
n	nano
NDUFC2	NADH dehydrogenase 1 subcomplex unknown 2
OAT	Ornithin Aminotransferase
p	piko
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PanIN	engl. pancreatic intraductal neoplasia
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCa	Prostatakarzinom
PCNA	engl. proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität (lat. pondus hydrogenii)
PIK	Präinitiationskomplex
PKA	Proteinkinase A
PLP2	Proteolipid Protein 2 (engl. colonic epithelium-enriched)
PM	engl. Perfect match
POL	Polymerase
ppENK	Preproenkephalin
prep	Präparation
PRKCB1	Protein kinase C, beta 1
PSA	Prostata spezifisches Antigen
PSMA2	proteasome subunit, alpha type, 2
RHOQ	ras homolog genefamily member Q.
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RIN	RNA integrity number
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SAM	engl. significance analysis of microarray
Seq	Sequenz
SGK	serum/glycocorticoid regulated kinase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SLC	engl. solute carrier family
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SHGB	Sex-Hormon-bindendes-Globulin
snRNA	engl. small nuclear RNA
SOP	<i>standard operating procedures</i>
SRD5A1	Steroid-5- α -Reduktase
sHRPC	spätes hormonresistentes Prostatakarzinom
TACC1	engl. transforming acidic coiled coil 1
TAF	(TBP)-associated factor,
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBP	engl. TATA-box-binding protein
TBPL1	engl. TATA-box-binding protein-like protein 1
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. Tris buffered saline)
Tcf	<i>T-cell factor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Temp	Temperatur
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- β	engl. transforming growth factor- β
TRAX	Translin
UQCRH	engl. ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein
TUR	transurethral Resektat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCL	Vinculin
VEGF	engl. Vascular Endothelial Growth Factor
YWHAZ	engl. tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
ZIP	Zink-Transporter-Protein

1 EINLEITUNG

Die Erkrankung an einer malignen Neoplasie führt heutzutage, trotz vorhandener moderner Diagnose- und Therapie Möglichkeiten, bei einer großen Anzahl von Betroffenen zum Tode. Krebserkrankungen gehören somit in unserer Gesellschaft immer noch zu einem der bedeutendsten Gesundheitsprobleme.

Die erste Theorie zum Mechanismus der Krebsentstehung wurde bereits in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts von Virchow postuliert und besagte, dass Krebs durch chronische Gewebereizung ausgelöst wird. Boveri (1914) und Bauer (1928) haben Anfang des 20. Jahrhunderts auf die Bedeutung von chromosomalen Veränderungen und somatischen Mutationen im Hinblick auf die Krebsentstehung (Karzinogenese) hingewiesen.

Die Karzinogenese, die Entstehung maligner Tumoren, verläuft nach der so genannten Mehrstufenhypothese in drei Phasen:

1. Initialisierungsphase: Hier werden durch verschiedene Faktoren, wie Karzinogene, Hormone, onkogene Viren, genetisch bedingte Defekte der Reparatursysteme der DNA, erworbene oder angeborene Immundefekte, Mutationen und eine irreversible molekulare Transformation hervorgerufen und Onkogene reaktiviert.
2. Latenzperiode: Diese Phase kann bis zu 20 Jahren dauern. Es kommt zur Proliferation der initiierten Zellen und Bildung von Tumorzellen mit Kernatypien und Kernpolymorphien. Das Zusammenwirken verschiedener Karzinogene (Synkarzinogenese), die Wirkung von Co-Karzinogenen oder unspezifischen Faktoren (Promotoren) kann die Karzinogenese beschleunigen.
3. Tumormanifestation: In dieser Phase werden Tumorstufen, so genannte Vorläuferläsionen (*carcinoma in situ*) diagnostiziert. Im weiteren Verlauf erfolgt meist infiltrierendes Wachstum und Metastasierung (Pitot, 1990, Grasl-Kraupp *et al.*, 2000; Heldin *et al.*, 1997; Rozenblum *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 2002)

Eine spezielle Hypothese zur endogenen Krebsentstehung wurde von Otto Warburg (1926) aufgestellt: Für ihn gab es etliche tertiäre und sekundäre Ursachen für die Entstehung maligner Tumoren, beispielsweise Schädigungen physikalischer oder chemischer Art. Aber die primäre Ursache sah er in einer irreversiblen Störung der Zellatmung.

Krebs wird in vielen Organen aufgrund unzulänglicher Diagnoseverfahren häufig erst in weit fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert, in welchem eine primär kurative Therapie nicht mehr möglich ist. Das Eingrenzen von Risikogruppen und die Verbesserung der allgemeinen Krebs Früherkennung ist nur durch Entwicklung neuer und innovativer Testsysteme möglich, die zu einer sensitiveren und spezifischeren Diagnostik führen. Es

ist deshalb von hoher Relevanz, anatomische, physiologische, biochemische oder molekulare Marker zu finden, welche die derzeit verfügbaren Methoden zur Früherkennung, Prognose und Therapie verbessern können.

1.1 Aufgabenstellung

Am Beispiel der Progression zum duktalem Pankreaskarzinom sollten zunächst Vorläuferläsionen so genannter **Pancreatic Intraepithelial Neoplasias** (PanIN) (Hruban *et al.*, 2001) auf DNA-Ebene untersucht werden. Zur Auswahl geeigneter Proben wurden pathologische Routine-Methoden eingesetzt, wie mikroskopisch-histologische Befundung. Mit Hilfe von Lasermikrodissektion (Schütze *et al.*, 1998) konnte Tumorgewebe von tumorfreiem Gewebe separiert werden, was gewährleistete, dass reine Tumorzellpopulationen bzw. reine Zellpopulationen von Vorläuferläsionen analysiert wurden. Die so gewonnenen Zellen wurden anschließend mittels PCR (*polymerase chain reaction*) (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Fallona, 1987) und Sequenzierungs-Technik auf Mutationen und LOH (*loss of heterozygosity*) Ereignisse untersucht. Dazu sollten Mikrosatelliten-Marker für die Gene *p16^{INK4}*, *p53* und *DPC4* eingesetzt werden.

Die Relevanz der Abklärung frühester molekulargenetischer und zytogenetischer Alterationen in PanINs bestand in der Erarbeitung eines Progressionsmodells der Karzinogenese beim duktalem Pankreaskarzinom. Die Aufklärung der molekularen Pathogenese kann die Entwicklung von Früherkennungstechniken fördern, da hierdurch die derzeit einzig mögliche kurative (chirurgische) Therapieoption für eine größere Anzahl von Patienten offeriert werden kann. Für molekulare Analysen standen neben nicht einfach zu gewinnenden Pankreasgangsekreten fast ausschließlich paraffineingebettete Gewebe aus Resektaten zur Verfügung, in welchen sich insbesondere die frühesten präneoplastischen Läsionen in nur sehr geringer Zellzahl präsentieren.

Aufgabenstellung dieses Teilprojektes war die Etablierung von Protokollen für molekular- und zytogenetische Analysen sowie immunhistochemische Expressionsanalysen relevanter Gene von mikrodissezierten Pankreaskarzinomzellen. Sowie von Zellen aus Vorläuferläsionen (PanINs) die aus Geweben von Patienten mit chronischer Pankreatitis mittels Lasermikrodissektion isoliert wurden. Ziel war die Überprüfung und Weiterentwicklung eines Progressionsmodells der Karzinogenese des duktalem Pankreaskarzinoms. Ferner sollte die Prävalenz und Verteilung von Mutationen in den Genen *p16^{INK4}*, *p53* und *DPC4* im Tumorgewebe untersucht werden, um mittels der gewonnenen Daten (LOH-Analyse und DNA Sequenz) die zeitliche Reihenfolge der Mutationsereignisse aufzuklären. Untersuchungen dieser Gene an Vorläuferläsionen sollten Aufschluss über die Brauchbarkeit als Biomarker in der präventiven Tumordiagnostik geben. Des Weiteren wurden diese Vorläuferläsionen auf ihren Ploidiegrad hin untersucht. In diesem Kontext sollte die Frage geklärt werden, ob zu Beginn des Karzinogeneseprozesses zuerst die Gen-Mutation oder die chromosomale

Aneuploidie auftritt. Diese Daten sollten mit immunhistochemischen Expressionsdaten der drei Gene korreliert werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollten neue Biomarker mittels der DNA-Mikroarray-Technik identifiziert werden, die für eine Aussage über den Krankheitsverlauf verwendet werden können. Dabei wurden Expressionsprofile von normaler Kolonschleimhaut im mit Schleimhaut von Kolonkarzinom Patienten verglichen. An diesem Beispiel sollte ferner geprüft werden, in wie weit sich formalin-fixiertes Gewebe (FFPE-Gewebe) derselben Patienten zur Expressionsdiagnostik eignen, um eventuelle retrospektive Studien durchführen zu können.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden, ebenfalls mittels DNA-Mikroarray-Technik, Gen-Expressionsprofile am Beispiel des Prostatakarzinoms erstellt, um einen Hinweis auf die Entstehung der Hormon-Therapieresistenz im Verlauf dieser Erkrankung zu erhalten. Es sollte geklärt werden, ob es z.B. Hinweise auf irreguläre Stoffwechselprozesse gibt, chromosomale Translokationsprozesse bzw. differenziell regulierte Gencluster, die einen Hinweis auf die Therapieresistenz liefern könnten. Ferner sollte methodisch analysiert werden, ob die Art der Gewebegewinnung, d.h. transurethrale Resektion im Vergleich zur chirurgischen Totalresektion der Prostata, vergleichbare Gen-Expressionsdaten liefert.

Für alle drei Krebserkrankungen wird ein diagnostischer Marker dringend benötigt. D.h. im Einzelnen ein Früherkennungsmarker für das duktales Pankreaskarzinom und für das Kolon- und Prostatakarzinom ein Therapie Prädiktions-Marker, da beim Pankreaskarzinom, beim Kolonkarzinom (Stufe IV) und Prostatakarzinom (Gleason Score > 7) die Fünf-Jahres-Überlebensrate im Mittel unter 5% liegt.

1.2 Identifizierung von Tumorbiomarkern

Biomarker sind anatomische, physiologische, biochemische oder molekulare Parameter, die im Zusammenhang mit dem Auftreten und der Schwere einer Erkrankung stehen. Sie sollten mit einer großen Bandbreite von Methoden, wie physiologischen Untersuchungen, Labor- und anderen medizinisch technischen Verfahren mess- bzw. detektierbar sein, Angriffspunkte für therapeutische Krankheitsintervention sein z.B. Wirkorte für Medikamente (*drug targets*), zur Diagnose herangezogen werden oder präventive Aspekte aufzeigen.

Die Suche nach therapeutischen Biomarkern nimmt mittlerweile in der Krebsforschung und in anderen Bereichen einen immer größer werdenden Stellenwert ein. (Zambrowicz *et al.*, 2003).

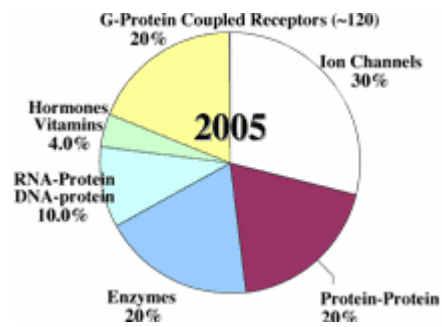


Abb. 1: Typische targets sind Enzyme wie Kinasen und Proteasen, G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), Kernmembran- und andere Rezeptoren, Ionen-Kanäle wie der Kalium- und Kalzium-Kanal, andere Transporter und die DNA. drug targets http://www.scripps.edu/newsandviews/e_20020422/print-drug.html

Ein möglicher Ansatz zur Aufklärung frühester molekulargenetischer Alterationen in Vorläuferläsionen einer Krebserkrankung besteht in der Entwicklung effizienter molekulargenetischer und zytogenetischer Untersuchungstechniken. Zusammen mit zuverlässigen Mikrodissektionsverfahren, PCR-Technik, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), Sequenzierung und anderen Verfahren ist die Biomarkerforschung weit vorangeschritten (Heinmöller *et al.*, 2002b, Player *et al.*, 2004, Taylor *et al.*, 2004).

1.2.1 Auswahl der relevanten Biomarker

Durch molekulargenetischen Vergleich von Tumorzellen mit Zellen normaler Morphologie war die Bestimmung eines bereits vorhandenen Mutationsspektrums (mutation load) möglich. Dieses könnte als zukünftiger Index dienen, für ein gesteigertes individuelles Krebsrisiko, z.B. im Rahmen einer hereditären endogenen Prädisposition oder einer exogenen individuellen Exposition z.B. ausgelöst durch Rauchen, Alkohol- und Medikamentenmissbrauch.

Die Erforschung präneoplastischer Läsionen wird dadurch erschwert, dass diese im frühesten Stadium oft von normalem Gewebe morphologisch nicht zu unterscheiden sind. Ferner werden die Läsionen auf Grund der sehr geringen Größe häufig nicht erkannt. Qualitative und quantitative molekulargenetische Analysen sind dadurch vielfach kaum durchführbar. Hinzu kommt die sehr unterschiedliche anatomische Erreichbarkeit solcher Läsionen. Während z.B. kolorektale Polypen oder hypertrophiertes Prostata-Gewebe sehr einfach über endoskopische Verfahren zugänglich sind, können präneoplastische Läsionen des Pankreas fast nur am Resektat studiert werden. Des Weiteren kann die Dynamik dieser Veränderungen des Prostata- bzw. Kolon-Gewebes über Biopsientnahmen im zeitlichen Verlauf untersucht werden, während dies am Pankreas nicht durchführbar war. Diese fundamentalen Unterschiede in der Zugänglichkeit einzelner Gewebe erklären auch die bislang sehr unterschiedlichen Fortschritte in der molekulargenetischen Charakterisierung präneoplastischer Läsionen in diesen Organen.

1.2.2 Relevante Gene für die Tumorenstehung

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Genen identifiziert worden, die direkt oder indirekt den Zellzyklus beeinflussen und damit Kontrolle über Proliferation, DNA-Reparatur und Apoptose haben.

Das Tumor-Suppressor-Gen *p53* reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose (des programmierten Zelltods) oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Aufgrund dieser Eigenschaft wird *p53* in der Literatur als Wächter des Genoms bezeichnet (Lane, 1992). *p53* liegt auf Chromosom 17p13.1.

Das *p53* Gen wurde in dieser Arbeit ausgewählt, weil es für individuelle Analysen des Mutationsspektrums in Betracht kommt. Dieses Gen gehört zu den am häufigsten mutierten Genen in menschlichen Tumoren. In über 52 verschiedenen Krebstypen (Greenblatt *et al.*, 1994, Hollstein *et al.*, 1991) und in bis zu 81% aller duktaalen Pankreaskarzinome sind Mutationen beschrieben worden (Rozenblum *et al.*, 1997, Heinmöller *et al.*, 2000, Kalthoff *et al.* 1993; Redston *et al.* 1994). Mausmodelle mit mutiertem *p53* Gen oder inaktivierten *p53* können zeigen, dass *p53* Mutationen im Rahmen der Karzinogenese einer Vielzahl von Tumoren eine zentrale Rolle spielen. Die Prävalenz einer *p53* Mutation stellt nachweislich einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Tumorerkrankung dar (Attardi *et al.*, 1999). Die Folge einer missense Mutation im *p53* Gen besteht häufig in einer Stabilisierung des *p53* Proteins in der Zelle und das *p53* Protein wird immunhistochemisch detektierbar. Diese für die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen ungewöhnliche Eigenschaft ermöglicht es, einzelne betroffene Zellen in Tumor- oder Normalgeweben lichtmikroskopisch zu identifizieren bzw. zu unterscheiden. Eine molekulare Analyse dieser Zellen erfordert die Mikrodisektion der betroffenen Zellen aus dem Gewebeverband, eine möglichst intakte DNA und RNA Isolierung des Paraffin eingebetteten Gewebes sowie eine PCR-Technik, welche die Analyse multipler Genabschnitte gestattet.

p16, auch *p16^{INK4}*, *CDKN2* oder *MTS1* genannt, gehört zu den Zellzyklus-Kontrollgenen, das heißt, es ist Teil des Systems, das die alternierenden Phasen der DNA-Vermehrung (Replikation) und die der Zellteilung (Mitose) steuert. Diese Phasen sind stark vom Aktivitätszustand bestimmter Proteine (den zyklinabhängigen Kinasen oder cyclin dependent kinases [CDK] sowie den Zyklinen) abhängig (Peters 1994; Sherr *et al.*, 1993). Ferner kann der Aktivitätszustand dieser Proteine durch die Bindung von inhibitorischen Proteinen reguliert werden. *p16^{INK4}* gehört zur Familie dieser inhibitorischen Proteine (auch cyclin dependent kinase inhibitors, CKI genannt), es inhibiert spezifisch den aus CDK4 und CyclinD gebildeten Komplex, der über die Phosphorylierung des Rb (Retinoblastom)-Proteins die Passage durch die G1-Phase des

Zellzyklus kontrolliert (Pardee, 1989; Zetterberg *et al.*, 1995). Von den am Zellzyklus beteiligten Genen war $p16^{INK4}$ am häufigsten in Karzinomen mutiert (Hahn *et al.*, 1997). Die für Tumor-Suppressor-Gene typischen Mechanismen der Inaktivierung, wie Deletion eines Allels (LOH; loss of heterozygosity) und inaktivierende Mutation des zweiten Allels, sowie die homozygote Deletion beider Allele, sind für $p16$ in Tumoren nachgewiesen worden.

$p16^{INK4}$ ist auf Chromosom 9p21 lokalisiert und in 96 Prozent der Pankreaskarzinome inaktiviert (38 Prozent der Fälle waren mutiert, 43 Prozent waren homozygot deletiert, und in einem kleineren Anteil der Karzinome (15 Prozent) konnte ein Expressionsverlust des Gens aufgrund einer Hypermethylierung des $p16^{INK4}$ Promotors nachgewiesen werden (Bartsch *et al.*, 1995; Caldas *et al.*, 1994, Huang *et al.*, 1996; Naumann *et al.*, 1996; Rozenblum *et al.*, 1997; Schutte *et al.*, 1997).

Der Verlust des CDK-Inhibitors $p16$ ist ein wesentliches Ereignis in der Genese vieler Tumoren. Der Nachweis von Mutationen oder Deletionen des $p16^{INK4}$ -Gens könnte in Zukunft zur Diagnostik des Pankreaskarzinoms und anderer maligner Tumoren einsetzbar sein. Das Verständnis der Funktionsmechanismen der CDK-Inhibitoren eröffnet Perspektiven zur Entwicklung therapeutischer Strategien.

DPC4 (Deleted in Pancreatic Carcinoma, locus 4), homolog zum entsprechenden *SMAD4* Gen bei *Drosophila melanogaster*, spielt bei der Karzinogenese von Pankreastumoren eine wichtige Rolle. Das *DPC4* Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 18q21.1. Da der Verlust der normalen Funktion des *DPC4* Gens zur Tumorbildung beiträgt, wird *DPC4* als Tumor-Suppressor klassifiziert (Hahn *et al.*, 2002). Das Produkt dieses Gens ist Bestandteil einer Signalkette, an deren Ende die Unterdrückung der Zellteilung steht. Es wurde nachgewiesen, dass das *DPC4* Gen die Neubildung von Blutgefäßen steuert (Schwarte-Walthoff *et al.*, 2000). Für das Wachstum eines Tumors ist die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff über das Blut eine unabdingbare Voraussetzung. Somit beeinflusst *DPC4* auch auf indirektem Weg das Wachstum des Tumors.

SMAD Gene codieren drei Arten von SMAD-Proteinen: Rezeptor regulierte (R-SMAD), Co-SMAD sowie inhibitorische oder antagonistische SMAD-Proteine. SMAD-Proteine zählen zu den Transkriptionsfaktoren die an der Signalübertragung von Proteinen aus der TGF- β -Familie beteiligt sind (Furgeson und Anderson 1992).

Analog zu anderen Mitgliedern der TGF- β -Ligandenfamilie ist für *DPC4* ein Modell der Signaltransduktion über ligandenspezifische transmembrane TGF- β -Rezeptoren vom Serin-Threonin-Kinase-Typ etabliert worden (Derynck *et al.* 1998; Heldin *et al.* 1997). Diese Rezeptoren bestehen aus zwei Untereinheiten, dem Typ-I- bzw. Typ-II-Rezeptor. Die Signalübertragung wird durch Bindung des TGF- β -Moleküls an den Typ-II-Rezeptor initiiert. Der Rezeptor bildet einen heterodimeren Komplex mit dem Typ-I-Rezeptor. Der dimerisierte Rezeptor aktiviert, abhängig vom gebundenen Liganden, SMAD2-Proteine

(R-SMAD) durch Phosphorylierung an deren C-Terminus. Nach der Dissoziation vom Rezeptor bildet das aktivierte SMAD2 mit DPC4/SMAD4 (Co-SMAD) einen heterooligomeren Komplex, der in den Zellkern transloziert wird. Dort bindet der SMAD-Komplex (mit weiteren Molekülen) an regulatorische DNA Regionen und aktiviert dort die Transkription spezifischer Zielgene (Chen *et al.*, 1998)

Eine Besonderheit des SMAD-Komplexes war die Tatsache, dass die meisten Untersuchungen darauf hinwiesen, dass DPC4/SMAD4 immer am Aufbau eines funktionell aktiven Komplexes beteiligt waren (Aktivator). Inhibitorische SMADs wurden in Abhängigkeit vom Rezeptor gebundenen Liganden im Komplex ausgetauscht. Diese zentrale Rolle von DPC4/SMAD4 spiegelte sich auch in Mutationsanalysen unterschiedlicher humaner Tumore wider. Dabei wurden überwiegend *DPC4* Mutationen nachgewiesen und nur selten Mutationen im *SMAD* Gen. Darüber hinaus wurde eine hohe Inaktivierungsfrequenz des *DPC4* Gens bisher nur in Pankreaskarzinomen festgestellt. In 20% der bisher untersuchten Pankreaskarzinome war *DPC4* durch Punktmutationen und in 30% durch eine homozygote Deletion der *DPC4* Region inaktiviert (Hahn *et al.* 1996). Ferner wurden *DPC4* Keimbahnmutationen in Familien mit juveniler Polyposis nachgewiesen (Howe *et al.* 1998). Mutationen in den Tumor-Suppressor-Genen *p53*, *p16^{INK4}* und *DPC4* gelten in den duktaalen Pankreaskarzinomen als so genannte Signaturmutationen, da diese in nahezu 100% aller Pankreaskarzinome entweder einzeln oder in Kombination auftraten (Bardeesy *et al.*, 2002). Das Auftreten dieser Signaturmutationen im zeitlichen Verlauf des Karzinogeneseprozesses beim duktaalen Pankreaskarzinom war ein Gegenstand dieser Arbeit.

1.2.3 Aneuploidie und Krebsentstehung

Schon seit längerem gibt es Bemühungen, die Bedeutung von Aneuploidie für die menschliche Gesundheit zu erfassen und zu bewerten (Dellarco *et al.*, 1985).

Aneuploidie ist die häufigste Art der chromosomalen Abnormität und tritt bei 0,3 % der Neugeborenen und ungefähr 50 % der spontanen Fehlgeburten auf. Sie ist häufigste Ursache für geistige Störungen und der Hauptgrund für Schwangerschaftsabbrüche (Abruzzo und Hassold, 1995).

Untersuchungen zur Häufigkeit und Ursache natürlicher Aneuploidie wurden in den letzten Jahren durch die Entwicklung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungs-Technik (FISH) zur Detektion von Aneuploidie in menschlichen Keimzellen erleichtert (Martin, 1998).

Aneuploide Zellen waren in einem hohen Prozentsatz auch in allen malignen Tumoren zu finden. So wiesen beispielsweise 98% der Karzinome des Gebärmutterhalses eine Abweichung von der normalen Chromosomenzahl auf. Die Frage, ob Aneuploidie eine Folge oder die Ursache von Krebs ist, ist seit langem umstritten (Bialy, 2001).

Bereits vor einem Jahrhundert wurde von Boveri Aneuploidie als Ursache von Krebs diskutiert. Als ein halbes Jahrhundert später nachgewiesen wurde, dass Krebszellen nicht klonal für Aneuploidie, aber klonal für einige Genmutationen waren, wurde diese Theorie aufgegeben und seither wird die Genmutation als Ursache und Aneuploidie als Folge der Krebsentstehung angesehen. Seit einigen Jahren ist jedoch die Aneuploidie wieder in das Zentrum der Untersuchung gelangt und wird immer öfter als die eigentliche Ursache der Krebsentstehung bezeichnet (Castro *et al.*, 2005; Wilkens *et al.*, 2004; Duesberg *et al.*, 2004)

1.2.6 Translokation

Die Tumorgenese ist häufig mit DNA-Rekombinationen assoziiert, die in Deletionen von Tumor-Suppressor-Genen und veränderte Expression oder Amplifikation von Proto-Onkogenen resultieren (Sengstag, 1994). Diese Mutationen haben als Ursache die mitotische nicht homologe Rekombination, d.h. den Austausch zwischen nicht homologen DNA Regionen (Gupta *et al.*, 1997).

Heute ist bekannt, dass balancierte Translokationen auch zu krankmachenden Störungen führen können, indem Proto-Onkogene, die als normale Gene in ihrer angestammten Umgebung häufig für die Kontrolle der Zellproliferation verantwortlich sind, durch Translokationsereignisse (Verbindung mit anderen Genen) in Onkogene umgewandelt werden können. Sie sind die Ursache für die Entstehung von vielen Tumoren und Krebsarten, weil sie in anderer Umgebung eine ganz andere Wirkung erzielen. Ein Beispiel dafür ist die reziproke Translokation zwischen den langen Armen von Chromosom 9 und 22. Dadurch entsteht aus einem Proto-Onkogen ein Onkogen, welches für die unkontrollierte Vermehrung von Leukozyten bei der chronisch myeloische Leukämie (CML) verantwortlich ist. Bei der Pathogenese der Erkrankung spielt eine spezifische Translokation in weißen Blutzellen, eine reziproke Translokation von Stücken zwischen den Chromosomen 9 und 22, die zu einem verkürztem Chromosom 22 führt, dass als Philadelphia-Chromosom bekannt geworden ist, eine wichtige Rolle. Als Resultat der Translokation wurde eine Verschmelzung des ABL Gens von Chromosom 9 mit einem Gen auf Chromosom 22 gefunden. Die Region der Fusion der beiden Genen bekam den Verlegenheitsnamen BCR (*breakpoint cluster region*) (Sowerby *et al.*, 1993; Chisoe *et al.*, 1995). Chronischer B-Zelltumore auch folliculäres Lymphom genannt, wiesen als pathogenetisches Merkmal die chromosomale Translokation t (14;18) (q32;q21) auf (Jaeger *et al.*, 1994). Die Gene die hier verbunden wurden, sind das Gen für die schweren Ketten des Immunglobulins (IgH) auf dem Chromosom 14 und das Gen Bcl-2 auf dem Chromosom 18 (Wyatt *et al.*, 1992).

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob Translokationsprozesse im Zusammenhang mit dem Auftreten der Therapieresistenz beim Prostatakarzinom stehen.

1.3 Theorien zur Entstehung erworbener Hormonresistenz beim Prostatakarzinom

Die molekularen Ursachen der erworbenen Hormonresistenz sind noch nicht geklärt. Es werden verschiedene Mechanismen wie ein *hormon resistant prostate carcinoma* (HRPC) entstehen kann diskutiert.

Ein möglicher Mechanismus, wie der Prostatakrebs die Androgenablation umgeht, wird durch eine Steigerung der Sensibilität der Krebszellen gegenüber sehr niedrigem Androgen Level erreicht (Visakorpi *et al.*, 1995). Dies kann durch erhöhte Androgen-Rezeptor (AR) Amplifikation oder verstärkte Affinität gegenüber Androgenen der ARs erreicht werden. Ein weiterer potentieller Mechanismus, um den Mangel an zirkulierendem Testosteron zu umgehen, ist die Erhöhung der 5- α -Reduktase Tätigkeit, damit mehr Testosteron in das aktivierte Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt wird (Abb. 2a) (Makridakis *et al.*, 1997). Solche Tumore sind nicht komplett Androgen unabhängig, sondern nur an ein sehr niedriges Androgenniveau im Blut adaptiert.

Andere Formen der Androgenunabhängigkeit werden durch Mutationen im AR-Gen erreicht. Diese Mutationen ziehen eine Verringerung der Spezifität des AR nach sich, so dass eine Aktivierung des AR auch von anderen nicht-Androgen Steroiden erreicht werden kann (Abb. 2b *promiscuous pathway*) (Buchanan *et al.*, 2001). Es wird davon ausgegangen, dass Mutationen, die eine Funktionsstörung hervorrufen, relativ häufig auftreten (Feldmann *et al.*, 2001). Des Weiteren können mutierte ARs durch Liganden unabhängige Mechanismen aktiviert werden (Abb.2c *outlaw pathway*) (Gregori *et al.*, 2001). So können z.B. Wachstumsfaktoren wie IGF1 (*insulin-like-growth-factor-1*) und EGF (*epidermal growth factor*) den AR aktivieren und somit Zielgene beeinflussen in Abwesenheit von Androgen \rightarrow *Growth-factor-activated outlaw pathway*. Beim *Receptor-tyrosine-kinase-activated outlaw pathway* erfolgt die Aktivierung des AR über eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase wie z.B. HER-2/neu, die im Zuge der Erkrankung differenziell reguliert sein kann. HER-2/neu aktiviert indirekt eine mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK). Die MAPK ist in der Lage den AR zu aktivieren und so einen Androgen unabhängigen *outlaw* Rezeptor zu generieren. Ein weiterer *outlaw* Mechanismus ist in diesem Zuge die Aktivierung des AR über AKT (Protein Kinase B). Hier führt die Aktivierung einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase, wie HER-2/neu, zu einem Anstieg des Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat durch Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Es konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Tumoren unter Anderem auch in Prostatakarzinomen das Tumor-Suppressor-Gen PTEN inaktiviert vorliegt. Diese Lipid Phosphatase senkt normalerweise PI3K, das ein *second messenger* für AKT darstellt (Culig *et al.*, 1994; Stambolic *et al.*, 1998; Maehama *et al.*, 1999; Graff *et al.*, 2000). Ein Verlust von PTEN bedeutet eine gesteigerte AKT Aktivität, die wiederum das Apoptose Signal hemmt. AKT hat ferner Einfluss auf die Zellzyklus Kontrolle indem es p27 inhibiert (Medema *et al.*, 2000).

Ein vierter Mechanismus (*bypass pathway*) umgeht den AR komplett. So kann z.B. BCL2, das nachweislich in Prostatakarzinomen differenziell exprimiert wird, zur Gewebeproliferation beitragen indem es die Apoptose blockiert (McDonnell *et al.*, 1992) (Abb. 2d).

Der fünfte Pathway geht auf die Anwesenheit von Zell-Populationen zurück, die von Natur aus Androgen unabhängig sind, z.B. epitheliale Stammzellen. Die Gegenwart dieser Zellen kann dazu führen, dass eine Androgensupplementierung versagt. Wenn diese Zellen der Ursprung des Prostatakarzinoms sind, gehen in Abwesenheit von Androgen die androgenabhängigen Zellen zu Grunde, aber die androgenunabhängigen, malignen epithelialen Stammzellen überleben. Dies kann zum Wachstum eines hormonresistenten Tumors führen (Abb: 2e) (Isaacs 1999).

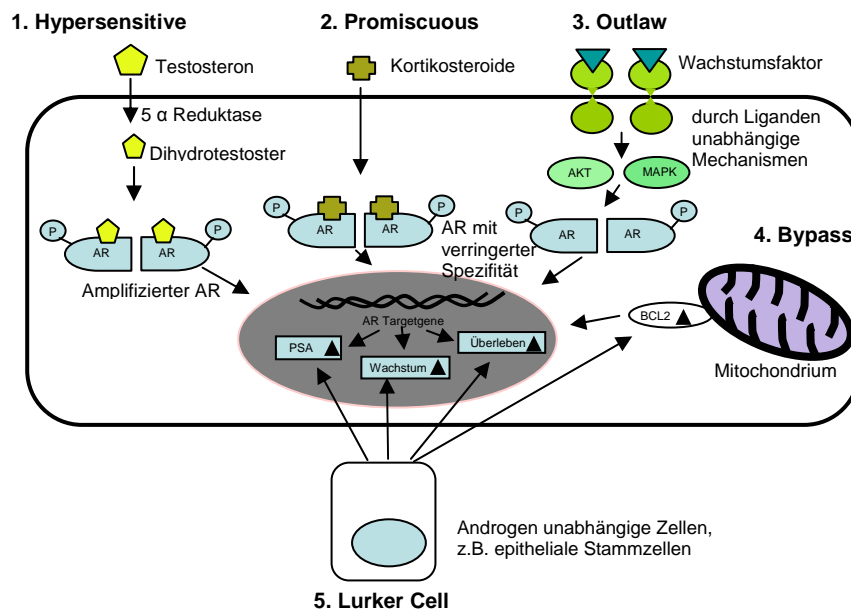


Abb. 2: Fünf mögliche Mechanismen des Androgenunabhängigen Wachstums bei Prostatakarzinomen (nach Feldman *et al.*, 2001)

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchte Gewebe

2.1.1 Das Pankreas

Das Pankreas liegt in Höhe des ersten und zweiten Lendenwirbelkörpers, hinter dem Magen. Die Ventralfläche ist mit Peritoneum überzogen und die Dorsalfläche sekundär mit der hinteren Bauchwand verwachsen. Das Pankreas ist eine gemischt exokrin-endokrine seröse Drüse von etwa 15 bis 20 cm Länge und 60 bis 80 g Gewicht. Es werden drei Anteile unterschieden: Kopf (Caput pancreatis), liegt in der C-förmigen Curvatur des Duodenum. Körper (Corpus pancreatis), liegt vor der Wirbelsäule, in Höhe des ersten und zweiten Lendenwirbelkörpers. Schwanz (Cauda pancreatis), reicht bis zum Milzhilium

Der Hauptausführungsgang der Bauchspeicheldrüse, der Ductus pancreaticus mündet gemeinsam mit dem Gallenausführungsgang, dem Ductus choledochus, auf der Vater-Papille ins Duodenum.

Das Pankreas besteht aus zwei voneinander weitgehend unabhängig arbeitenden Bereichen. Es werden ein exokriner und ein endokriner Anteil unterschieden. Der exokrine Teil produziert ca. 1,5 Liter Pankreassekret pro Tag, der über das Pankreasgangsystem in den Zwölffingerdarm abgegeben wird. Er enthält die Verdauungsenzyme, wie Amylasen, Lipasen und Proteasen.

In ihrem endokrinen Teil produziert das Pankreas in besonderen Strukturen, den Langerhans-Inseln, die Hormone Insulin und Glukagon, die den Blutzuckerspiegel regeln und kontrollieren.

2.1.2 Das duktales Pankreaskarzinom

Das duktales Adenokarzinom ist bei weitem der häufigste im Pankreas diagnostizierte Tumortyp (85-90% der Pankreastumoren)(Cubilla und Fitzgerald, 1984). In der Häufigkeit Tumor bedingter Todesfälle liegt es an fünfter Stelle mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 2-5% (Wadle *et al.*, 2006, Wagner *et al.*, 1999). Operierte Karzinome sind zu 80-90% im Pankreaskopf lokalisiert, da sie früher symptomatisch werden (schmerzloser Ikterus, epigastrische Schmerzen mit Ausstrahlung in den Rücken). Karzinome im Pankreaskörper und -schwanz haben bei Diagnosestellung meist schon metastasiert. Die meisten Pankreaskarzinome sind mäßig bis hoch differenziert und führen zu einer deutlichen desmoplastischen Stromareaktion (derbe Konsistenz). Hochdifferenzierte Tumoren können sehr ähnlich aussehen wie eine chronische Pankreatitis. Im Gegensatz zur Pankreatitis sind die neoplastischen Drüsen verformt oder

rupturiert und zeigen zelluläre Atypien (große polymorphe Kerne mit prominenten Nucleolen). Die Tumordrüsen sind unregelmäßig im Stroma angeordnet und nicht lobulär wie in der Pankreatitis. Nicht selten ist eine Nervenscheideninvasion nachweisbar. Gelegentlich zeigen die Gänge im tumorfreien Parenchym dysplastische Veränderungen oder der Tumor breitet sich intraduktal entlang des Pankreasganges aus. (Bohming *et al.*, 1999) (Abb. 3)

Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen 60 und 70 Jahren. Das Pankreaskarzinom trägt mit seiner extrem schlechten Prognose wesentlich zu den Karzinom bedingten Todesfällen bei. Ein erhöhtes Karzinomrisiko wird beobachtet bei chronischer Pankreatitis, exzessivem Alkoholkonsum, nach partieller Gastrektomie, bei Rauchen und bei fett- und fleischreicher Ernährung. Häufigste Symptome sind ungewollter Gewichtsverlust, Rücken- oder Abdominalschmerzen und Ikterus.

Diagnostik: Sonographie, Abdomen CT, ERCP, Probelaparotomie oder Laparoskopie finden in der Diagnostik Anwendung.

Therapie: Eine Operation in kurativer Absicht ist nur bei 10-15% der Patienten möglich. Als palliative Eingriffe zur Therapie der Cholestase werden biliodigestive Anastomosen oder endoskopische Stenteinlagen vorgenommen.

Die frühe Erkennung eines Pankreaskarzinoms ist entscheidend. Eine wirksame Früherkennung, ähnlich bei Tumoren des endoskopisch gut einsehbaren oberen und unteren Gastrointestinaltrakts, existiert für das Pankreaskarzinom nicht.

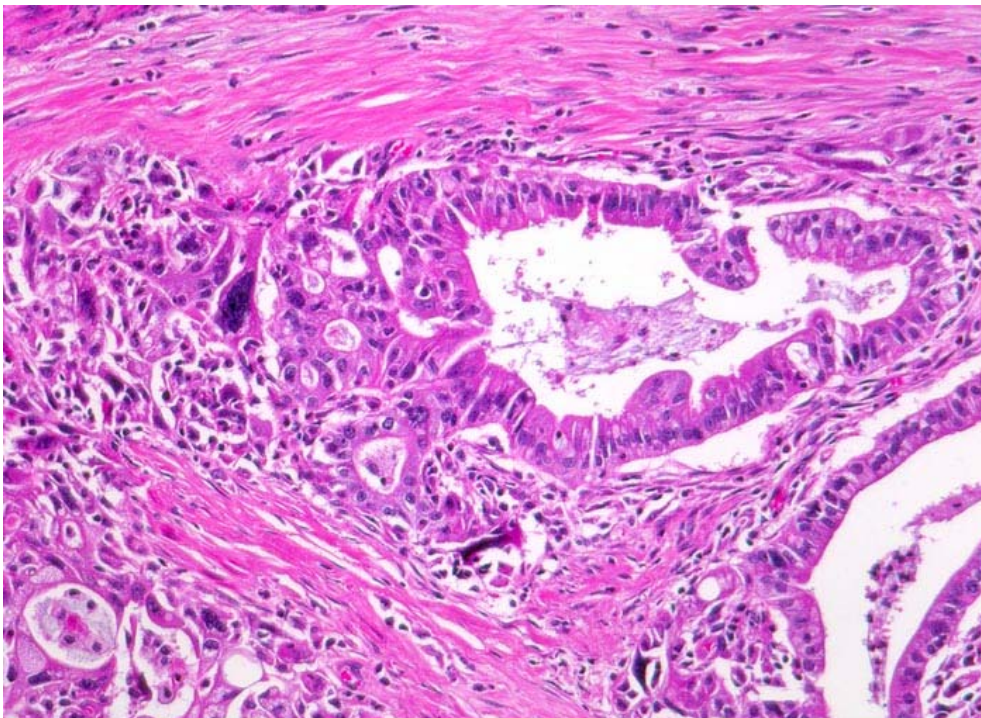


Abb. 3: Duktales Pankreaskarzinomgewebe. Unregelmäßige Anordnung der Drüsen (keine Läppchenarchitektur erkennbar). Teils kribriforme Tumordrüsen mit ausgeprägten Zellatypien und Kerngrößenschwankungen. Ein Teil der Drüsenlumina enthält nekrotische Tumorzellen. Die Tumorinfiltrate liegen eingebettet in reichlich desmoplastisches Stroma. (HE, 200x)

2.1.3 Die Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis ist eine meist über Jahre und Jahrzehnte verlaufende destruktive chronisch-entzündliche Erkrankung, welche nach wiederholter Schädigung des Pankreasgewebes entsteht. Es kommt hierbei histologisch zur Destruktion von Ausführungsgängen, zur Schädigung der Azini gefolgt von einem schleichenden narbigen Umbau des Pankreasgewebes. Unter wechselnder Schmerzsymptomatik kann das zu einer irreversiblen Schädigung des Organs mit der Folge einer exokrinen und endokrinen Insuffizienz führt. Die chronische Pankreatitis tritt pro Jahr als behandlungsbedürftige Erkrankung bei etwa 4 bis 8 Fälle/100.000 Personen auf (Klöppel *et al.*, 2005).

Zu den ätiologischen Risikofaktoren gehören toxisch-metabolische Prozesse, wie übermäßiger Alkoholkonsum. Etwa 80 % der chronischen Pankreatitiden sind alkoholtoxisch bedingt. Weitere seltene Ursachen sind genetische Erkrankungen, speziell Mutationen im kationischen Trypsinogen Gen (*PRSS1*), dem pankreatischen Trypsininhibitor Gen (*SPINK1*) oder dem *CFTR* Gen bei zystischer Fibrose. Hierdurch kommt es zu einer vermehrten Autoaktivierung von Trypsinogen im Gewebe. Weitere Ursachen sind autoimmune Prozesse, anatomische Varianten mit Abflussstörung, Hypercalzämie und idiopathische Ursachen (Whitcomb *et al.*, 1996; Witt *et al.*, 2000; Etemad *et al.*, 2001; Klöppel *et al.*, 2005).

Die Assoziation zwischen dem langjährigen Bestehen einer chronischen Pankreatitis und der Entstehung eines Pankreaskarzinoms wird seit über 50 Jahren diskutiert (Comfort *et al.*, 1954). Große epidemiologische Studien haben das Bestehen einer chronischen Pankreatitis als signifikanten Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms belegt, wobei das Risiko nach 10 Jahren etwa 1,8% beträgt und sich nach 20 Jahren auf etwa 4% steigert (Lowenfels *et al.*, 1993, 1997). Ferner wurde auch beim Vorliegen anderer hereditär bedingter chronischer Pankreatitiden ein deutlich erhöhtes Risiko (bis 40%) zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms gefunden (Howes *et al.*, 2000). Als hypothetischer pathogenetischer Mechanismus wird eine chronische zelluläre Dysfunktion, Entzündung und ein gesteigerter Zellumsatz bei erhöhter Proliferationsrate diskutiert (Lowenfels *et al.*, 1993; Bardeesy und DePinho 2002). Erhöhte Proliferationsraten normaler Zellpopulationen fördern sehr wahrscheinlich die Entstehung von Tumoren (Preston-Martin *et al.*, 1990). Das duktales Pankreaskarzinom ist tatsächlich sehr häufig mit einer chronischen Pankreatitis im nicht Karzinom befallenen Gewebe assoziiert, wobei dies jedoch auch durch eine Obstruktion des Gangsystems durch den Tumor bedingt sein kann. Ausgehend von diesen Daten wäre es von großem Wert, einen verlässlichen, einfachen und möglichst nicht invasiven Screening Test, zur Überwachung dieser Patientenpopulation zu besitzen. Dies ist bisher nicht der Fall (Howes *et al.* 2000).

Histologisch können sowohl in Geweben mit Pankreaskarzinom als auch in Geweben mit chronischer Pankreatitis klonale Neoplasien, so genannte Vorläuferläsionen, gefunden

werden. Diese Läsionen, so genannte **Pancreatic Intraepithelial Neoplasias (PanIN)**, weisen zusätzlich Kennzeichen einer Atypie auf, wie nukleäre Pleomorphismen und Hyperchromasie (Hruban *et al.*, 2001).

PanINs sind papilläre oder flache nicht invasive epitheliale Neoplasien in den Pankreasgängen. Sie sind charakterisiert durch kubisches bis zylindrisches Epithel mit variablem Muzingehalt sowie variablen zytologischen und architektonischen Atypien. PanINs sind in der Regel in Gängen von weniger als 5 mm im Durchmesser zu finden und somit zumeist makroskopisch und klinisch nicht zu erkennen. Diese Tatsache ist insbesondere für die Früherkennung von PanINs von Bedeutung.

2.1.4 Das Kolon

Das Kolon besteht aus vier Abschnitten: Dem etwa 25 cm langen im rechten Bauchraum aufsteigenden *Colon ascendens*, dem im linken Bauchraum absteigendem ca. 30 cm langen *Colon descendens* und dem zwischen diesen beiden Abschnitten liegenden 50 cm langen Querdickdarm (*Colon transversum*).

Die Aufgabe des Dickdarms besteht in der Eindickung des verdauten Nahrungsbreis durch Wasserentzug und der Rückresorption von Mineralsalzen, sowie der Bildung von Transportschleim und die Ausscheidungsfähigkeit für Schwermetalle und Phosphate. Die Gliederung der Darmwand erfolgt in vier Schichten: 1. der Tunika mucosa mit einem einschichtigen hochprismatischen Epithel (*Lamina epithelialis mucosae*) mit eingelagerten Becherzellen, die vom Schleimhautbindegewebe (*Lamina propria*) unterlagert ist. Dieses wird von einer dünnen Schicht glatter Muskulatur umhüllt (*Lamina muscularis mucosae*). Die Dickdarmschleimhaut bildet keine Zotten aus, wie sie im Dünndarm zu finden sind, sondern besitzt kurze, gerade und unverzweigte Drüsenschläuche (Krypten). Außerdem zeigen die Saumzellen des Epithels einen deutlichen Bürstensaum als Ausdruck der stattfindenden Resorption. 2. Der Tunika submucosa, bestehend aus einer lockeren Verschiebeschicht mit Nerven und Gefäßen. 3. Der Tunika muscularis mit einer inneren Ring- und einer äußeren Längsmuskelschicht. 4. Der Tunika serosa, welche ein Überzug des visceralen Blattes des Peritoneums darstellt.

2.1.5 Das Kolonkarzinom

Etwa 90% der kolorektalen Karzinome entwickeln sich aus gutartigen Kolonschleimhautadenomen durch Akkumulation bestimmter genetischer Veränderungen: Adenom-Karzinom Sequenz (chromosomale Instabilität). Die Entwicklung des Kolonkarzinoms ist durch aufeinander folgende Mutationsschritte gekennzeichnet. Die Mutation des *APC* Gens (*adenomatous polyposis coli-suppressor gene*) ist der erste Schritt in der Progression vom Adenom zum Karzinom. Bei der familiären Polyposis coli liegt eine Keimbahnmutation des *APC* Gens vor. In der Folge

kommt es zu Mutationen des K-ras Gens, des *p53* Gens und schließlich zu Deletionen von Chromosom 18q. Ein zweiter Entstehungsweg von Kolonkarzinomen, der sich beim HNPCC (*hereditary non polyposis colorectal cancer syndrome*) Syndrom aber auch bei einem Teil der nicht hereditären Karzinome findet, ist der Ausfall eines Mismatch Repair Gens (Mutator Pathway). Wegen des Ausfalls des Reparaturgens werden spontane somatische Mutationen nicht mehr repariert. Insertionen und Deletionen akkumulieren und führen so zu einer genomischen Instabilität. Der Verlust eines Reparaturgens ist immunhistochemisch feststellbar. Die daraus resultierende Mikrosatelliteninstabilität kann der Molekularpathologie nachweisen. Die Indikation für eine molekulargenetische Weiterabklärung ist dann gegeben, wenn der Patient die Bethesda Kriterien erfüllt (anamnestische, klinische und pathologische Merkmale).

Die meisten Adenokarzinome des Kolons bilden Drüsen mit hochprismatischem Epithel. Die Drüsenlumina enthalten oft nekrotischen Detritus und variable Mengen von Schleim. Der intraluminale Detritus findet sich oft auch in den Metastasen und gibt einen morphologischen Hinweis auf den Primärtumor. Es gibt verschiedene histologische Subtypen wie muzinöse Karzinome, Siegelringkarzinome, medulläre Karzinome oder adenosquamöse Karzinome. Bestimmte Befunde weisen auf mikrosatelliteninstabile Tumoren hin: Wenig differenziertes medulläres Karzinom, zwei oder mehr morphologische Muster nebeneinander, Vermehrung der intra- und peritumoralen Lymphozyten, Lokalisation des Tumors im rechtsseitigen Kolon.

Die Inzidenz ist deutlich erhöht in Ländern wie USA, Australien und Westeuropa im Vergleich zu Asien, Afrika und Südamerika. Darmkrebs ist in Deutschland bei Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung (16,7 %), bei Männern die dritthäufigste (16,1 %). Jährlich erkranken über 27.000 Männer und ca. 30.000 Frauen neu an Darmkrebs. In Deutschland blieben die Neuerkrankungsraten für Männer und Frauen in den letzten 20 Jahren etwa konstant. Die altersstandardisierte Inzidenz je 100.000 (Europabevölkerung) an bösartigen Neubildungen des Kolons beträgt etwa 47,1 für Männer pro Jahr und etwa 30,3 für Frauen pro Jahr. Die altersstandardisierte Inzidenz je 100.000 (Europabevölkerung) an bösartigen Neubildungen des Rektums beträgt etwa 30,9 für Männer pro Jahr und etwa 18,4 für Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter für Darmkrebs beträgt bei den Männern 67, bei Frauen 72 Jahre. Darmkrebs ist bei Frauen mit 15,4 % und bei Männern mit 12,6 % die zweithäufigste Krebstodesursache. Die altersstandardisierte Mortalität je 100.000 (Europabevölkerung) an Kolonkarzinomen betrug 1997 für Männer ca. 21,3 und für Frauen ca. 15,3. Für Rektumkarzinome lag sie bei 10,8 für Männer und bei 5,9 für Frauen (Krebsregister Saarland, 1998).

Risikofaktoren sind Alter, fett- und cholesterinreiche Ernährung, entzündliche Darmerkrankungen (vor allem Colitis ulcerosa), vorausgegangenes Kolonkarzinom, Alkoholabusus >45g/Tag. (Giovannucci *et al.*, 1993). Eine besondere Korrelation scheint

zwischen dem Auftreten von Rektumkarzinomen und Bierkonsum zu bestehen. Biertrinker, ab einem Genuss von 15 oder mehr Litern pro Monat, haben ein 1,3 bis 1,9fach erhöhtes Risiko (Carstensen *et al.* 1990).

Protektiv wirken Früchte, Gemüse, körperliche Aktivität und die Einnahme nicht steroidaler Antirheumatika. Das Risiko für ein Kolonkarzinom beginnt ab einem Alter von 40 Jahren zu steigen. Bei Patienten <50 Jahre muss an die Möglichkeit einer genetischen Prädisposition gedacht werden. Eine genaue Familienanamnese ist deshalb wichtig. Bei 5-10% der Patienten besteht eine autosomal-dominant erbliche Veranlagung. Dazu gehören das HNPCC (*hereditary non polypous colorectal cancer*)-Syndrom = Lynch Syndrom, die familiäre adenomatöse Polyposis und verschiedene hamartomatöse Polyposen. Kolonkarzinome können lange asymptomatisch sein. Am häufigsten klagen die Patienten über Bauchschmerzen, oder veränderte Stuhlgewohnheiten. Bei 30% sind okkulte Blutungen nachweisbar und 15% der Patienten haben eine mechanische Obstruktion. Rechtsseitige Tumoren sind meist größer und tendieren zu Blutungen. Linksseitige Tumoren führen eher zu einer Obstruktion. Als Screeninguntersuchung zur Frühdiagnose wird die Durchführung einer Koloskopie alle 10 Jahre ab dem 50. Altersjahr empfohlen. Bei hereditären Tumoren oder nach vorausgegangenem kolorektalem Karzinom sind häufigere Koloskopien indiziert.

Die chirurgische Therapie des Kolonkarzinoms unter kurativer Zielsetzung besteht in der Resektion des tumortragenden Kolonsegmentes mit dem regionalen Lymphabflussgebiet, gegebenenfalls unter Mitentfernung adhärenter Organe. Die Resektion von (syn- und metachronen) Fernmetastasen (Leber, Lunge, u.a.) in kurativer Absicht ist indiziert, sofern eine vollständige Resektion möglich und das Risiko des Eingriffs vertretbar ist. Durch die Einführung zahlreicher neuer Medikamente konnte in den letzten Jahren das Überleben auch bei fortgeschrittenen Tumoren deutlich verbessert und können einen Teil der Lokalrezidive verhindern. Bei Patienten mit familiärer Polypose, multiplen Adenomen oder Karzinom bei Colitis ulcerosa wird eine totale Kolektomie vorgenommen.

Die Prognose hängt ab vom Tumorstadium, von der Anzahl untersuchter Lymphknoten (je mehr Lymphknoten untersucht werden, desto besser die prognostische Aussagekraft), Vollständigkeit der Resektion, präoperativer CEA Wert.

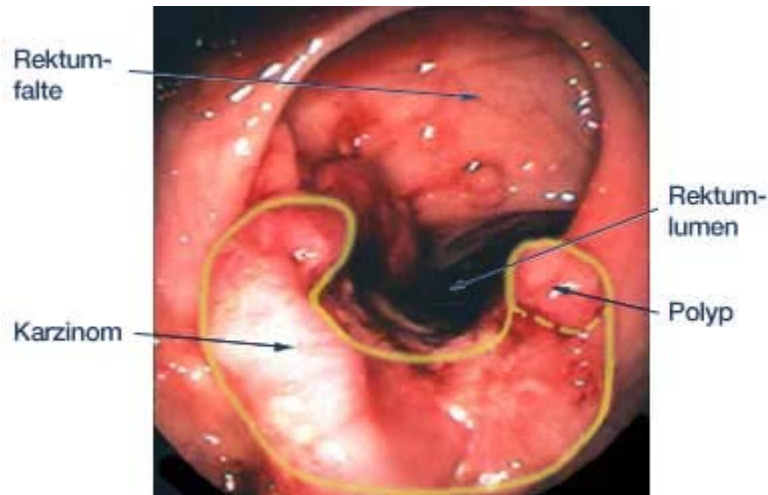


Abb. 4: Kolorektalkarzinom (gelbe Linie)
 Polyp (gelb gestichelte Linie)
<http://www.m-ww.de/krankheiten/krebs/darmkrebs.html>

Grundsätzlich kann ein Tumor in jedem Darmabschnitt entstehen. Maligne Tumore entwickeln sich dabei hauptsächlich aus der Darmschleimhaut (Tunica mucosa). Hinsichtlich ihrer Häufigkeit, der Behandlung und der Prognose unterscheiden sich die Karzinome in den genannten Regionen zum Teil erheblich voneinander. Tumoren im Dünndarm sind außerordentlich selten, während Kolonkarzinome und Rektumkarzinome (zusammengefasst kolorektale Karzinome) sehr häufig sind. Karzinome im Analbereich machen nur etwa zwei Prozent aller Darmkarzinome aus (Abb. 5)

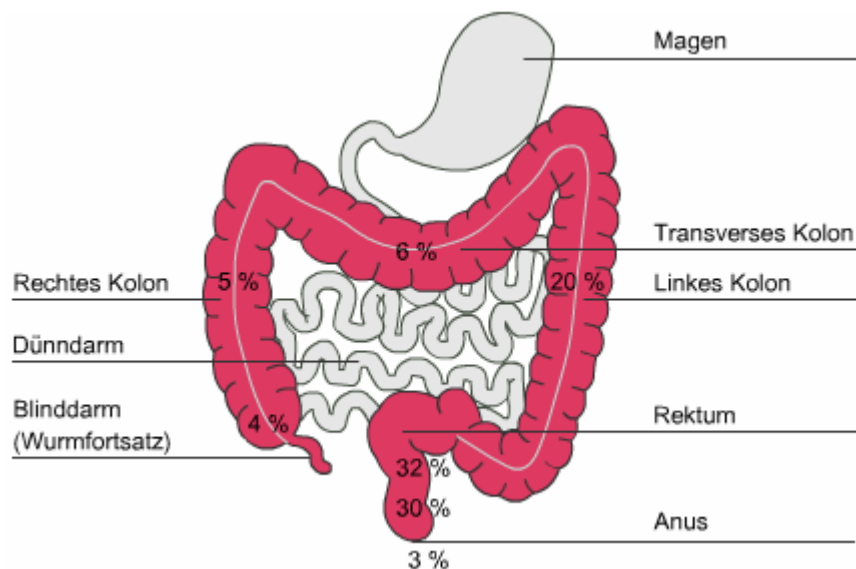


Abb. 5: Prozentuale Verteilung der Darmkrebslokalisationen. Jena Pharm 2007

Die meisten kolorektalen Karzinome entwickeln sich aus Adenomen (Darmpolypen) im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz. Unter diesem Begriff wird eine regelhafte Abfolge von Veränderungen der Kolonschleimhaut normaler Morphologie über eine niedriggradige und hochgradige Dysplasie bis hin zum invasiven Karzinom

zusammengefasst (Jackman *et al.*, 1951; Hermanek 1992; Morson 1974). Vogelstein *et al.* (1988) haben ein genetisches Modell der sequentiellen Akkumulation genomischer Läsionen bei der Genese eines kolorektalen Karzinoms entwickelt. Dieses Modell beruht auf der Erkenntnis, dass kolorektale Karzinome unter anderem aus der Aktivierung von Onkogenen in Kombination mit einer Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen entstehen. Ferner sind Mutationen in mindestens fünf Genen notwendig, wobei die Akkumulation der Mutation und nicht die zeitliche Abfolge entscheidend für den malignen Phänotyp des Tumors ist. Des Weiteren ist bekannt, dass mutierte Tumor-Suppressor-Gene in einigen Fällen auch im heterozygoten Status Einfluss auf den Phänotyp der Zelle haben. Außerdem sind kolorektale Karzinome monoklonalen Ursprungs, d.h. sie entstehen durch klonale Expansion einer Zelle (Fearon *et al.*, 1990). Es werden bis heute zwei verschiedene Grundmechanismen der Entstehung kolorektaler Karzinome beschrieben:

1. Der so genannte *gatekeeper pathway* (Kinzler *et al.*, 1995), der der von Vogelstein *et al.* Beschriebenen Akkumulation von Mutationen von Proto-Onkogenen wie z.B. *K-ras*, *MYC*, *ERB* und *SRC* und Tumor-Suppressor-Genen wie *APC*, *MCC*, *p53* und *Nm32* sowie einer Veränderung epigenetischer Regulationsmechanismen der Genexpression, wie z.B. die der DNA-Methylierung (Fearon *et al.*, 1990; Herman *et al.* 1995).

2. Der als *caretaker pathway* bezeichnete Mechanismus (Kinzler *et al.*, 1997) basiert auf einer Mutation eines *mismatch-repair*-Gens (*msh1*, *msh3*, *msh6*, *mlh1*, *pms1*, *pms2*), die während der Replikation entstandene Basenfehlpaarungen beheben. (Bronner *et al.*, 1994; Fishel *et al.*, 1993, Ikeda *et al.*, 1998). Dieser Zustand wird als *replication error positive* (REP+) bezeichnet. Bei einer Inaktivierung der *mismatch-repair*-Gene akkumulieren Mutationen in der Zelle, wodurch sich ein maligner Zellphänotyp entwickelt. Diese beiden Mechanismen sind nicht streng voneinander getrennt zu betrachten, denn es sind verschiedene Überschneidungen bekannt. So scheint z.B. das APC Protein auch die Fähigkeit zu besitzen als *caretaker* zu agieren und DNA-*mismatch-repair*-Gene scheinen direkten Einfluss auf die Zellproliferation zu haben (Fishel *et al.*, 1998, 2001; Fodde *et al.*, 2001). Es gibt außerdem alternative oder ergänzende Konzepte wie den *serrated pathway* bei dem eine Inaktivierung von verschiedenen Genen durch eine Methylierung in den Vordergrund gestellt wird (Jass *et al.*, 2002).

Die Charakteristika der Entstehung von Kolonkarzinomen sind in Abb. 6 dargestellt.

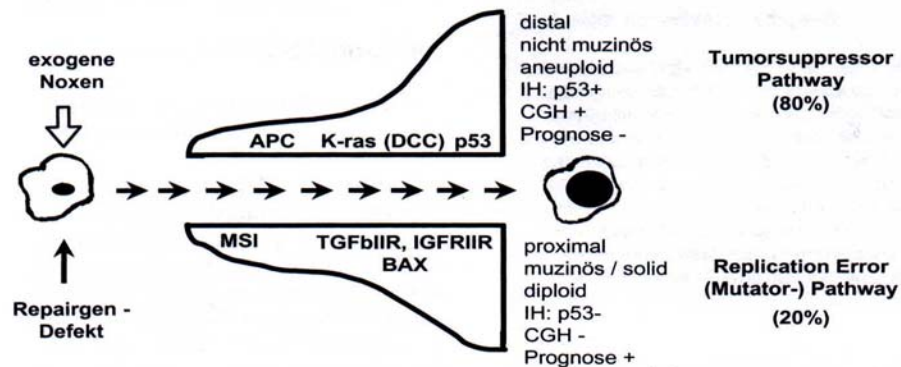


Abb. 6: Karzinogenese-Stadien beim kolorektalen Karzinom. Oben: Stadien der Tumorentstehung bei sporadischen CRC (Tumor-Suppressor *Pathway*). Ausgangspunkt ist eine Mutation im *APC*-Gen, gefolgt von weiteren Funktionsverlusten in Zellzyklus regulierenden Genen (*DCC*, *K-ras*, *p53*). Unten: Tumorstadien bei MMR-Defizienz als Entstehungsursache beim *replication error pathway*. Ausfall von MMR-Genen bewirkt MSI gefolgt von weiteren Gen-Ausfällen. Beschleunigte Tumorentstehung ohne eine gegenüber dem klassischen *Pathway* erhöhte Wachstumsrate (Vogelstein *et al.*, 1988).

2.1.6 Die Prostata

Die Prostata, ist eine muskuläre, ca. vier Zentimeter große walnussförmige Drüse. Sie sitzt direkt unterhalb der Harnblase und umschließt dort ringförmig die Harnröhre. Ihr Sekret bildet den Großteil der Samenflüssigkeit und stimuliert die Beweglichkeit der Spermien. Der Prostatakrebs entsteht meist aus dem Drüsengewebe. Bei einem zwanzigjährigen Mann wiegt die Prostata etwa 20 Gramm. Ihr Gewicht nimmt im Laufe des Lebens zu und kann auf über 100 Gramm anwachsen. Sie liegt zwischen der Harnblase und dem Beckenboden, der hier den äußeren Schließmuskel der Harnröhre bildet. Hinter ihr befindet sich der Mastdarm, vor ihr der Unterrand des Schambeins, mit dem sie fest verbunden ist. Die Prostata besteht aus zahlreichen Drüsen, gefäßreichem Bindegewebe und Muskelfasern, eingehüllt in eine feste, bindegewebige Kapsel. Die Drüsen werden nach ihrer Lage in Außen- und Innendrüsen eingeteilt, ihre Ausführungsgänge münden einzeln in die Harnröhre neben dem Samenhügel. Der Samenleiter und der Ausführungsgang der Samenblase bilden zusammen das Spritzkanälchen, das die Prostata durchzieht und auf dem Samenhügel mündet

2.1.7 Das Prostatakarzinom

Typischerweise sind Prostatakarzinome in der Außenzone der Prostata lokalisiert. Makroskopisch imponieren sie als periphere, gelbe, harte Areale. Histologisch ist das Karzinom meist drüsig aufgebaut. Das Ausmaß der Drüsenbildung ist wichtig für die Bestimmung des Differenzierungsgrades nach Gleason. Der Differenzierungsgrad ist von prognostischer Bedeutung. Das Fehlen von Basalzellen im Karzinom und der Nachweis von basophilem intraluminalem Sekret ist wichtig für die Abgrenzung gegen normale und

präkanzeröse Prostata. Basalzellantikörper helfen das Fehlen oder Vorhandensein von Basalzellen besser zu beurteilen und somit die Karzinomdiagnose zu erleichtern. Häufig zeigen Karzinomzellen prominente Nucleolen. Die Herkunft eines metastasierenden Adenokarzinoms aus der Prostata lässt sich immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Prostata spezifisches Antigen (PSA) und Prostata spezifische saure Phosphatase (PSAP) beweisen.

In mehreren Studien ist eine Assoziation zwischen fettreicher, faserarmer Ernährung und Prostatakarzinom-Inzidenz nachgewiesen worden (Walsh *et al.*, 2000; Whittemore *et al.*, 1995). Bei Ostasiaten, deren Ernährung auf Sojaprodukte, Reis und Gemüse basiert ist die Inzidenz sehr gering. Ein Erklärungsansatz basiert auf dem in dieser Nahrung reichlich enthaltenen Phytoöstrogen (Isoflavonoide, Lignane) das 5- α -Reduktase enthält und damit die Konvertierung des Testosterons in seine aktiven Metaboliten hemmt.

Die Familienanamnese eines Prostatakarzinoms erhöht das Risiko der Erkrankung um das 3- bis 6fache (Bratt 2000). Das Risiko steigt auf das 9fache an, wenn bei Blutsverwandten 1. und 2. Grades ein Prostatakarzinom auftrat (Steinberg *et al.*, 1990). Symptome fehlen lange. In Spätstadien kommt es zur Obstruktion der Harnwege mit Hydronephrose und Urosepsis. Knochenmetastasen verursachen Schmerzen und pathologische Frakturen.

Die Diagnosestellung erfolgt durch Nadel- (Core) Biopsie bei Patienten mit erhöhtem PSA im Serum. Problematisch ist die heute einfacher gewordene Frühdiagnose, da dank PSA Bestimmung zahlreiche klinisch nicht relevante Tumoren entdeckt und gelegentlich überbehandelt werden. Wenn der Tumor organbegrenzt ist, kann eine radikale Prostatektomie in kurativer Absicht durchgeführt werden. Eine Strahlentherapie kann sowohl in Frühstadien als auch bei fortgeschrittenen Karzinomen zur Anwendung kommen.

Wichtig für die Prognose sind Tumorstadium und Differenzierungsgrad (Gleason siehe Material und Methoden). Weiter prognoserelevant ist die Wachstumsgeschwindigkeit (Ki67 Labeling Index) sowie die Expression gewisser Onkogene z.B. *bcl2* oder Tumor-Suppressor-Gene wie *p53* durch die Tumorzellen.

Die Therapie richtet sich nach der Art und Ausbreitung des Tumors. Zur Bezeichnung der Tumorstadien wird die internationale TNM-Klassifikation verwendet (siehe Material und Methoden). Drei Merkmale des Tumors sind darin zur Stadieneinteilung wichtig: Die Tumorgroße, die Zahl der von Metastasen betroffenen Lymphknoten sowie das Vorhandensein von Tochtergeschwülsten in anderen Organen (Fernmetastasen).

Es gibt folgende Möglichkeiten der Hormontherapie:

- Unterdrückung der Bildung von Testosteron durch Kastration; möglich sind die chirurgische Entfernung des Hodengewebes unter Belassung der Hodenkapsel sowie eine medikamentöse Kastration mit LHRH-Antagonisten

- Blockade der Wirkung von körpereigenen Geschlechtshormonen an den Tumorzellen durch die Gabe von Antiandrogenen
- Gabe von weiblichen Geschlechtshormonen (Östrogenen), um dem männlichen Testosteron entgegenzuwirken
- Chemotherapie

Zu den unterschiedlich stark ausgeprägten Nebenwirkungen einer Hormontherapie zählen Libidoverlust, Erektionsschwierigkeiten, Hitzewallungen, mentale Beeinträchtigung, nachlassender Bartwuchs und häufig schmerzhaften Brustschwellungen.

Bei Hormon resistenten Prostatakarzinomen ist der Tumor nicht bzw. nicht mehr für Hormone sensibel und die Blockade von Testosteron daher keine Wirkung hat, kann bei 30-50% dieser Fälle durch die Einnahme eines Zytostatikums (Chemotherapie) Besserung erzielt werden.

Der äußere Drüsenanteil der Prostata und Prostatakrebszellen sind von Androgen abhängig, um wachsen und überleben zu können. Androgene sind die wichtigsten Regulatoren für das Verhältnis zwischen der Zellproliferation und dem Zelltod.

Der größte Teil des im Blut zirkulierenden Androgens ist Testosteron, welches überwiegend von den Leydigzellen des Hodens gebildet wird. Hier ist das Testosteron fast ausschließlich an Albumin und Sex-Hormon-bindendes-Globulin (SHBG) gebunden. Wenn das Testosteron in die Prostatazellen eintritt werden 90% des Testosterons vom Enzym 5- α -Reduktase (SRD5A2) in Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. DHT hat eine sehr viel höhere Bindungsaffinität zum Androgenrezeptor (AR) als Testosteron. Der AR besteht aus einer Aktivierungsdomäne, einer Ligand-bindenden-Domäne und einer DNA-bindenden-Domäne. Ebenso wie andere Rezeptoren ist der AR im inaktiven Zustand an Heat-shock-proteine (HSP) gebunden, die ein Binden an die DNA verhindern. Das Binden von DHT an den Androgenrezeptor hat eine Dissoziation des AR vom HSP zur Folge.

Der dimerisierte AR kann allein oder zusammen mit Co-Aktivatoren wie z.B. ARA70 an den androgenspezifischen Promotorsequenzen binden. Die Aktivierung oder Repression der Ziel-Gene hat eine biologische Antwort, wie z.B. Wachstum, Erhaltung der Zelle oder die Produktion von Prostata spezifischen Antigenen (PSA) zur Folge (Abb. 7).

Die primäre Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms besteht in der Androgenablation, die chirurgisch und medikamentös erreicht werden kann. Durch die Androgenablation wird die Rate der Zellvermehrung reduziert und das Sterben der Zellen erhöht sich. Diese antihormonelle Therapiestrategie erreicht bei mehr als 75% der betroffenen Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung. Nach etwa 18 Monaten entwickeln nahezu alle Patienten eine hormonrefraktäre Progression ihrer Krankheit (Hormon resistentes Prostatakarzinom, HRPC). Diese Androgen- Unabhängigkeit hat zur Folge, dass die Anti-Androgen Behandlung nicht mehr anspricht und es somit keine effektive Behandlungsmethode für das HRPC gibt (Messing *et al.*, 2006).

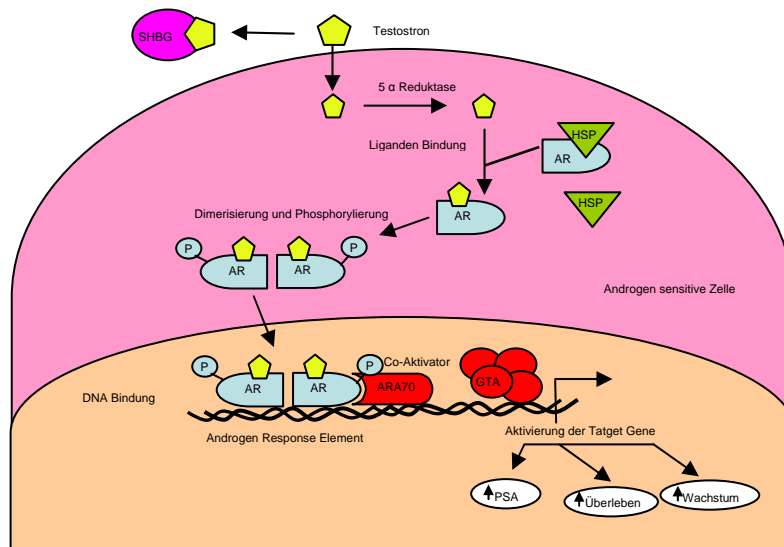


Abb. 7: Androgen Wechselwirkung in einer Androgen sensitiven Zelle (nach Feldman *et al.*, 2001)

2.1.8 Die Benigne Prostatahyperplasie

Bei der benignen, nodulären Prostatahyperplasie (BPH) handelt es sich um eine mit knotigem Umbau einhergehende Vergrößerung der Drüse bei hormoneller Dysbalance im Alter des Mannes. Die Inzidenz der Prostatahyperplasie nimmt mit dem Alter so stark zu, dass fast alle Männer die das 70. Lebensjahr erreichen, davon betroffen sind. Davon ist aber nur die Hälfte wirklich behandlungsbedürftig.

Die Prostatahyperplasie beruht kausalpathogenetisch auf einer Testosteron-Östrogen-Dysbalance infolge einer Hormonverwertungsstörung in der Prostata. Dabei kommt es aus noch unbekannter Ursache zu einer Aktivitätszunahme der 5- α -Reductase im Prostatastroma und dadurch wiederum zur unphysiologischen Anhäufung des androgenen Wirkungsvermittlers Dihydrotestosteron und seines Metaboliten Androstendiols sowie 17- β -Östradiol. Beide führen synergetisch zur Stromaproliferation mit Aktivierung der glatten Muskelzellen. Die unterschiedlichen Grade der teils fibromuskulären, teils glandulären Hyperplasie sind die Folgen einer Stoffwechselantwort der Prostata auf Östrogen-, Dihydrotestosteronmetabolite. Eine enge Verknüpfung der Geschlechtshormon-Dysbalance und der Prostatahyperplasie zeigt sich auch in der Beobachtung, dass sich bei präpubertären Kastraten keine, bei Krypochismus, Leberzirrhose oder sexuell sehr aktiven Männern selten eine Prostatahyperplasie entwickelt (Albrecht, 2004). Die Proliferation des Prostatagewebes betrifft vor allem die kranial-zentrale Zone der Prostata, wodurch der peripher-kaudale Teil kapselförmig komprimiert wird. Dies erklärt warum es zu einer frühzeitigen Kompression der Urethra und zur Harnabflussstörung kommt. Häufig bildet sich median am Harnröhreneingang ein in die Harnblase ragender hyperplastischer Knoten (Abb. 8).

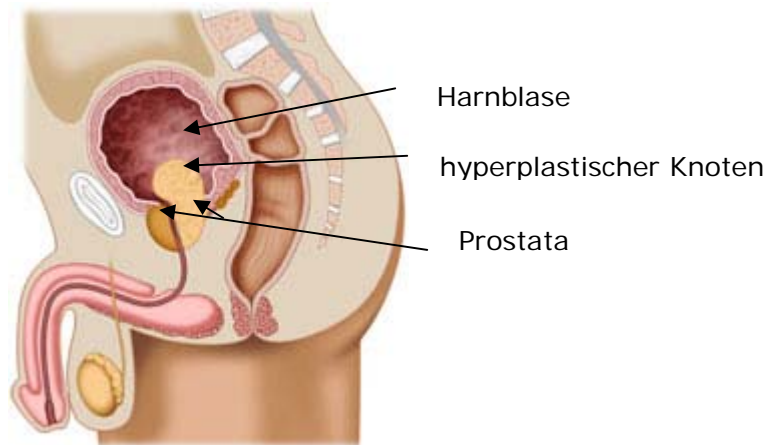


Abb. 8: Anatomischer Querschnitt durch das männliche Becken
www.medizin.de/gesundheit/deutsch/377.htm

Dieses knotenförmig angeordnete hyperplastische Prostatagewebe, führt zu einem Sekretstau mit retentions-zystischem Drüsenumbau. Dabei kann in manchen Knoten die Proliferation glatter Muskelzellen in Form myomartiger Wucherungen überwiegen. Obwohl die sekretorische Aktivität der neu gebildeten Drüsen vermindert ist, gleichen die hyperplastischen eher den präexistenten Drüsen. Durch den Wachstumsdruck des wuchernden Prostatagewebes werden unter Umständen Gefäße so komprimiert, dass es zu ischämischen Nekrosen kommt (Prostatainfarkt)

Die Erschwerung des Harnabflusses durch die knotig vergrößerte Prostata führt zu einer kompensatorischen Hypertrophie der Harnblasenmuskulatur in Form einer so genannten Balkenharnblase mit Pseudodivertikeln. Hinzu kommen rezidivierende Infektionen der Harnblase, Urethren und Nieren mit unter Umständen lebensbedrohlicher Urosepsis oder Urämie wegen Hydronephrose und Schrumpfnieren. Es kann bei einem Teil der betroffenen Männer dabei zu einer Kompression der Harnröhre kommen. Dies führt zu einem erhöhten Blasenaustrittswiderstand, welcher wiederum zu erhöhtem Blasendruck und Restharnbildung führt.

2.2 Tumorbeurteilungskriterien

2.2.1 TNM-Klassifikation

T (Tumor)

T bezeichnet die Ausdehnung des Primärtumors.

- T0: keine Anzeichen eines Primärtumors oder der primär Tumor ist unbekannt (*CUPS, cancer of unknown primary*).

- Tis/Ta: Tumore, die die Basalmembran noch nicht infiltriert haben. Ihre Prognose ist im Allgemeinen günstig.
- T1, 2, 3 oder 4: zunehmende Größe des Primärtumors oder Befall weiterer Gewebe, z.B. für Brustkrebs:
 - T1: größte Tumorausdehnung höchstens 2 cm
 - T2: größte Tumorausdehnung mehr als 2 cm, aber höchstens 5 cm
 - T3: größte Tumorausdehnung mehr als 5 cm
 - T4: Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf die Brustwand oder Haut
- TX: keine Aussage über den Primärtumor möglich.

Ta gibt es nur bei bestimmten Organen (Nierenbecken und Harnleiter, Harnblase, Harnröhre, Penis). Dort können Ta-Tumoren mit einer besseren Prognose als Tis Tumoren verbunden sein.

N (Nodus)

N beschreibt das Vorhandensein bzw. das Fehlen von regionären Lymphknotenmetastasen.

- N0: keine Anzeichen für Lymphknotenbefall.
- N1, 2 oder 3: zunehmender Lymphknotenbefall. Einteilung z.B. nach ipsi- oder kontralateralem Befall und Beweglichkeit, sowie Lokalisation in Relation zum Primärtumor.
- NX: keine Aussagen über Lymphknotenbefall möglich.

Da die Entdeckung von Lymphknotenbefall davon abhängt, wie intensiv nach dem Befall gesucht wird, muss in der Regel je nach Organsystem eine Mindestzahl von Lymphknoten (z.B. 12 beim Kolonkarzinom) untersucht worden sein, um mit ausreichender Sicherheit sagen zu können, dass kein Befall in der entsprechenden Region vorliegt. Häufig wird die Angabe wie viele Lymphknoten von wie viel untersuchten Lymphknoten befallen waren, der N-Kategorie hinten angefügt, z. B. N0 (0/13).

Zunehmend gibt es Tumoren (z.B. Mammakarzinom), bei denen es als ausreichend angesehen wird, nur den so genannten Schildwächterlymphknoten (*sentinel lymph node*) zu untersuchen. Das ist der erste Lymphknoten (manchmal auch mehr als einer), der die Lymphe aus dem Gebiet des Tumors aufnimmt. Finden sich in ihm keine Metastasen, so ist die Wahrscheinlichkeit, in den nachgeschalteten Lymphknoten Metastasen zu finden, sehr gering. Umgekehrt müssen die nachgeschalteten Lymphknoten genau untersucht werden, wenn der Schildwächter befallen ist. Wurde dieses Verfahren angewendet, wird

die pN-Kategorie durch (sn) gekennzeichnet, also z.B. pN0(sn)=histologisch keine Lymphknotenmetastasen, pN1(sn)=Befall des (der) Schildwächterlymphknoten.

M (Metastasen)

M bezeichnet das Vorhandensein bzw. das Fehlen von hämatogenen Fernmetastasen. In der Regel ist die Klassifikation nur nach einem Staging möglich.

- M0: keine Anzeichen für Fernmetastasen.
- M1: Fernmetastasen vorhanden.
- MX: keine Aussage über Fernmetastasen möglich.

Zusätzlich kann die Lokalisation der Metastasen angegeben werden und dadurch die Lage der Tumormetastase spezifiziert werden. Dabei stehen die aus dem Englische abgeleiteten Abkürzungen PUL für Lunge, OSS für Knochen, HEP für Leber, BRA für Gehirn, LYM für Lymphknoten, MAR für Knochenmark, PLE für Pleura, PER für Peritoneum (Bauchfell), ADR für Nebenniere, SKI für Haut und OTH für andere Lokalisationen. Als Beispiele seien hier angeführt:

- M1OSS: Knochenmetastasen
- M1PUL: Lungenmetastasen

2.2.2 Histologische Einteilung von Pankreaskarzinomgewebe

Histologie der PanINs nach Hruban *et al.* (2001)

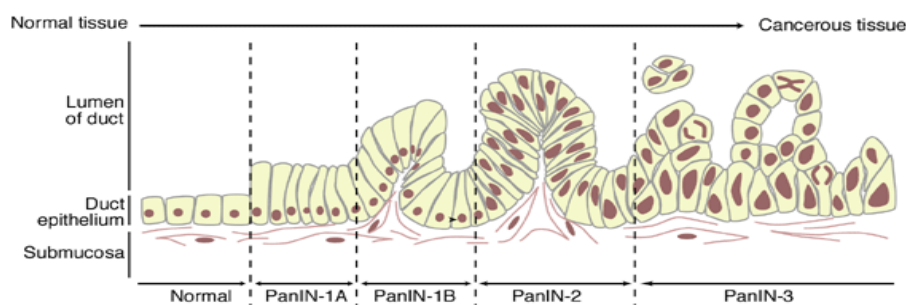


Abb. 9: Schematische Darstellung der Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN). Progress der Läsionen von PanIN-1A zu PanIN-3, welche bereits einem Carcinoma in situ entspricht.
www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/0100312Xh.htm

Pankreas-Gangepithel normaler Morphologie

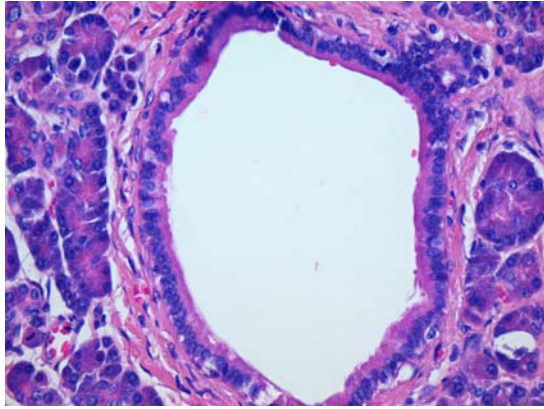


Abb. 10: Normales Gangepithel: Flaches bis kubisches einreihiges Epithel ohne vermehrte Muzinproduktion, basalständige regelmäßig angeordnete gleichförmige Kerne ohne Atypien (H&E, x200).

PanIN-1A: (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia 1-A): Epithel mit muzinöser Hypertrophie. Flaches hochprismatisches Epithel mit basal lokalisierten Zellkernen mit reichlich supranukleärem Muzin. Die Zellkerne sind klein und rund bis oval (Abb. 9 und 11).

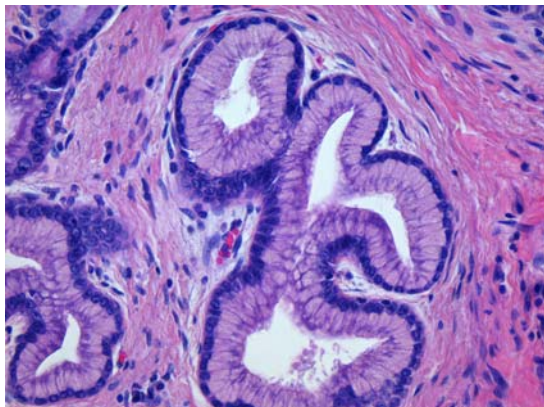


Abb. 11: PanIN-1A: Einreihiges zylindrisches Epithel mit gleichförmigen basalständigen Zellkernen und kräftiger Muzinproduktion, keine Kernatypien. Sehr selten eine Mitose (H&E, x200).

PanIN-1B: (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia 1-B): Epithel mit adenomatöser Hyperplasie und papillären Proliferationen. Es bilden sich intraduktale Mikropapillome und adenomartig vermehrte interlobuläre Gänge (Abb. 9 und 12).

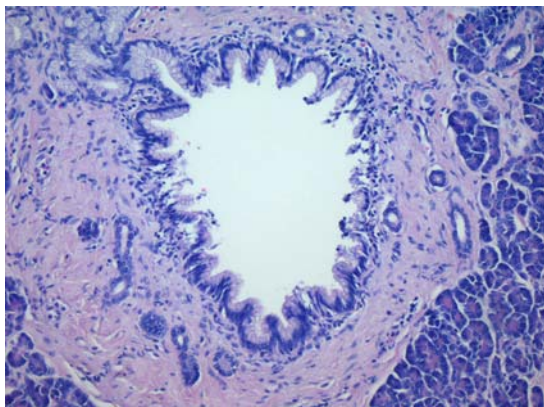


Abb. 12: PanIN-1B: Identischer Zelltyp wie PanIN-1A, jedoch papilläres, mikropapilläres oder basal pseudostratifiziertes Wachstumsmuster (H&E, x100).

PanIN-2: (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia 2): Flaches oder papilläres Epithel mit Pseudostratifizierung. Die prominenten Zellkerne weisen leichtgradige Atypiezeichen auf,

wie Kerngrößenschwankungen, Verlust der Polarität, Hyperchromatismus und irreguläre Mitosen (Abb. 9 und 13).

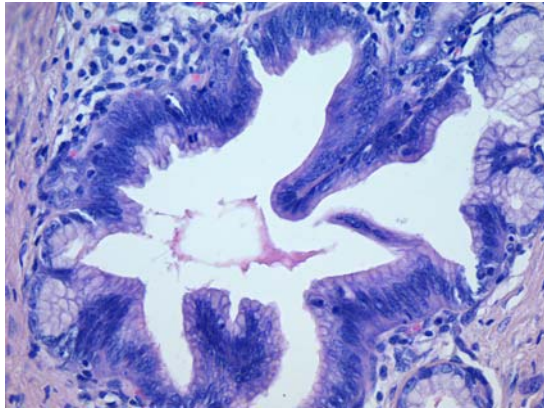


Abb. 13: Flaches oder papilläres Wachstumsmuster des Epithels, die Kerne weisen leichtgradige Atypiezeichen auf wie Kerngrößenschwankungen, Verlust der Polarität, Pseudo-Stratifizierung und Hyperchromasie. Atypische Mitosen, intraluminale Drüsenbildungen oder Zellschutt im Lumen finden sich nicht (H&E, x200).

PanIN-3: (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia 3): Carcinoma *in-situ*. Epithel mit papillärer oder mikropapillärer Struktur. Die Zellkerne zeigen deutlichen Orientierungsverlust und Pseudostratifizierung. Die großen, teilweise multiplen Nucleolen weisen vermehrt atypische Mitosen auf, mit apikaler Orientierung. Es finden sich des Weiteren intraduktale, irreguläre Drüsenneubildungen sowie Nekrosen und Zellschutt im Lumen. (Abb. 9 und 14).

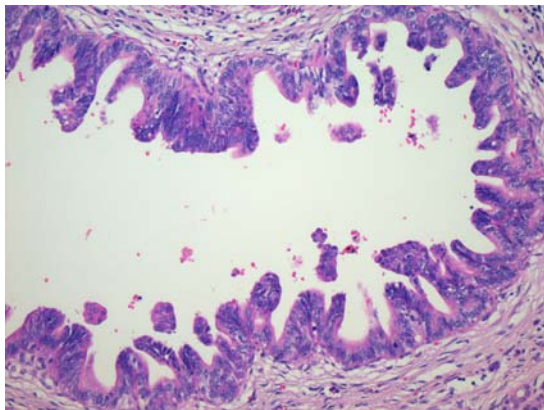


Abb. 14: Zytologisch entsprechen diese Läsionen bereits Karzinomzellen, jedoch ist eine Invasion der Basalmembran nicht vorhanden sodass ein *carcinoma in situ* vorliegt. Die Epithelien weisen schwergradige Atypiezeichen auf wie Verlust der Kernpolarität mit zum Lumen verschobenen vergrößerten unregelmäßig geformten und stark hyperchromatischen Kernen,

Duktale Metaplasie (DM) auch azinäre Gangmetaplasie genannt. Kleine bis mittelweite, selten ektatische Gangstrukturen mit einer flachen zytologisch unauffälligen Epithelauskleidung, welche in der Regel von narbig umgebautem Pankreasgewebe ummauert werden. Dies sind regenerative Proliferate neuer Drüsen aus ehemaligen Azini auf dem Boden einer narbigen chronischen Obstruktion der vorgeschalteten Gangstrukturen. Die Ursprungszelle der duktaalen Metaplasie ist noch nicht eindeutig identifiziert. Am wahrscheinlichsten handelt es sich um Proliferate der so genannten zentroazinären Zellen, welche im Normalgewebe zwischen den Azinuszellen und den ersten duktaalen Zellen lokalisiert sind (Hezel *et al.*, 2006). Histologisch muss ein duktaales Pankreaskarzinom differential diagnostisch ausgeschlossen werden. (Abb. 15).

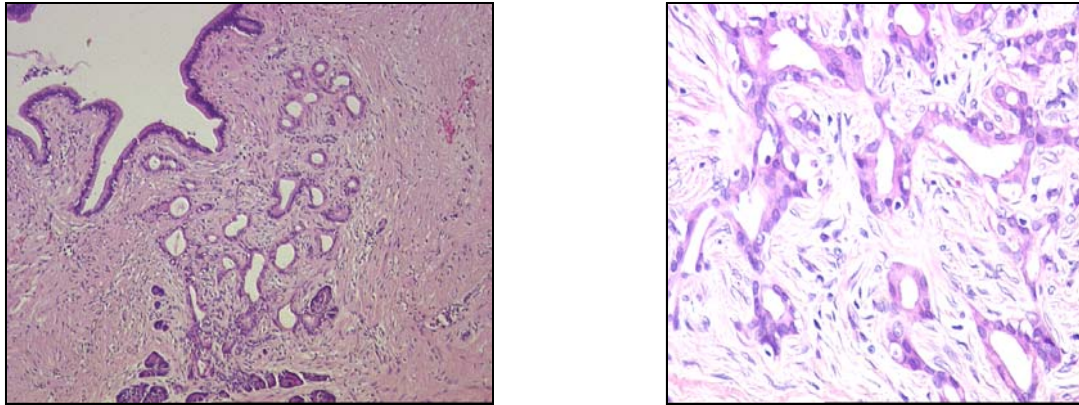


Abb. 15: Primäre Gangmetaplasie im Pankreasgewebe bei chronischer Pankreatitis. Links: Dicht bei einander liegende, in der Übersicht läppchenförmig angeordnete Gangproliferate eingemauert von Narbengewebe bei lange bestehender chronischer Entzündung. Keine erhaltenen Azini (HE, x40). Rechts: Vergrößerte Darstellung einer duktaalen Metaplasie Das Epithel ist unauffällig mit leichtgradiger chronischer Entzündung (HE, x400).

2.2.3 Histologische Einteilung von Prostatakarzinomgewebe

Histologisch handelt es sich in 97% um Adenokarzinome. Diese bilden verschiedene Wachstumsmuster und kommen entweder in Form hoch- oder wenig differenzierten glandulären, kribriformen oder soliden Karzinoms vor. Dabei haben die hoch differenzierten glandulären eine niedrige, die soliden Prostatakarzinome eine hohe Malignität. Bei vielen Prostatakarzinomen finden sich diese Wachstumsmuster nebeneinander (= pluriforme Karzinome). Zur prognostischen Bewertung wird ein so genanntes Grading nach Gleason durchgeführt. Dabei wird das Drüsenmuster beurteilt nach dem kleinsten und dem höchsten erkennbaren Gleason-Score und die Werte addiert (Gleason *et al.*, 1974). Ein hoher Gleason-Score geht mit einer schlechten Prognose einher.

Gleason 1: hoch differenziertes Adenokarzinom

Gleason 2: kleinere Drüsen, umschriebener Herd

Gleason 3: mittelgradig differenziertes Adenokarzinom, ungleichmäßig strukturierte Drüsen, diffus infiltrierend, nukleäre Atypien, große Nucleolen

Gleason 4: Fusion der kleinen Drüsen, kribriformes Muster

Gleason 5: gering differenziertes (anaplastisches) Karzinom, solide Stränge oder intraduktal, polymorphe Tumorzellen, basophiles Zytoplasma, viele Mitosen (Abb: 16)



Abb. 16: Gewebemorphologie der der Gleason Stadien 1-5.
www.psa-rising.com/caplinks/medical_biopsy.htm

Grading des Prostatakarzinoms

G1 = gut differenziert: Gleason-Score 2-4

G2 = mittelgradig differenziert: Gleason-Score 5-6

G2-G3 = mittelgradig bis gering differenziert: Gleason-Score 7

G3 = gering differenziert: Gleason-Score 8-10

2.3 Präparatgewinnung

2.3.1 Operative Tumoresektion – des Pankreaskarzinoms

Bei diesem Verfahren wird das Tumorgewebe je nach Ausdehnungsgrad durch den Chirurgen mechanisch teilweise oder komplett entfernt.

Bei gesicherter Diagnose des Pankreaskarzinoms wird eine partielle Duodenopankreatektomie durchgeführt (OP nach Kausch-Whipple), bei der ein Teil des Pankreas (Pankreaskopf) und die Gallenblase mit distalem Gallengang sowie das Duodenum und der distale Magen (bis zur Grenze der kleinen Ligatur) ektomiert wird. Die Verbindung von Magen und Ileum wird durch Anastomosierung von Pankreasschwanz, Ductus hepaticus und Magen durch eine Jejunumschleife vollzogen. Auf die Entfernung des distalen Magens wird heute oft verzichtet (pyloryserhaltende Operation, Traverso Modifikation), da keine Prognoseverbesserung mit ausgedehnter Teilresektion des Magens verbunden ist (Paquet, 1998).

Das so gewonnene Gewebe wird umgehend durch einen Pathologen in einem so genannten Schnellschnittverfahren begutachtet. Die Präparate wurden dazu unfixiert mit einem Kryomikrotom geschnitten und einer Standard HE-Färbung unterzogen.

2.3.2 Operative Tumorresektion – des Kolonkarzinoms

Bei der Operation des Kolonkarzinoms werden ein Teil des Darmes und das angrenzende Bindegewebe mit Lymphknoten entfernt. In der Regel können die beiden Schnittflächen des Darmes wieder miteinander vernäht werden, so dass die Passage des Speisebreies durch den Darm nach Heilung erfolgen kann. In einigen Fällen muss ein künstlicher Darmausgang gelegt werden (sog. Anus praeter).

2.3.3 Operative Tumorresektion – des Prostatakarzinoms

Bei lokal begrenztem Prostatakarzinom wird eine radikale Operation der Prostata, bei der Prostata, Samenbläschen und die regionalen Lymphknoten entfernt werden, durchgeführt. Diese so genannte radikale Prostatektomie kann auf drei unterschiedliche Arten erfolgen:

- als retropubische radikale Prostatektomie (RRP)
- als radikale perineale Prostatektomie (RPP) durch Schnitt am Damm (zwischen After und Hodensack)
- minimal-invasiv (laparoskopisch)

RRP und RPP werden extraperitoneal, also ohne Eröffnung der Bauchhöhle durchgeführt. Die RPP ist weniger zeitaufwändig und mit geringeren Blutungen verbunden, aber der Zugang ist relativ schmal und die Lymphknoten können nicht mit entfernt werden.

2.3.4 Transurethrale Resektion – bei benigner Prostatahyperplasie

Dieses Operationsverfahren ist eine mikroinvasive Resektionstechnik bei der über die Harnröhre ein so genanntes Resektoskop, ein Rohr, das eine Optik sowie eine Drahtschlinge zur Resektion enthält, eingeführt wird. Der Operateur kann unter Sichtkontrolle mit der Drahtschlinge Prostatagewebe abtragen. Die Schlinge wird elektrisch erhitzt, wodurch Blutungen zum Stillstand gebracht werden. Das abgetragene Prostatagewebe wird mit Spülwasser, welches durch das Resektoskop eingebracht wird, in die Blase gespült. Je nach Art des eingesetzten Resektoskops kann das Spülwasser mit dem abgetragenen Gewebe kontinuierlich während der Operation abgesaugt werden oder muss in Intervallen, nach Entfernen der Technik, über das äußere Rohr (Trokar) des Resektoskops abgelassen werden.

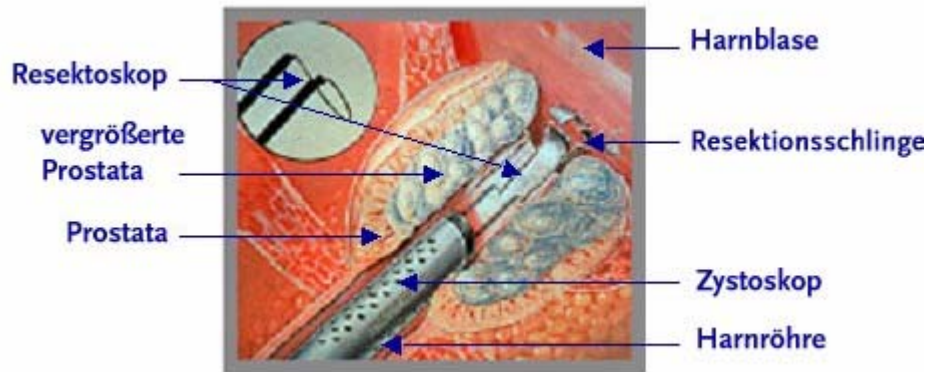
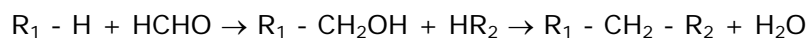


Abb. 17: Darstellung einer intraoperativen Situation einer transurethralen Resektion
www.prostatakrankheit.de/.../1093859055743.htm

Die, wie oben beschrieben, gewonnenen Tumorgewebe-Resektate (Pankreas-, Kolon- und Prostata-Karzinome) wurden umgehend durch einen Pathologen in einem so genannten Gefrier-Schnellschnittverfahren zur Beurteilung der Schnittländer begutachtet. Die Präparate wurden dazu unfixiert mit einem Kryomikrotom geschnitten und einer Standard Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen.

2.4 Präparatfixierung

Natives Gewebe wird zur Konservierung in 4%iger Formalinlösung fixiert. Der Fixierungsvorgang beruht auf einer Vernetzung der Proteine durch die Bildung von Methylenbrücken zwischen den Seitenketten der Eiweiße:



Nukleinsäuren werden bei der Formalinfixierung durch Blockierung wichtiger Seitengruppen vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt.

Das konservierte Präparat wird durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in das Zwischenmedium Xylol überführt. Von hier aus erfolgt die Überführung in das Einbettmedium Paraffin. Von den Blöcken wurden mit einem Handmikrotom Schnitte angefertigt, die auf Glas- oder Folienobjektträger gezogen wurden.

2.5 Entparaffinierung

Zur Entparaffinierung wurden die Präparate zweimal für 5min in Xylol überführt, danach kurz in eine absteigende Alkoholreihe getaucht (100%-100%-96%) und anschließend mit destilliertem Wasser gespült.

2.6 Färbemethoden

2.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Präparate wurden routinemäßig für mikroskopische Diagnostik, Mikrodissektion, DNA-Analysen etc., einer Färbung unterzogen. Dabei wurden die Präparate nacheinander mit den Farbstoffen Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Tabelle 1: HE-Färbeprotokoll

Durchführung	Dauer
Hämatoxylin nach Mayer	5 min
mit Leitungswasser spülen	kurz
mit warmem Leitungswasser bläuen.	5 min
Eosin 0,1%ig, pH6,	5 min
Spülen mit destilliertem Wasser	kurz
EtOH 70%ig und 96%ig	kurz
50°C Wärmeschrank zum trocknen	1 h

2.6.2 Toluidin-Färbung

Tabelle 2 Toluidin-Färbeprotokoll

Durchführung	Dauer
Aceton bei -20°C	2 min
lufttrocknen	kurz
Toluidinblau	2 sec
EtOH/DEPC 75% bei -20°C	kurz
Aceton bei -20°C	kurz
lufttrocknen	kurz

2.6.3 Methylenblau-Färbung

Tabelle 3 Methylenblau-Färbeprotokoll

Durchführung	Dauer
EtOH 75%	30 sec
DEPC-H ₂ O	30 sec
Methylenblau 1:5	30 sec

Durchführung	Dauer
EtOH 75%	30 sec
EtOH 95%	30 sec
EtOH 100%	30 sec
Xylen	30 5 min

2.6.4 Arcturus-Färbung

Tabelle 4 Arcturus-Färbeprotokoll

Durchführung	Dauer
EtOH 75%	30 sec
DEPC-H ₂ O	30 sec
100µl Staining Sol.	20 sec
Aqua dest	30 sec
EtOH 75%	30 sec
EtOH 95%	30 sec
EtOH 100%	30 sec
Xylen	5 min

2.7 Laser Mikrodissektion

Die Laser Mikrodissektion erlaubt das Ausschneiden von kleinsten Arealen aus gefärbten Schnittpräparaten unter mikroskopischer Kontrolle. Selbst einzelne Zellkerne können so gewonnen werden. Das Ausschneiden erfolgte dabei mit einem gepulsten UV-Laser, dessen fokussierter Strahl entlang der Kontur des interessierenden Areals geführt wurde. Diese Technik gewährleistete eine äußerst schonende Präparatbehandlung. Da ohne jeglichen mechanischen Kontakt mit dem Gewebe gearbeitet wurde, war die Gefahr einer Kontamination mit Fremd-DNA sehr gering. Die vorliegende Untersuchung erfolgte mit dem Mikrodissektionsverfahren der Firma Leica.



Abb. 18: Leica Mikrodissektionsmodul (<http://www.leica.de>)

Da die Zellen ohne mechanische Berührung und ohne Anwendung zusätzlicher physikalischer Kräfte, in die Reaktionsgefäße fielen, war dieses Verfahren wie bereits erwähnt aufgrund geringster Kontaminationsgefahr besonders für die Analyse von RNA geeignet.

2.7.1 Mikrodissektionsprozess

Aus den gefärbten und ungefärbten Präparaten wurden unter lichtmikroskopischer Kontrolle mittels Lasermikrodissektion einzelne Zellen aus Tumor-Vorläuferläsionen und Normalgewebe herausgeschnitten. Zwischen 50 und 500 Zellen wurden pro Cup gesammelt.

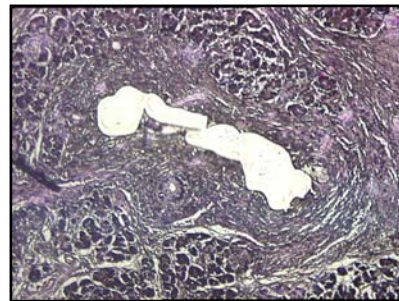
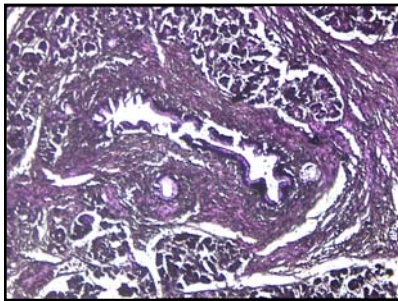


Abb. 19: Laser Mikrodissektion von PanINs. Rechts: HE-gefärbtes Schnittpräparat mit einer PanIN-1A. Links: Laser mikrodisseziertes Gewebeareal mit sauberem und kontaminationsfreiem Ausschneiden der gewünschten Zellpopulation eines Ganges (Vergrößerung x100).

2.8 DNA Isolierung aus mikrodissezierten Zellen

Für die weitere Aufarbeitung musste die genomische DNA der Zellen isoliert werden. Dazu war es nötig alle Proteine aus dem Zellpräparat zu entfernen. Dies geschah unter Zugabe des Enzyms Proteinase K, das zusammen mit TL-Puffer in den Cup-Deckel gegeben wurde, in welchen das Zellpräparat beim Ausschneiden fallen sollte. Folgende Reagenzien wurden verwendet:

Tabelle 5: Proteinase K Behandlung

Reagenzien
20 µl TL-Puffer
1 x Taq PCR Puffer
2 mg/ml Proteinase K
3 % Tween 20

Die Ansätze wurden für 16 bis 20 Stunden bei 50°C inkubiert, anschließend 12 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Proteinase K durch Inkubation für 10min bei

94°C inaktiviert. Es folgte eine Amplifikation der erhaltenen DNA mittels PCR (siehe unten).

2.9 RNA-Isolierung aus ungefärbten FFPE-Gewebeschnitten

Die ca. 10 µm dünnen FFPE-Gewebeschnitte wurden direkt in Reaktionsgefäße überführt. Durch eine absteigende Xylol/Ethanolreihe wurde das Paraffin aus dem Gewebe entfernt. Dem entparaffinierten Gewebe wurden 100 µl Lysepuffer, 16 µl SDS (4%ig) und 40 µl Proteinase K hinzugefügt, kurz gemischt und über Nacht bei 55°C auf einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand für die Gesamt-RNA Gewinnung und Aufreinigung abgenommen. Es wurden drei verschiedene Aufreinigungs-Kits auf ihre RNA Ausbeute hin überprüft.

2.9.1 HighPure-RNA-Paraffin-Kit (Roche, Mannheim) - zur RNA Isolierung

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurde unter Anderem das HighPure-RNA-Paraffin-Kit der Firma Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Table 6 Komponenten des HighPure-RNA-Paraffin-Kit

Komponenten
Lysepuffer
Proteinase K
Bindungspuffer
Waschpuffer I
Waschpuffer II
DNase I
DNase Inkubationspuffer
Elutionspuffer

2.9.2 Paradise Reagent System (Arcturus, CA, USA) - zur RNA Isolierung

Das Paradise Reagent System-Kit der Firma Arcturus wurde getestet und nach Herstellerangaben verwendet.

Table 7 Komponenten des Paradise Reagent System

Komponenten	Bezeichnung
Conditioning Buffer	CB
Ethanol Solution	EtOH
Wash Buffer1	W1
Wash Buffer 2	W2

Komponenten	Bezeichnung
Elution Buffer	EB
Pro K Mix	
Reconstitution Buffer	
DNase Mix	DNase
DNase I Buffer	DNB
Binding Buffer	BB

2.9.3 RNeasy-Micro-Kit (Qiagen, Hilden) - zur RNA Isolierung

Das RNeasy-Micro-Kit der Firma Qiagen wurde nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 8: Komponenten des RNeasy-Micro-Kits

Komponenten
Buffer RLT
Buffer RW1
Buffer RPE
RNase-free water (bottle)
RNase-free water (tube)
Buffer RDD
RNase-free DNase
Carrier RNA, poly-A

2.9.4 RNA-Isolierung aus humanem Frischgewebe

Für die von RNA-Isolierung aus humanem Frischgewebe, wurde ein nicht fixiertes, tiefgefrorenes Gewebstück verwendet. Die Isolierung wurde mit Hilfe des Trizol-Chloroform-Protokolls durchgeführt

Tabelle 9: Reagenzien für die Trizol-Chloroform-Isolierung

Reagenzien
Trizol (Life Technologies)
Chloroform (ChCl ₃)
Isopropanol
80% Ethanol
DEPC-Wasser

Anhand des folgenden Protokolls wurde die Total-Isolierung durchgeführt.

- 30- 40 mg Gewebe von der Gewebeprobe mit einem sterilen Skalpell abtrennen
- Gewebestück in 600 µl Trizol aufnehmen

- Gewebestück mit sterilen Dispergierwerkzeuges (S25- 8 G) Ultra Turrax T 25 *basic* auf Eis zerkleinern und homogenisieren
- 5 min bei RT inkubieren
- Zugabe von 120 µl CHCl₃ und für 15 sec durch invertieren mit der Hand vermischen und anschließend für 2-3 min bei RT inkubieren
- 15 min Zentrifugation bei 12000x g bei 4°C in einer Kühlzentrifuge
- Überstand in ein neues steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und darauf hin bei 4°C und 12000x g erneut zentrifugieren
- Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführen und 300 µl gekühlten Isopropanol hinzu geben
- 10 min Inkubation bei RT
- Zentrifugation für 10 min mit 12000x g bei 4°C
- Den Überstand verwerfen. Pellet mit 300 µl gekühltem 80% Ethanol waschen
- Zentrifugation für 5 min mit 7500x g bei 4°C. Überstand verwerfen
- Trocknen des Pellets bei RT für 10-15 min
- Lösen des Pellets in 30 µl DEPC-Wasser bei RT

2.10 RNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der RNA wurde unter Verwendung des RNeasy-Mini-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle10: Komponenten des RNeasy-Mini-Kits

Komponenten
Buffer RLT
Buffer RW1
Buffer RPE
RNase-free water

2.11 Messung der RNA-Quantität mit Hilfe eines Spektralphotometers

Zur Konzentrationsbestimmung und Reinheitsüberprüfung von RNA-Lösungen wurden UV-Spektren mit einem Spektralphotometer (NanoDrop, ND-1000 Spectrophotometer) gemessen. Für das RNA-Spektrum wurde für die Adsorptionsmessung in Wasser die folgende Abhängigkeit zugrunde gelegt: 1 A₂₆₀ entspricht 40µg/ml RNA

2.12 PCR-Methoden

2.12.1 Reverse Transkription und Quantitative *real-time*-PCR

Die *real-time* PCR erlaubte die Quantifizierung von spezifischer mRNA, welche aus unfixierten Zellen isoliert wurde. Dazu wurde zuerst in einer Reverse-Transkriptase-

Reaktion die RNA in cDNA umgeschrieben und die Produktzunahme während der PCR durch eine fluorimetrische Echtzeitbestimmung quantifiziert. Die Detektion des entstehenden DNA-Produktes geschah mit Hilfe des interkalierenden Fluorophoren SYBR Green 1. Der Farbstoff lagert sich in doppelsträngige DNA ein und verändert dadurch seine Fluoreszenzeigenschaften. Für die *real-time* PCR wurde das QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR KIT (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Tabelle 11: QIAGEN QuantiTect SYBR Green RT-PCR

Komponenten
2x SYBR Green
QuantiTect RT Mix
RNase-free water
Primer

Tabelle 12: RT- PCR-Programm

Programm	Zeit	Temperatur (°C)	Ramp
Reverse transcription	20 min	50	20°C/s
Initial activation step	15 min	94	20°C/s
Cycling 45x			
Denaturation	15 sec	94	20°C/s
Annealing	20 sec	65	20°C/s
Extension	15sec	72	20°C/s
Melting curve			
	15sec	95	20°C/s
	5 sec	50	20°C/s
	0	85	1°C
	15 sec	95	20°C/s
	30 sec	40	20°C/s

Nach jedem Zyklus wurde die Zunahme des PCR-Produktes anhand der erhöhten Fluoreszenz gemessen. Am Ende der *real-time* PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität und die Reinheit des erhaltenen Produktes zu prüfen.

Tabelle 13: RT-PCR-Primer

MSI-Primer	Gen	Basensequenz	Annealing-temp.
Actin1f	β -Actin	5'-CCT TGA TTG CAC ATT GTT-3'	50.2°C
Actin1r		5'-CAT TCT CCT TAG AGA GAA GTG-3'	55.9°C
Actin2f	β -Actin	5'-GAATGA TGA GCC TTC GTG CCC-3'	61.8°C

MSI-Primer	Gen	Basensequenz	Annealing-temp.
Actin2r		5'-TAC AGG TAA GCC CTG GCT GCC TC-3'	66.0°C
CDK4f	<i>CDK4</i>	5'-CCT CCT CCA TCT TTC TAC AGA GA-3'	60.6°C
CDK4r		5'-AGG ACC CCA AAT ATA AAG GTA GG-3'	58.9°C
MCM3f	<i>MCM3</i>	5'-CAA TTG GTG GAG AGA AGC TCT GA-3'	60.6°C
MCM3r		5'-ATG GCT AAG TTT ATT CAA CAT CTC G-3'	58.1°C
MCM6f	<i>MCM6</i>	5'-AGA AAG CAA GAC AGA TTA ATA TAG G-3'	56.4°C
MCM6r		5'-ATA CTT GTG GAG TAC ATT TTG ACA-3'	55.9°C
cmycf	<i>c-MYC</i>	5'-GGT TCA AAA GAC TCA GAC AGC-3'	57.9°C
cmycr		5'-CCT CAT CAC AAA AAT ACT TTA TTT C-3'	54.8°C
DRAf	<i>DRA</i>	5'-TGG CAT ATT TTT CAC ATA TCT AGT ATG-3'	57.4°C
DRAr	<i>DRA</i>	5'-CGC CAC TAT ACT GCT AAA CCT AT-3'	58.9°C

2.12.2 PEP-PCR

Da bei einer Lasermikrodissektion nur sehr geringe Mengen an DNA gewonnen werden, wurde eine Whole Genome Amplifikation mittels einer primer-extension-preamplifikation-polymerase-chain-reaction (PEP-PCR) durchgeführt, zur Vervielfältigung des gesamten Genoms (Dietmaier *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 1992). Es wurden dafür Primer eingesetzt, die unspezifisch in einer linearen PCR-Reaktion das Genom zu ca. 99% amplifizieren (15mer Random-Primer). Dabei entstanden nach 50 Zyklen ungefähr 70 bis 100 Kopien einzelner genetischer Segmente (Newton *et al.*, 1994). Der entscheidende Vorteil dieser Präamplifikations-PCR lag darin, dass aus den wenigen Zellen, die bei der Lasermikrodissektion gewonnen wurden, nun Ausgangsmaterial für bis zu 20 spezifische PCR-Reaktionen vorlagen. Ohne diesen Präamplifikationsschritt wäre nur eine einzige spezifische PCR-Untersuchung möglich.

Bei einer PEP-PCR wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

Tabelle 14: In 40µl PEP- Mix sind enthalten:

Komponenten
0,05mmol/l Gelatine
16µmol/l 15mer random Primer
0,2mmol/l dNTPs
3,6 U <i>Taq</i> Expand High Fidelity Polymerase
2,5mmol/l MgCl ₂ , in 1 x PCR Buffer No. 3 von Roche
20µl genomische DNA.

Die Proben wurden in einen Eppendorf Mastercycler überführt, in dem 50 Zyklen einer PEP-PCR ablaufen.

Tabelle 15: PEP-PCR-Programm

Zyklus	Temperatur/ Dauer
1	92°C für 90sec
2	92°C für 40sec
3	37°C für 2min
4	Steigerung 0,1°C/sec bis 55°C
5	55°C für 4min
6	68°C für 30sec
7	Schritte 2 bis 7 werden 49 mal durchlaufen
8	68°C für 15min
9	4°C

2.12.3 Mikrosatelliten-PCR

Die mit der PEP-PCR linear amplifizierte DNA wurde als Ausgangsmaterial für eine spezifische, exponentielle PCR eingesetzt. Es wurden Mikrosatelliten Marker (Tabelle 45) aus dem Bereich der Genloci von *p16^{INK4}*, *p53* und *DPC4* verwendet, um homozygote Deletionen oder *loss of heterozygosity* (LOH) als Ausdruck einer Geninaktivierung zu detektieren. Korreliert wurden die molekulargenetischen Untersuchungen mit immunhistochemischen Expressionsanalysen des Genprodukts dieser Gene sowohl im Tumorgewebe als auch in PanINs siehe unten.

Mikrosatelliten (syn. SSR - *simple sequence repeats* oder auch SSLP - *simple sequence length polymorphism*) sind kurze, nicht kodierende DNA-Sequenzen, die im Genom eines Organismus oft wiederholt werden. Oftmals konzentrieren sich viele Wiederholungen am selben Locus (Auffindungsort) einer Sequenz. Die wiederholte Sequenz in einem Mikrosatelliten besteht aus zwei bis vier Nukleotiden und kann 10- bis 100-mal wiederholt auftreten. Mikrosatelliten sind die häufigste Form repetitiver DNA. Als repetitive DNA bzw. repetitive DNA-Elemente wurden DNA-Bereiche im Erbgut bezeichnet, deren Sequenz aus sich wiederholenden Abschnitten besteht. Am häufigsten sind die Dinukleotidwiederholungen vom Typ (CA)_n. Diese machen etwa 0,5% des Genoms aus.

Tabelle 16: Es wurden insgesamt 18µl der folgenden Reagenzien eingesetzt:

Komponenten
2,5mmol/l MgCl ₂ , in 1 x PCR Puffer No. 2 von Roche
0,2mmol/l dNTPs
0,3µmol/l Primer
0,5 U <i>Taq</i> Expand High Fidelity Polymerase
2µl präamplifizierte DNA

Die Amplifikation der Regionen wurde in einem Eppendorf Mastercycler durchgeführt.

Tabelle 17: MSI-PCR-Programm

Zyklus	Temperatur/ Dauer
1	95°C für 3min
2	95°C für 30sec
3	X°C für 45sec
4	72°C für 1min
5	Schritte 2 bis 5 werden 49 mal durchlaufen
6	72°C für 10min
7	4°C

Schritt 3 gibt die Aneling-Temperatur des MSI-Primers an, d.h. diese Temperatur ist je nach PCR bzw. eingesetztem Primer variabel (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: MSI-Primer (MWG-Biotech AG, Berlin, Germany)

MSI-Primer	Gen	Basensequenz	Annealing Temp.
p53F3	<i>p53</i>	5'-GTT GGC TCT GAC TGT ACC AC-3'	57°C
p53R3		5'-CTG GAG TCT TCC AGT GTG AT-3'	
p53ivs1a	<i>p53</i>	5'-GCA CTT TCC TCA ACT CTA CA-3'	54°C
p53ivs1b		5'-AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG-3'	
TP53ALU up	<i>p53</i>	5'-AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG-3'	58°C
TP53ALU down		5'-GCA CTT TCC TCA ACT CTA CA-3'	
TP53ALS-up	<i>p53</i>	5'-TCG AGG AGG TTG CAG TAA GCG GA-3'	50°C
TP53ALS-down		5'-AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG-3'	
D17S1678 f	<i>p53</i>	5'-TTT GGG TCT TTG AAC CCT TG-3'	54°C
D17S1678 r		5'-CCA CAA CAA AAC ACC AGT GC-3'	
D18S63 left	<i>DPC4</i>	5'-AGC TCA TGT TGG ATG TAT CA-3'	56°C
D18S63 right		5'-GTC AGA CTA CGC GCC TT-3'	
PKY11 f	<i>p16</i>	5'-TTG TTG ATT CTG CCT TCA AAG TCT TTT AA-3'	56°C
PKY11 r		5'-CGT TAA GTC CTC TAT TAC ACA GAG-3'	
PKY3 f	<i>p16</i>	5'-CAC CTC AGA AGT CAG TGA GT-3'	56°C

MSI-Primer	Gen	Basensequenz	Annealing Temp.
PKY3 r		5'-GTG CTT GAA ATA CAC CTT TCC-3'	
D9S942 f	p16	5'-GCA AGA TTC CAA ACA GTA-3'	50°C
D9S942 r		5'-CCA CAA CAA AAC ACC AGT GC-3'	

2.13 Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob die amplifizierten PCR-Produkte die gewünschte Sequenz haben, wurden die PCR-Produkte mit dem ABI PRISM 310[®] Genetic Analyzer (Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt) sequenziert. Dazu wurden die Produkte auf einem Polyacrylamid-Gel (PAGE) analysiert. Für die Sequenzierung eigneten sich PCR-Produkte mit einer Mindestmenge von 10-20 ng.

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des HighPure-PCR-Product-Purification-Kits der Firma Roche Molecular Biochemicals aufgereinigt um kontaminierende Primer, Nukleotide, Salze und das Enzym aus dem Ansatz zu entfernen. Die Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen ist in Tabelle 19 aufgeführt, das Protokoll des Herstellers wurde leicht abgeändert befolgt.

Tabelle 19: Bestandteile des HighPure-PCR-Product-Purification-Kit

Komponente	Funktion	Zusammensetzung
Bindepuffer	fördert Bindung von Nucleinsäuren an Glasvlies	3 M Guanidinium-Thiocyanat 10 mM Tris-HCl 5% Ethanol (v/v); pH 6,6
Waschpuffer	Entfernung von Primern, Nucleotiden, Salzen, Polymerase	20 mM NaCl 2 mM Tris-HCl in 80% Ethanol; pH 7,5
Elutionspuffer	fördert Lösung der DNA von Glasvlies	10 mM Tris-HCl; pH 8,5

Die gereinigte DNA wurde in einer Sequenzierungsreaktion eingesetzt, bei der Fluoreszenz-markierte Di-Desoxynucleotide in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut werden. In der Sequenzierungsreaktion entstehen unterschiedlich lange Fragmente, die je nach Nucleotid am 3'-Ende mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind.

Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist in Tabelle 20 aufgeführt, das Sequenzier-Programm zeigt Tabelle 21. Nach der PCR wurde ein Ansatz mit 5 µl 3 M

Natriumacetat und 80 µl 75%igem Isopropanol versetzt. Die Proben wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Ansätze 20 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde mit 200 µl 75% Isopropanol gewaschen und eine min bei 90°C im Thermocycler getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 20 µl TSR, *template suppression reagent* resuspendiert und für zwei Minuten zur Denaturierung der Doppelstränge bei 94°C im Thermocycler inkubiert und auf Eis gelagert.

Tabelle 20: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur Sequenzierung

Volumen	Substanz	Zusammensetzung
3 µl	Terminator Ready Reaction Mix	enthält Nucleotide, Polymerase, Puffer, MgCl ₂
1,5 µl	Template-DNA	
2 µl	Primer	2 µM Primer
3,5 µl	HPLC-Wasser	

Tabelle 21: PCR-Programm zur Sequenzierung

Schritt	Dauer/ Temperatur	Wiederholung
Sequenzierung	10 s 96°C Denaturierung 5 s 50°C Primer-Annealing 4 min 60°C Elongation	25 x
Abkühlen	4°C	1 x

Der Ansatz wurde in ein mit einer Gummimembran verschlossenes Reaktionsgefäß überführt und in den ABI Prism 310 Genetic Analyzer eingesetzt.

Das Gerät nimmt über eine Kapillare eine definierte Menge der zu untersuchenden Probe auf. Die enthaltenen DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in der Kapillare aufgetrennt und am Ende der Kapillare detektiert. Die Zeit für das Passieren der Kapillare ist proportional zur Länge der DNA. Ein Auswertungsprogramm ermöglichte die Darstellung der untersuchten Gen-Sequenz als Fluorogramm. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die erhaltenen Gen-Sequenzen mit den in der pubmed-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) gespeicherten Referenzen verglichen.

2.14 Gelelektrophorese

2.14.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die **Polyacrylamid-Gelelektrophorese** (PAGE) zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA wurde mit folgenden Reagenzien durchgeführt.

Tabelle 22: PAGE-Gel

Reagenzien
4,5ml Aqua dest.
0,9ml Acrylamid 40%
0,6 ml 10-fach Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (10 x TBE)
100µl Ammoniumpersulfat 10% (APS)
5µl Tetramethylethylen-diamin (TEMED)

Durchführung:

1. Zusammensetzen der Gelkammer
2. Ansatz der Gel-Reagenzien und der Proben mit 1µl 10 x Ladepuffer und 5µl PCR Produkt (siehe oben)
3. Gießen der Kammer und Einsetzen des Probenkamms
4. Beladen des Gels mit den Proben
5. Aufsetzen der Pufferkammer und Befüllen mit Puffer (1 x TBE)
6. Strom anlegen mit einer Spannung von 130 bis 140mV, einer Stromstärke von 400mA für 30 bis 40 Minuten
7. Färben mit Ethidiumbromid
8. Nachweis eventueller Banden mittels Gel Doc 2000 (BioRad)

2.14.2 Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

Die **Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese** (FAA) wurde mit folgenden Reagenzien durchgeführt.

Tabelle 23: FAA-Gel

Reagenzien und Durchführung
1,8 g Agarose wurden in 110 ml DEPC-Wasser gelöst
Zufügen von 15 ml 10x MOPS-Puffer (200 mM MOPS, 80 mM NaOAc, 10 mM EDTA pH 7)
Zugabe von 24,9 ml Formaldehyd

Das Formaldehyd destabilisierte vorhandene sekundär Strukturen der RNA. Dadurch wurden die RNA-Fragmente während der Elektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Tabelle 24: Zu 1 µg RNA wurden nachstehende Reagenzien zugefügt:

Reagenzien
10 µl Formamid
3,5 µl Formaldehyd
2 µl 10x MOPS-Puffer
2 µl Gel-Lade-Puffer (50% Glycerol, 1 mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau (BPB))
1 µl Ethidiumbromid (EtBr)
Denaturierung des Proben-Gemisches bei 65 °C für 15 min
Auftrag der Proben (ca. 19,5 µl) auf das Gel.

Das Gel lief bei 60 V für ein bis zwei Stunden in 1x MOPS-Puffer. Der Nachweis eventueller Banden wurde mit einer speziellen Fluoreszenzkamera dokumentiert.

2.14.3 Silbergelelektrophorese

Silbergele haben bessere Trenneigenschaften als Polyacrylamidgele aufgrund ihrer feineren Vernetzungsstruktur. Schon 0,02 µg Amplifikat ergeben erkennbare Banden bei der Silberfärbung.

Die Proben wurden bei 95°C denaturiert, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Das Gel wurde aus folgenden Reagenzien hergestellt:

Tabelle 25: Silbergel

Reagenzien
19,4ml Formamid
10,5ml Acrylamid (40%)
6,1ml 10 x TBE-Puffer
24,6ml Harnstofflösung
500µl APS
50µl TEMED

Durchführung:

1. Zusammensetzen der Gelkammer
2. Ansatz der Gel-Reagenzien (siehe oben)
3. Gießen der Kammer und einsetzen des Probenkamms
4. Nach Auspolymerisierung des Gels, Überführen in die Elektrophorese-Apparatur.
5. Befüllen der Pufferkammer
6. Entfernung des Probenkamms und anschließendes Warmlaufen des Gels 30 bis 60 min.
7. Ansatz der Proben (3 μ l Ladepuffer, 5 μ l PCR-Produkt), anschließend denaturieren bei 95°C für 4 min.
8. Beladen des Gels mit den Proben
9. Das Programm wird gestartet mit einer Spannung von 3000mV und einer Stromstärke von 400mA für 1h45min

Färbung:

Zum Färben des Silbergels wird eine Kammerwand entfernt und ein Rahmen aufgesetzt. Danach wird das Gel wie folgt behandelt:

1. Gel kurz mit destilliertem Wasser spülen
2. Gel 5 min mit 10%igem Ethanol bedecken
3. Gel 3 min mit 1%iger Salpetersäure bedecken
4. Gel kurz mit destilliertem Wasser spülen
5. Gel 20 min mit 1%iger Silbernitratlösung bedecken
6. Gel 2 min mit destilliertem Wasser spülen
7. Mehrmals das Gel mit Natriumcarbonat-Formalin spülen, bis Banden zu erkennen sind
8. Gel 2 min mit 10%iger Essigsäure bedecken
9. Gel 2 min mit destilliertem Wasser spülen
10. Rahmen entfernen und Gel mit Papier (Vorderseite) und PE-Folie (Rückseite) bedecken
11. Trocknen des Gels in einem Geltrockenapparat ca. 60 min.

2.15 Fragmentanalyse

Zur Verifizierung der im Silbergel gefundenen LOH-Daten wurde eine Fragmentanalyse der Untersuchung angeschlossen. Es wurden dazu die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte mit dem ABI Prism 310 GeneticAnalyzer untersucht

Tabelle 26: Fragmentanalyse

Reagenzien	Menge in μl
DNA	0,5 – 1,5
Formamid	20
TAMRA 500 [®] (Längenstandard)	0,5

Voreinstellungen für die Kapillarelektrophorese:

- Länge bis zum Detektor: 30 cm
- Injektionszeit 10 s
- Injektionsspannung 7,0 kV
- Laufspannung 13,0 kV
- Lauftemperatur 30 C
- Laufzeit 18 min .

2.16 DNA-Mikroarray Untersuchungen

2.16.1 Qualitätskontrolle der RNA mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer

Die LabChip-Technologie von Agilent Technologies 2100 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA) basiert auf dem Prinzip der Mikrofluidik, der Steuerung winziger Flüssigkeitsmengen in miniaturisierten Systemen. In der Biowissenschaft können mit dem LabChip (Abb. 20) viele verschiedene qualitative und quantitative biochemische Analysen durchgeführt werden. Das Innere eines LabChips besteht aus Systemen winziger geschlossener Kanäle und Wells, die in einen Glas- oder Kunststoff-Mikrochip geätzt sind. Durch Druck oder elektrokinetische Kräfte werden die Proben kontrolliert durch die vorgegebenen Kanäle, transportiert, aufgetrennt und detektiert. Anhand des Elektropherogramms (Abb. 21) lassen sich der Grad der Degradation der RNA nachweisen und das Verhältnis der beiden rRNA-Peaks. (18s rRNA zu 28s rRNA) berechnen. Des Weiteren bietet es die Möglichkeit, die *Area under Curve* (AUC) der beiden rRNA-Peaks zu berechnen, was eine Kontrolle der RNA-Qualität ermöglicht.



Abb. 20: RNA 6000 Pico LabChips
(www.Agilent.com)

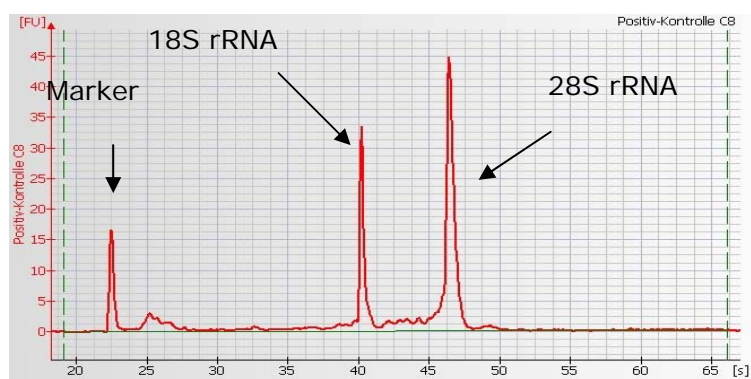


Abb. 21: Darstellung der beiden ribosomalen Peaks und des Marker Peaks eines Elektropherogramms

Für die verschiedenen Messaufgaben standen verschiedene LabChip Kits zur Verfügung, die die notwendigen Reagenzien und LabChips beinhalten. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.16.2 Amplifikation der RNA

Die Amplifikation der isolierten RNA erfolgte mit dem RiboAmp OA RNA 2 Round Amplifikations Kit von Arcturus (Kat.No. KIT0206, Arcturus, UK).

Das RiboAmp OA RNA Amplifikations Kit ermöglichte die Herstellung von *antisense*-RNA (aRNA) im Mikrogramm Bereich ausgehend von gesamt RNA, die im Nanogramm Bereich lagen. 1 µg RNA wurde in die Amplifikation eingesetzt.

Tabelle 27: Komponenten des RiboAmp OA RNA Amplifikations Kits

Komponente	Bezeichnung
1stStrand Master Mix	1
1stStrand Enzyme Mix	2
1stStrand Nuclease Mix	-
2ndStrand Master Mix	1
2ndStrand Enzym Mix	2
IVT Buffer	1
IVT Master Mix	2
IVT Enzym Mix	3
DNase Mix	4
Primer A	A
Primer B	B
Kontroll-RNA (0.2 µg/µl)	C

Tabelle 28: Komponenten des RiboAmp OA RNA Aufreinigungs-Kit

Komponente	Bezeichnung
DNA Bindungs- Puffer	DB
DNA Wasch Puffer	DW
DNA Elution Puffer	DE
RNA Bindungs- Puffer	RB
RNA Wasch Puffer	RW
RNA Elution Puffer	RE

Die lineare RNA Amplifikation mit dem RiboAmp OA RNA Amplifikations Kit umfasste fünf Schritte pro Amplifikationsrunde.

Die messenger-RNA (mRNA) der isolierten Gesamt-RNA wurde in der ersten Strang Synthese in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, dabei wurde auch eine T7-Promotor-Sequenz am 5'-Ende in die cDNA eingefügt. Diese cDNA wurde als *Template* für die Generierung eines zweiten Stranges genutzt, so dass ein doppelsträngiges DNA Molekül (dsDNA) entstand. Nach der Isolierung der dsDNA mit MiraCol-Säulen wurde die dsDNA mit dem eingebauten T7-Promotor als *Template* für eine *in-vitro*-Transkription genutzt. Hierbei entstanden viele Kopien aRNA, die komplementär zu der Sequenz der Ausgangs mRNA waren.

Für eine zweite Amplifikationsrunde wurde der gesamte Vorgang wiederholt und die aRNA aus der ersten Runde wurde als Ausgangs-RNA verwendet (Abb. 22)

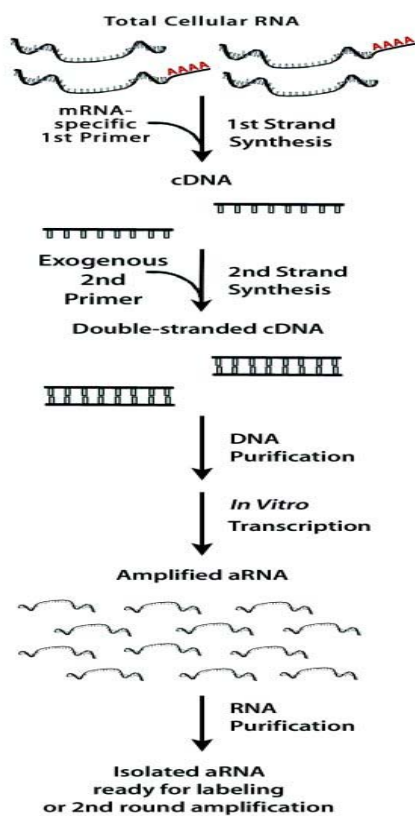


Abb. 22: Schematische Darstellung des Ablaufs der ersten Runde der Amplifikation (www.affymetrix.com)

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Arcturus, version C).

Tabelle 29: Verwendetes PCR-Pogramm

Runde 1		
Zyklus	Temperatur / Zeit	Synthese
1	65°C, 5min	1st Strand
2	4°C, halten	
3	42°C, 45 min	
4	37°C, 20 min	
5	95°C, 5 min	
6	4°C, halten	

Runde 1		
Zyklus	Temperatur / Zeit	Synthese
7	25°C, 5 min	2nd Strand
8	37°C, 10 min	
9	70°C, 5 min	
10	4°C, halten	
11	42°C, 3 h	IVT
12	4°C, halten	
13	37°C, 15 min	
14	4°C, halten	

Runde 2		
Zyklus	Temperatur / Zeit	Synthese
1	65°C, 5min	1st Strand
2	4°C, halten	
3	25°C, 10 min	
4	37°C, 45 min	
5	4°C, halten	
6	95°C, 2 min	2nd Strand
7	37°C, 15 min	
8	70°C, 5 min	
9	4°C, halten	

Labelling mit GeneChip® Expression 3'-Amplification Reagents for IVT Labelling (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) erfolgte nach Herstellerangaben

2.16.3 Auswertung von Affymetrix Oligonukleotid-Mikroarrays

Mikroarrays von Affymetrix werden durch ein kombiniertes Verfahren von Photolithografie und kombinatorischer Chemie hergestellt. Zehn- bis hunderttausend verschiedene Oligonukleotid-Proben werden dabei direkt auf dem Array synthetisiert. Die DNA-Oligonukleotide, die ein bestimmtes Transkript repräsentieren, sind auf so genannten Probe Sets lokalisiert (Abb. 23). Jedes Probe Set besteht aus 16 – 20 *probe pairs*, die jeweils aus 2 verschiedenen *probe cells*, den *perfect match* (PM) und *mismatch* (MM), zusammengesetzt sind. Die PM-Oligonukleotide sind exakt komplementär zu einem Sequenzabschnitt in einem spezifischen Transkript. Die MM-Oligonukleotide sind ebenfalls komplementär zu diesem Sequenzabschnitt, weisen jedoch an einer zentralen Position einen homomeren Basen- *mismatch* auf. Das PM-Oligomer ist identisch zu der Sequenz des Gens, das durch das Probenset repräsentiert wird. Das MM Oligomer enthält eine Basentransversion in der Mitte der Sequenz und dient der Kontrolle von unspezifischen Bindungen (Robert *et al.*, 1999; Affymetrix, Mikroarray Suite™ Users Guide, Version 5). Jede *Probe Cell* beinhaltet wiederum Millionen Kopien eines spezifischen Oligonukleotids.

Während des Scannens wird jede *Probe Cell* in Pixel unterteilt, und die Rohintensitäts-Daten pro Pixel ermittelt. Die Ermittlung eines Intensitätswertes pro Probe Set (=Transkript) erfolgt in zwei Schritten mit Hilfe der Affymetrix Mikroarray Suite Software (MAS), Version 5.0. Zur Kontrolle der Hybridisierungsqualität eines Array-Experiments enthält der Array Probe Sets mit nicht-eukaryontischen Oligonukleotiden: bioB, bioC, bioD und cre. Die entsprechenden Transkripte (Spike-Kontrollen) wurden dem Hybridisierungscocktail zugegeben (siehe 2.16.2, Tab. 27) und müssen später in der absoluten Analyse im Absolut Call den Status Present aufweisen. bioB repräsentiert dabei das unterste Detektionslimit, da es in der geringsten Konzentration (1.5 pM) zugegeben wird. Als interne Kontrollen für die Qualität der cDNA-Synthese und der *in-vitro* Transkription, wurden die Quotienten aus den 3´ und 5´ *Average Difference* -Werten (AD 3´/5´) der *Housekeeping* -Kontrollen GAPDH und Actin Probe Sets bestimmt. Die Quotienten sollten zwischen 1 und 2 liegen; Quotienten über 2 weisen z.B. auf inkomplette IVT-Reaktionen bzw. unvollständige cDNA-Synthesen hin.

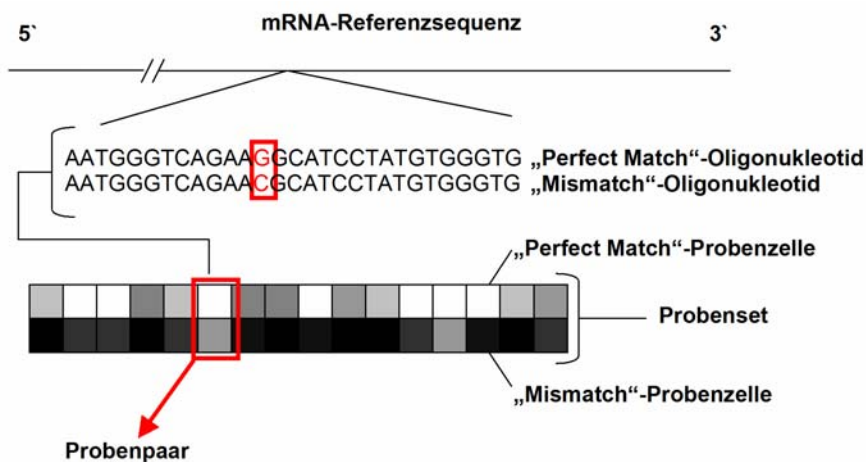


Abb. 23: Schematische Darstellung zum Aufbau eines Probensets eines Affymetrix-Oligonukleotid-GeneChips. Ein Probenpaar setzt sich aus 16 verschiedenen Probenpaaren zusammen, die jeweils aus einer *perfect match*- und einer *mismatch*-Probenzelle bestehen (Lipshutz und Fodor, 1999)

2.16.4 Vergleichende Expressions-Analyse

In biologischen Assays treten Variabilitäten der Daten auf, die durch nicht-biologische Faktoren beeinflusst werden. So können z.B. Schwankungen der Menge und Qualität der verwendeten cRNA, der Färbung oder andere experimentelle Variablen zu unterschiedlichen Hybridisierungs-Intensitäten führen. Um dennoch einen zuverlässigen Vergleich mehrerer Arrays durchzuführen, müssen diese Faktoren minimiert werden. Dies wird durch Skalierung des Arrays erreicht. Es ist bei allen Arrays ein globales Scaling über alle Probe Sets durchgeführt worden. Bei dieser Methode wurden die Daten jedes Experiments mit einem Skalierungsfaktor multipliziert, um alle Arrays auf eine identische Durchschnittsintensität zu bringen (Abb. 26).

Die Intensitäten jedes einzelnen Probenpaares wurden dazu verwendet, eine qualitative und quantitative Expressionsmessung durchzuführen. Durch den Vergleich der Signalintensitäten der Expressionsanalyse mit den Signalintensitäten eines Kontroll-Chips konnte die relative Abundanz eines Transkripts ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde der humane GeneChip-Satz HG-Focus der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) auf dem ca. 8.000 Gene repräsentiert werden, verwendet.

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden gemäß dem Affymetrix-Standardprotokoll durchgeführt (Abb. 24)

Tabelle 30: Reagenzien für Affymetrix-Mikroarrays

Komponente	Zusammensetzung
Antikörperlösung 1	10 µg/ml Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE), 1x Färbepuffer, 2 mg/ml acetyliertes BSA, RNase-freies Wasser
Antikörperlösung 2	100 µg/ml Ziegen-IgG, 3 µg/ml biotinylierter, Streptavidin- Antikörper, 1x Färbepuffer, 2 mg/ml, acetyliertes BSA, RNase-freies Wasser
5x Fragmentierungspuffer	200 mM Tris-Acetat (pH 8,1), 1,5 mM Kaliumacetat, 150 mM Magnesiumacetat
12x MES-Stock	1,22 M MES Natrium-Salz, 0,89 M MES freies saures Monohydrat
2x MES Hybridisierungspuffer	2x MES-Stock, 2 M NaCl, 40 mM EDTA, 0,02% Tween 20
2x Färbepuffer	2x MES-Stock, 1,85 M NaCl, 0,1% Tween 20
Waschpuffer, nicht-stringent	0,9 M NaCl, 60 mM NaH ₂ PO ₄ , 6 mM EDTA, 0,01% Tween 20
Waschpuffer, stringent	1x MES Stock, 26 mM NaCl, 0,01% Tween20
Hybridisierungscocktail	10 µg fragmentierte cRNA, Kontroll-cRNA: bioB, bioC, bioD und Cre, (1,5; 5; 25 und 100 pM), 50 pM Kontroll-Oligonukleotide, 0.1 µg/µl sonifizierte Hering-Spermien-DNA, 0.5 µg/µl acetyliertes BSA, 1x MES Hybridisierungspuffer

2.16.5 Synthese und Fragmentierung der Biotin-markierten cRNA

Die Synthese Biotin-markierter cRNA erfolgte unter Verwendung des ENZO BioArray High Yield RNA Transkript Labeling Kit nach Herstellerangaben (Cat: 42655-10, Enzo Diagnostic, Farmindale USA).

Tabelle 31: Komponenten des ENZO BioArray High Yield RNA Transkript Labeling Kits

Komponente	Beschreibung
10x T7 HY Reaction Buffer, 40 µl	Tris gepuffertes NaCl, MgCl ₂ und Spermidine, mit Stabilisierer
10x Biotin-markierte Ribonucleotide, 40 µl	10-fach konzentrierte Mischung aus ATP, CTP, GTP, UTP, Bio-UTP and Bio-CTP
10x DTT, 40 µl	100mM DTT
10x RNase Inhibitor Mix, 40 µl	20 units/µl in Storage Buffer
20x T7 RNA Polymerase, 20 µl	50 units/µl in Storage Buffer

Für die Synthese von Biotin-markierter cRNA wurde doppelsträngige cDNA als Ausgangsmaterial verwendet. Mit dem BioArray RNA Transcript Labeling Kit, das für den Gebrauch für Affymetrix Mikroarrays optimiert ist, wurde eine *in vitro*-Transkription für vier bis fünf Stunden bei 37 °C durchgeführt. Die T7-RNA-Polymerase synthetisierte einzelsträngige biotinylierte RNA-Moleküle (cRNA). Die Biotin-markierte cRNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit aufgereinigt und in 21 µl Wasser eluiert. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung der cRNA durch eine Adsorptionsmessung an einem Spektralphotometer bzw. Nanodrop.

20 µg cRNA wurde in Fragmentierungspuffer für 35 min bei 95°C fragmentiert. Der Ansatz wurde bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert.

2.16.6 Hybridisierung, Waschen und Scannen der Genechips

10 µg der fragmentierten cRNA und 100x Kontroll-cRNA Stock wurden wie folgt weiterbehandelt:

Tabelle 32:

Durchführung
Denaturierung für 5 min bei 65°C
Einsetzen in Hybridisierungscocktail
Denaturierung des Cocktails für 5 min bei 99°C.
Abkühlung auf 45°C für 5 min.
Prä-Hybridisierung des verwendeten Genechips für 10 min bei 45°C mit 1x MES Puffer.
Hybridisierung des Genechips mit 200 µl des abzentrifugierten Hybridisierungscocktails für 16 h bei 45°C unter Rotation

Durchführung
Waschen des Genechip in einer Waschstation (Affymetrix <i>Fluidics Station 400</i>) unter Verwendung des nicht-stringenten Waschpuffers (10x 2 <i>mixes</i> /25°C) und des stringenten Waschpuffers (4x 15 <i>mixes</i> /50°C) Programm Euk1-vs-Euk2.v3.
Zur Detektion und Verstärkung der Fluoreszenzsignale wird der Chip nacheinander mit den Antikörperlösungen 1 und 2 behandelt und abschließend gewaschen.
Scannen des Chips mit einer Auflösung von 3 µm/Pixel mit dem HP <i>Gene-Array-Scanner</i> (Affymetrix). Zur Identifizierung der einzelnen Probenzellen positioniert der Computer ein Gitter über den gesamten Chip (<i>Grid-Alignment</i>). Die Orientierung des Gitters erfolgt anhand der Kontroll-Oligonukleotide, die am Rand des Chips hybridisieren.

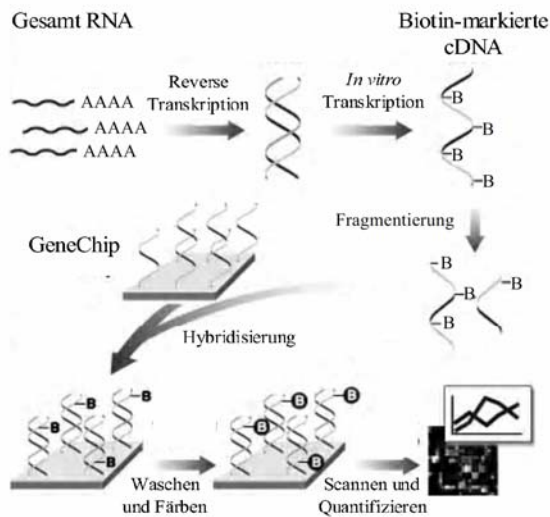


Abb. 24: Darstellung der Arbeitsschritte für ein Mikroarray-Experiment. Modifiziert nach Affymetrix (www.affymetrix.com).

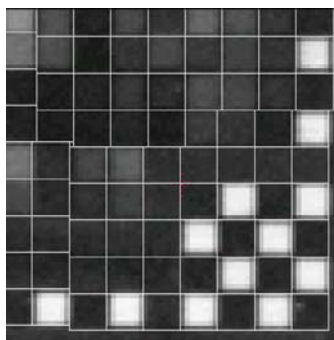


Abb. 25: *Grid-Alignment*. Nach dem Scannen wird ein Gitter über dem gesamten Chip positioniert. Die Kontroll-Oligonukleotide (Oligo B2), die am Rand des Chips hybridisieren, geben die Orientierung des Gitters an. Anhand des Gitters können die einzelnen Probenzellen identifiziert werden. Affymetrix, Mikroarray Suite" Users Guide, Version 5

2.17 Statistische Algorithmen für die Auswertung der Microarrays

2.17.1 Skalierung:

Zum Vergleich der Hybridisierungsmuster der einzelnen DNA-Array-Experimente wurden die Gesamtintensitäten der einzelnen DNA-Arrays normalisiert. Dazu wurde eine Kombination zweier Normalisierungsalgorithmen gewählt. Die erste Normalisierung wurde mit der Affymetrix-Standardsoftware (MAS5) durchgeführt. Hierbei erfolgte eine Skalierung der Gesamtintensitäten aller DNA-Arrays auf einen gemeinsamen Wert, wie in Abb. 26 gezeigt.

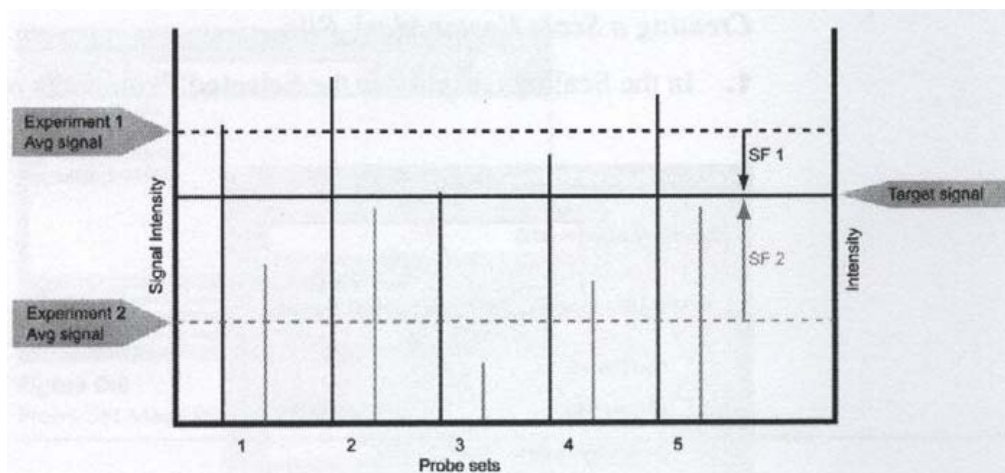


Abb. 26: *Scaling* Faktor. Standardisiert die durchschnittliche Signalstärke von jedem Experiment auf ein vom Benutzer festgelegten Wert. [nach Affymetrix, *Microarray Suite, User Guide*]

Unspezifische Nukleinsäurebindungen rufen ein so genanntes Hintergrund-Rauschen (*Background*) hervor. Dadurch erhält nahezu jede DNA Sonde einen Signalwert über Null. Um exprimierte Gene von nicht exprimierten Genen unterscheiden zu können, wurde das Verhältnis aus *perfect match* - zu *mismatch* -Intensitäten für jedes RNA-Transkript gebildet. Der MAS5 Algorithmus legte anhand diese Verhältnisses fest, ob ein Transkript detektierbar (*present call*) oder nicht detektierbar war (*absent call*).

Da die Nukleinsäure-Hybridisierungen den üblichen biologischen und technischen Schwankungen unterlagen, ist eine Normalisierung, basierend auf einer linearen Skalierung von Signalwerten problematisch. Daher erfolgte die Normalisierung in der Programmiersprache R (Version 2.1.1) zusätzlich mit Hilfe des im Bioconductor-Pakets implementierten RMA-Algorithmus (Gentleman *et al.*, 2004, Bolstad *et al.*, 2003, Irizarry *et al.*, 2003a, Irizarry *et al.*, 2003b). Hierbei wurde zunächst eine Hintergrundkorrektur durchgeführt. Das Ziel war die Verteilung der logarithmierten Hybridisierung-Intensitäten zwischen den verschiedenen Arrays anzugleichen. Eine erfolgreiche Normalisierung zeichnete sich durch nahezu identische Median-Hybridisierungssignal-Intensitäten der verschiedenen Arrays aus. Dies konnte in einer Box-Plot-Analyse

kontrolliert werden. Ein Box-Plot ist eine graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung einer Variablen, die Zentrum, Streuung, Schiefe und Spannweite der Verteilung (inkl. möglicher Ausreißer) in einer Grafik zusammenfasst. Die Box umfasste die Signalintensitäten zwischen 25 und 75 Perzentile. Der Median wurde durch einen senkrechten Strich in der Box verdeutlicht. Durch zwei Linien ober- und unterhalb der Box wurden mögliche Ausreißer gekennzeichnet.

2.17.2 Expressionsmatrix:

Nach der Normalisierung aller Arrays wurden die Signalintensitäten in Form einer Matrix erhalten, bestehend aus den verschiedenen Arrays und den verschiedenen Transkripten eines Arrays. Diese Anordnung wurde als Expressionsmatrix bezeichnet und war der Ausgangspunkt für weitere bioinformatische Analysen.

2.17.3 Korrelationsmatrix:

Durch die Berechnung eines Korrelationskoeffizienten zwischen zwei DNA-Arrays konnten Ausreißer beim Vergleich der einzelnen DNA-Arrays identifiziert werden. Für die Erstellung einer Korrelationsmatrix wurden die Korrelationskoeffizienten für alle möglichen Array-Paare berechnet. Da die Verteilung der logarithmierten Intensitäten eines DNA-Arrays nicht der Normalverteilung folgen muss, wurde eine nicht-parametrischer Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman gewählt.

2.17.4 SAM-Algorithmus:

Zur Identifizierung signifikanter Genexpressionen wurde der im Bioconductor implementierte SAM-Algorithmus angewendet (Tusher *et al.*, 2001). SAM steht für *Significance Analysis of Microarrays* und berechnet für jedes Gen ein Maß für die Genexpressionsänderung. Hierbei wurde für jedes Transkript in der Expressionsmatrix der Mittelwert über alle Signalintensitäten innerhalb eines Gewebetyps gebildet und die Differenz zwischen den Signal-Mittelwerten eines Transkripts aus den zu vergleichenden Gewebetypen gebildet. Um jedem Transkript eine relative Differenz (d_i) zuzuordnen wurde der Differenzwert zur Standardabweichung aller Expressionswerte pro Transkript ins Verhältnis gesetzt. Die Signifikanz der differenziellen Expression wurde mit Hilfe von Permutationen ein Gen-spezifischer t-Test berechnet. Bei der Permutation wurden pro Transkript die Signalwerte zwischen den verschiedenen Gewebetypen vertauscht und somit zusätzliche relative Differenzen berechnet. Der Mittelwert aller durch Permutation berechneten relativen Differenzen pro Transkript entsprach dem Erwartungswert (d_p), der mit dem berechneten Wert d_i verglichen wurde. Je größer die Differenz Δ

zwischen d_i und d_p war, je höher war die Signifikanz unterschiedlicher Genexpressionen eines Transkripts zwischen zwei Gewebetypen.

Der SAM-Algorithmus ermöglichte zudem die Bestimmung der Anzahl von zu erwartenden, falsch-positiven Ergebnissen bei einem vorgegebenen Grenzwert Delta. Es handelte sich hierbei um Transkripte, deren differenzielle Genexpression rein zufällig auftraten. Je größer Delta gewählt wurde, desto weniger falsch positive Ergebnisse waren zu erwarten und die Gruppe an signifikant veränderten Genexpressionen wurde kleiner. Ein Nachteil war, dass auch die Anzahl der *true positive* reduziert wurde.

2.17.5 Kombination aus RMA- und dem MAS5 Algorithmus zur Identifizierung exprimierter Gene

Zur Identifizierung differenziert exprimierter Gene bei der Prostata-Karzinogenese wurde mit dem RMA- (Irizarry *et al.*, 2003) und dem MAS5 Algorithmus (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) jeweils eine Expressionsmatrix erstellt, bestehend aus den untersuchten Gewebetypen und 8793 Transkripten. Anschließend wurden aus der RMA-Expressionsmatrix alle Transkripte eliminiert, die in der MAS5-Expressionsmatrix in jeder der drei Gruppen mindestens einen *absent call* aufwiesen. Für jedes Transkript jeder Gruppe wurde ein Mittelwert-Signal berechnet.

2.17.6 Clusteralgorithmen

Zur Identifizierung von Hybridisierungsmustern die unter allen durchgeführten Experimenten besonders ähnlich waren, wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Ziel dieser Methode war eine Einteilung der Proben und Gene in Klassen aufgrund der gemessenen (normalisierten) Expressionsprofile. Diese Analyse diente dazu Gruppen coregulierter Gene zu identifizieren, zur Identifikation von räumlichen oder zeitlichen Expressionsmustern, zur Qualitätskontrolle. Ferner zur Identifikation bisher unbekannter Tumorsubklassen, zur Überprüfung und zur Einteilung in bekannte und neue Tumorsubklassen und zur Identifikation experimenteller Verzerrungen (Artefakte). Auch simultanes Clustern von Genen und Proben war möglich.

Es wurden zwei Kategorien von hierarchischen Clusteranalyseverfahren unterschieden (divisiv und agglomerativ):

Es wird eine Hierarchie erzeugt von der untersten Stufe, in der jede Klasse ein Objekt (Expressionsprofil) enthält, bis zur höchsten, in der alle Objekte in einer Klasse sind. Dabei wird ein Abstandmaß (oder Ähnlichkeitsbegriff) zwischen zwei Expressionsprofilen von Genen/Proben festgelegt. Dieses Maß wird zur Definition des Abstandes eines Expressionsprofils zu einer Klasse und zwischen zwei Klassen angewendet.

- a. **Agglomerativ (AGNES)** bedeutet, dass von unten nach oben geclustert wird. Dabei ist jedes einzelne Expressionsprofil zu Beginn ein Cluster. In jedem weiteren Cluster-Schritt wurden die Expressionsprofile oder Cluster mit dem kleinsten Abstand zusammengefasst, bis am Ende alle Expressionsprofile in einem Cluster zusammengefasst sind.
- b. **Divisiv (DIANA)** bedeutet von oben nach unten clustern. Dieses Verfahren fasst zu Beginn alle Expressionsprofile zu einem einzigen Cluster zusammen. In jedem weiteren Cluster-Schritt erfolgt die beste Aufspaltung des Clusters, bis jedes Cluster nur noch ein Expressionsprofil enthält.

Die Darstellung der hierarchischen Klasseneinteilung ist typischerweise das Dendrogramm oder ein Color Image Plot.

Hierarchische Clusterverfahren vermeiden die Festlegung auf eine bestimmte Anzahl von Clustern, indem sie für jede Anzahl eine Einteilung bereitstellen.

Es wurden je nach Clustermethode verschiedene Abstandmaße für Vektoren $x=(x_1, \dots, x_n)$, $y=(y_1, \dots, y_n)$ verwendet, wie z.B. der Euklidische Abstand oder der Korrelationskoeffizient Manhattan Metrik.

Hierzu wurde zunächst mit der Funktion *daisy* in der Programmiersprache R eine euklidische Distanzmatrix zwischen allen möglichen Array-Paaren berechnet. Basierend auf dieser Distanzmatrix wurde anschließend ein Dendrogramm erzeugt, welches sehr ähnliche DNA-Array Hybridisierungsmuster in unmittelbarer Nachbarschaft zeigte.

$$\text{Formel für Euklidische Distanz: } d(i, j) = \sqrt{\sum_{i=1}^v (\text{MittelwertGruppe1}_i - \text{MittelwertGruppe2}_i)^2}$$

2.17.7 HOPACH-Analyse

Der hierarchische Cluster Algorithmus HOPACH (*Hierarchical Ordered Partitioning and Collapsing Hybrid*) ist eine Mischung aus einem agglomerativen und divisiven Clusterverfahren. Der Algorithmus generiert eine Hierarchie, indem wiederholt die Ausgangs Daten solange mittels des PAM Algorithmus aufgetrennt werden, bis in jedem Level der best mögliche Zusammenschluss erfolgt ist (Kaufman und Rousseeuw, 1990). HOPACH benutzt dabei die so genannten Mean/Median Split Silhouette (MSS) Kriterien um die homogensten Cluster eines Levels zu identifizieren (van der Laan und Pollard, 2003).

2.17.8 Standardabweichung

Die Standardabweichung (SD) ist in der Stochastik ein Maß für die Streuung der Werte einer Zufallsvariablen um ihren Mittelwert. Sie ist für eine Zufallsvariable X definiert als die positive Quadratwurzel aus deren Varianz und wird als $\sigma_x = \sqrt{\text{Var}(X)}$ notiert. Die Varianz einer Zufallsvariable ist das zentrierte Moment zweiter Ordnung der zugehörigen Verteilung, der Erwartungswert das erste Moment.

Liegt eine Beobachtungsreihe (x_1, x_2, \dots, x_N) der Länge N vor, so sind empirischer Mittelwert und empirische Standardabweichung die zwei wichtigsten Maßzahlen in der Statistik zur Beschreibung der Eigenschaften der Beobachtungsreihe.

2.18 Immunhistochemie (IHC)

2.18.1 Immunhistochemische Expressionsanalysen

Es wurden an Geweben mit duktalem Pankreaskarzinom und hormonresistenten Prostatakarzinom immunhistochemische Expressionsanalysen für das p53 Protein durchgeführt. In Geweben mit chronischer Pankreatitis wurden die Expression der Proteine p53, p16 und DPC4 in PanINs untersucht.

An Geweben der Prostatahyperplasie, des Prostatakarzinoms und des hormonresistenten Prostatakarzinoms wurden ferner immunhistochemische Analysen für die Proteine COX2 und BCL2 durchgeführt.

2.18.2 Protein-Überexpression

Zum Nachweis einer Überexpression von p53 und BCL2 Protein wurde das folgende Färbeprotokoll durchgeführt: Serienschnitte (4 μm) der Formalin fixierten in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden auf silanisierte Objektträger (Dako, Hamburg) aufgezogen und einer Färbung mittels des Tecan- Immunostainer Genesis RSP 200 für monoklonale *mouse* und polyklonale *rabbit* Primärantikörper unterzogen.

Tabelle 33: IHC-Protokoll-I

Reagenzien und Durchführung
Inkubation bei 56°C für 1 Stunde.
Entparaffinierung durch Inkubation in Xylen für 2 x 10 Minuten
Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe
100% Ethanol für 2 x 5 Minuten,
96% Ethanol für 2 x 5 Minuten und in
70% Ethanol für 2 x 5 Minuten.
Inkubation für 20 Minuten in 0,3%-iges Methanol-H ₂ O ₂ (30%-ig)-Bad bei RT

Reagenzien und Durchführung
abspülen der Schnitte in H ₂ O.
Antigen Demaskierung durch Erhitzen der Schnitte für 30 Minuten und
Bedampfung bei 96°C in Citratpuffer pH 6,0.

Die monoklonale Maus-Antikörper p53 RIA und BCL2 wurden 1:30 verdünnt eingesetzt. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hämatoxylin, im Anschluss wurden die Schnitte mit Aquatex (Fa. Merck) eingedeckt. Die Überexpression des p53 Proteins im Kern der Zelle wurde als positive Anfärbung gewertet, wobei die Evaluation der Färbung nach Baas *et al.* (1994) durchgeführt wurde: hoher Färbeindex (>30%), niedriger Färbeindex (>1%, <30%), negativ (<1%). Als Positivkontrolle dienten Schnittpräparate mit Pankreaskazinomgewebe und bekannter p53 Protein Überexpression. Als Negativkontrolle dienten Schnittpräparate ohne Inkubation mit dem Primärantikörper.

Zum Nachweis eines Ausfalls der Proteinexpression von p16, COX2 und DPC4 wurde ein modifiziertes IHC-Protokoll verwendet.

Abweichungen: von oben genanntem Protokoll sind die

- Inkubationszeit bei 56°C für 4 Stunden
- Verdünnung der monoklonalen Maus-Antikörper von 1:100.

Eine negative Färbereaktion für das p16 Protein wurde diagnostiziert bei fehlender Anfärbung des Zellkerns oder des Zytoplasmas der duktaalen Epithelien bei gleichzeitig positiver Anfärbung der Stromazellen (Wilentz *et al.*, 1998). Eine negative Färbereaktion für das DPC4 Protein wurde bei einer Anfärbung der Zellmembran und des Zytoplasmas der duktaalen Epithelien von weniger als 5% der Epithelien diagnostiziert. Der eingesetzte Antikörper galt als hoch spezifisch und sensitiv für die Detektion eines Gendefekts am *DPC4* Genlokus bei Ausfall des DPC4 Proteins (Wilentz *et al.*, 2000). Als weitere Positivkontrolle dienten Schnittpräparate mit Pankreaskazinomgewebe und bekanntem Ausfall des p16 Protein und DPC4 Protein. Als Negativkontrolle dienten Schnittpräparate ohne Inkubation mit dem Primärantikörper.

2.19 Interphase-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Neben der molekulargenetischen Analyse der PanIN Läsionen in chronischer Pankreatitis wurden auch zytogenetische Analysen mittels Interphase Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (Interphase-FISH) an Laser mikrodisszierten PanINs zur Bestimmung des Aneuploidiestatus durchgeführt. Diese Arbeiten erfolgten in enger Zusammenarbeit mit

Herrn Mario Baumgart, Klinik für Allgemeinchirurgie Universitätsklinik Göttingen (PD Dr. med. B.M. Ghadimi; Leiter: Prof. Dr. H. Becker).

An 10 µm dicken Serienschnitten der zuvor mittels PCR untersuchten PanINs wurden jeweils zwei Centromer-DNA-Sonden (Qbiogene, Heidelberg) nach Markierung mit unterschiedlichen Fluorochromen hybridisiert. Es wurde ein 2-Farben-FISH-Assay zusammengestellt, bei der entweder Sonden für die Centromere 7 und 8 oder für die Centromere 7 und 17 eingesetzt wurden.

Das Laser mikrodissizierte Gewebe wurde wie folgt behandelt:

Tabelle 34: Zellkernaufbereitung

Reagenzien und Durchführung
Entparaffinierung und Rehydrierung wie oben beschrieben.
Inkubation mit Protease XXIV bei 45°C für 60 min.
Pipettieren der Kernsuspension auf eine Spezialsäule (60 µm Matrix)
Zentrifugation für 5 min bei 10.000 rpm Überstand verwerfen.
Pellet mit 1x PBS waschen, zentrifugieren, Überstand verwerfen.
Fixieren der isolierten Kerne mit einem Methanol und Essigsäure Gemisch (3:1)
Lösung auf positiv geladenen OT tropfen
Dehydrieren und bis zur FISH-Analyse bei -20°C aufbewahren

Es wurden FISH-Sonden für Chromosomen gewählt, die aufgrund kürzlich veröffentlichter CGH Ergebnisse häufig eine Aneuploidie in duktalem Pankreaskarzinomen zeigten (Solinas-Toldo *et al.*, 1996; Mahlamäki *et al.*, 1997 und 2002; Gorunova *et al.*, 1998; Ghadimi *et al.*, 1999). Zur Aufdeckung der chromosomalen Aneuploidie wurden für das *dual-colour* FISH Experiment Centromer spezifische *alpha-satellite* Sonden für die Chromosomen 3 (D3Z1, Rhodamine), 7 (D7Z1, Rhodamine), 8 (D8Z1, Fluorescein) und 17 (D17Z1, Fluorescein) (Qbiogene, Heidelberg, Germany) gewählt.

Nach der Hybridisierung folgte die Detektion. Hier wurden die Objektträger zunächst einer Reihe von Waschvorgängen unterzogen, die den Hybridisierungsmix von den Objektträgern abwuschen.

Tabelle 35: FISH

Reagenzien und Durchführung
4 x waschen SSC (Natrium Chlorid, Natrium Citrat) / 0,3% NP-40 (nicht ionisches Detergenz) bei RT für 30 min
Inkubation mit M NaSCN bei 80°C für 30 min
Slides auf RT bringen und 2 x waschen mit SSC für 5 min
Inkubation mit 0,005% Pepsin in 0,01N Hydrochlorid
2 x waschen in SSC, dehydrieren und lufttrocknen
Hybridisieren nach Herstellerangaben
2µl jeder Probe wird mit Hybridisierungspuffer auf ein Endvolumen von µl gebracht
Aufbringen auf OT, eindecken und mit Fixogum abdichten
Denaturieren bei 80°C für 5 min
Inkubation für 12-16 h bei 37°C
Deckgläser entfernen und 4 x mit SSC / 0,3% NP-40 für 3 min waschen
2 x waschen mit SSC bei RT für 5 min
Dehydrieren, lufttrocknen und mit Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'-6'-Diamidino-2-phenylindol) gegenfärben

Es wurden mindestens 100 Kerne pro mikrodissierter Probe ausgezählt und die Hybridisierungs-Signale mit einem Leica DM-RBE Mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) ausgewertet. Es wurden die Filter FITC und TRITC (Chroma Technologies, Rockingham, USA) mit x63 oder x100 Planarobjektiv (Leica) eingesetzt. Die Bildaufnahme erfolgte über eine mit einem Mikroskop verbundene CCD-Kamera Sensys, Photometrics, München, Germany). Die Auswertung erfolgte mittels der Leica CW-4000 Software.

2.20 Patientenkollektive.

Die untersuchten in Paraffin eingebetteten Gewebe entstammten von Patienten mit chronischer Pankreatitis, normaler Kolon Mucosa, Kolonkarzinom, Prostatahyperplasie und Prostatakarzinom aus dem Archiv des Instituts für Pathologie Klinikum Kassel.

2.20.1 Patienten mit chronischer Pankreatitis.

Von 21 Patienten mit chronischer Pankreatitis standen in Paraffin eingebettete Gewebepblöcke zur Verfügung. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Resektion lag zwischen 34 und 78 Jahren (Median 55,23 Jahre). Sechzehn der Patienten waren männlich, fünf weiblich. Die Ursache der chronischen Pankreatitis war nur bei zwei Patienten aus den klinischen Angaben gesichert (CP9 und CP10), hier lag ein langzeitiger Alkohol- und Nikotinkonsum zu Grunde.

Tabelle 36: Patienten mit **Pancreatic Intraepithelial Neoplasias**

Patient ID	PanIN
CP1	0, 1a, 1b, 2, 3, DM
CP2	0, 1a, 1b, 2, 3, DM
CP3	0, 1a, DM
CP4	1a, 2
CP5	1a, 1b, 2,
CP6	2
CP7	0, 1a, 1b, 2
CP8	0, 1a, 1b, 2, DM
CP9	0, 1a, 1b, 2, DM
CP10	0, 1a, 1b, 2, 3, DM
CP11	0, 1a, 1b, 2, DM
CP12	1a, 1b, DM
CP13	0, 1a, 1b, 2
CP14	0, DM
CP15	0, 1a, 1b, DM
CP16	0, 1a, 1b, 2, DM
CP17	0, 1a, 1b, 2, DM
CP18	0, 1a, 1b, 2,
CP19	0, 1a,
CP20	1a, 1b, DM
CP21	0, 1a, 1b, DM

2.20.2 Patienten mit normaler Kolon Mucosa und Kolonkarzinom

Tabelle 37: Patienten mit normaler Kolon Mucosa und Kolorektal Karzinom

Patient ID	TNM
C3	pT3,pN1,pMX,R0, G2
C5	pT2,pN0,pMX,R0, G2
C7	pT3,pN0,pMX, R0, G2
C8	pT2,pN0,pMX,R0,G2
C9	pT4,pN2,pMX,R1,G3
C10	pT4,pN0,pMX,R1,G3
N273	-
N282	-
N301	-
N335	-
N367	-

TNM:

- T= Tumor, Beschreibung von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors
- N= Nodus = Lymphknoten, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen
- M= Metastasen, Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen

prep. Art: TUR = transurethrale Prostata-Gewebe-Resektion; TR = totale Prostatektomie

2.20.2 Patienten mit Prostatakarzinom

Tabelle 38 Patienten mit Prostatakarzinom

Patient ID	Diagnose	Alter	TNM	% Tumor-Zellen	prep. Art
PCA_121	PCA	74	M81 40/3 G2 pT4a pN2 pM1 R0	90	TUR
PCA_193	PCA	65	klinisch gesichertes PCA	90	TUR

TNM:

- T= Tumor, Beschreibung von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors
- N= Nodus = Lymphknoten, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen
- M= Metastasen, Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen

prep. Art: TUR = transurethrale Prostata-Gewebe-Resektion; TR = totale Prostatektomie

2.20.3 Patienten mit hormonsensitivem Prostatakarzinom

Tabelle 39 Patienten mit hormonsensitivem Prostatakarzinom

Patient ID	Diagnose	Alter	TNM	% Tumor-Zellen	prep. Art
BPH_132	BPH/PCA	58	M81 40/3 G3 pT2c pN0 pMX R0	/	TUR
PCA_17	PCA	65	M81 40/3 G2-3 pT2c pN0 pMX R0	70	TR

TNM:

- T= Tumor, Beschreibung von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors
- N= Nodus = Lymphknoten, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen
- M= Metastasen, Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen

prep. Art: TUR = transurethrale Prostata-Gewebe-Resektion; TR = totale Prostatektomie

2.20.4 Patienten mit frühem hormonrefraktärem Prostatakarzinom

Tabelle 40 Patienten mit frühem hormonrefraktärem Prostatakarzinom

Patient ID	Diagnose	Alter	TNM	% Tumor-Zellen	prep. Art
HRPC_269	HRPC	68	M81 40/3 G2 pT2c pN0 pMX R0	90	TUR
HRPC_120	HRPC	56	M81 40/3 G2 pT2c pN0 pMX R0	80	TUR
HRPC_125	HRPC	67	M81 40/3 G2 pT2c pN0 pMX R0	90	TUR
HRPC_122	HRPC	57	M81 40/3 G3 pT2c pN0 pMX R1	90	TUR

TNM:

- T= Tumor, Beschreibung von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors
- N= Nodus = Lymphknoten, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen
- M= Metastasen, Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen

prep. Art: TUR = transurethrale Prostata-Gewebe-Resektion; TR = totale Prostatektomie

2.20.5 Patienten mit spätem hormonrefraktärem Prostatakarzinom

Tabelle 41 Patienten mit spätem hormonrefraktärem Prostatakarzinom

Patient ID	Diagnose	Alter	TNM	% Tumor-Zellen	prep. Art
HRPC_58	HRPC	89	M81 40/3 G3 pT3a pNX pMX R1	90	TUR
HRPC_126	HRPC	63	M81 40/3 G2 pT2c pNO pMX R0	90	TUR
HRPC_123	HRPC	82	M81 40/3 G2 pT3a pNX pMX R0	80	TUR
HRPC_124	HRPC	83	M81 40/3 G3 pT2c pNO pMX R0	90	TUR

TNM:

- T= Tumor, Beschreibung von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors
- N= Nodus = Lymphknoten, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen
- M= Metastasen, Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen

prep. Art: TUR = transurethrale Prostata-Gewebe-Resektion; TR = totale Prostatektomie

2.20.6 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie

Tabelle 42 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie

Patient ID	Diagnose	Alter	TNM	% Tumor-Zellen	prep. Art
BPH_142	BPH	62	benigne Prostata Hyperplasie	/	TUR
PCA_193	BPH	65	klinisch gesichertes PCA	90	TUR
BPH_138	BPH	68	benigne Prostata Hyperplasie	/	TUR
BPH_217	BPH	63	benigne Prostata Hyperplasie	/	TUR
BPH_199	BPH	64	benigne Prostata Hyperplasie	/	TR
BPH_132	BPH/PCA	58	M81 40/3 G3 pT2c pNO pMX R0	/	TUR

TNM:

- T= Tumor, Beschreibung von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors
- N= Nodus = Lymphknoten, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen
- M= Metastasen, Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen

prep. Art: TUR = transurethrale Prostata-Gewebe-Resektion; TR = totale Prostatektomie

2.21 Substanzen und Geräte.

Tabelle 43: Substanzen und Geräte

Substanz / Gerät	Hersteller
ABC-Immunhistochemie	Ventana Biotech Systems, Tucson, AZ
Aqueous Mounting Medium	Aquatex, Merck, Darmstadt, GR
Agarose	Bio Whittaker BMA, Rockland, ME, USA
Antikörper DPC4	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA
Antikörper p53 DO7	Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK

MATERIAL UND METHODEN

Substanz / Gerät	Hersteller
Antikörper p16	Pharmingen, Heidelberg, GR
Anti-Taq Antikörper	Gibco, Eggenstein, GR
Aqua dest.	Merck, Darmstadt, GR
Big Dye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Biotech Techmate 1000 Immunostainer	Ventana Biotech Systems, Tucson, AZ
CCD-Kamera Gel Doc 1000	Bio Rad, Hercules, CA, USA
DMSO	Roth GmbH, Karlsruhe, GR
DNA molecular weight marker II	Roche, Penzberg, GR
DNA-Isolationskit	Qiagen, Valencia, CA, USA
EDTA-Lösung	Merck, Darmstadt, GR
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt, GR
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, GR
Falconröhrchen	Falcon, Fisher Scientific, Springfield, NJ, USA
Hämatoxylin/Eosin	Merck, Darmstadt, GR
Injektionsnadeln steril	Microlance, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Laser Mikrodisektionsmikroskop	Leica, Wetzlar, GR
Master Cycler	Eppendorf, Hamburg, GR
Membrane Slides for Lasermicrodissection	Molecular Machines & Industries, Glattbrugg, CH
Methylenblau	Merck, Darmstadt, GR
Microcon-100 Microconcentrators	Amicon Inc. Beverly, MA, USA
Mikromanipulator MP285	Sutter Instruments, Novato, CA, USA
MJ Research Thermocycler PTC100	MJ Research, Watertown, MA, USA
PCR Primer	City of Hope, Ca, USA
PCR Reagenzien	Roche, Penzberg, GR
Pepsin	Sigma-Aldrich, Schnellendorf, GR
Perkin Elmer 9600 Thermocycler	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Probe-on Slides	Ventana Medical Systems, Tucson, AZ
Proteinase K	Qiagen, Valencia, CA, USA
Protease Typ XXIV	Sigma-Aldrich, Schnellendorf, GR
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, GR
Silanisierte Objektträger	DAKO, Hamburg, GR
Sonden Centromere 7, 8, 17	Qbiogene, Heidelberg, GR
Taq Expand High Fidelity Polymerase	Roche, Basel, CH
Taq PCR Puffer	Roche, Basel, CH
Tecan-Immunostainer Genesis RSP 200	TECAN, Crailsheim, GR
Tungsten Nadeln	Frederick Haer, Brunswick, MA, USA
Tween 20	Roche, Basel, CH

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zur Wertigkeit von Biomarkern der frühen Karzinogenese beim duktalem Pankreaskarzinom, in Geweben chronischer Pankreatitis sowie kolorektalen Karzinomen und hormonresistenten Prostatakarzinomen.

3.1.1 Immunhistochemische Expressionsanalysen der Tumor-Suppressor-Gene *p16^{INK4}*, *p53* und *DPC4* in Geweben chronischer Pankreatitis

Es wurden immunhistochemische Expressionsanalyse von Pankreaskarzinomen und deren Vorläuferläsionen durchgeführt, weil hierdurch eine indirekte Funktionskontrolle von Genen auf Proteinebene im Gewebe möglich war. Hierbei konnte z.B. eine Überexpression eines Proteins auf eine vorliegende Mutation im Gen hindeuten. Auch eine negative Protein-Färbung im Vergleich zum sonst positiv gefärbten Normalgewebe, konnte auf eine vorliegende Genmutation hindeuten.

Immunhistochemisch untersucht wurden Formalin fixierte in Paraffin eingebettete Gewebe (FFPE-Gewebe) von zehn Patienten mit chronischer Pankreatitis auf Expressionen der Proteine p53, p16 und DPC4. Die Ergebnisse wurden im Anschluss mit den molekulargenetischen Untersuchungen korreliert.

Es wurden 262 Pankreasgänge analysiert. 73 Gänge zeigten normales Epithel, 104 Gänge PanIN-1A, 44 Gänge mit PanIN-1B, 25 Gänge PanIN-2 und 16 Gänge PanIN-3. PanIN-3 Läsionen konnten nur bei Studienpatient CP10 gefunden werden.

Es wurden weder eine p53 Proteinüberexpression noch ein Verlust der Anfärbung für DPC4 Protein in PanIN-1A bis PanIN-2 in den Gewebeproben der Patienten CP 1-9 gefunden. Ein Expressionsverlust des p16 Proteins wurde in fünf PanIN-2 Läsionen (20%) nachgewiesen. PanIN-1A, -1B und DM Läsionen zeigten eine reguläre p16 Proteinexpression.

Im Gewebe von CP10 war eine schwache Überexpression von p53 Proteins in zwei von 16 PanIN-2 Läsionen (12%) festzustellen. Dabei lag gleichzeitig ein LOH und eine heterozygote Sequenzänderung im Exon 8 (siehe Abb: 28) am p53 Genlokus vor. Alle PanIN-3 Läsionen wiesen eine *p53* Überexpression auf, die in den Gangepithelien unterschiedlich stark ausgeprägt waren (Abb. 27). Gleichzeitig war in diesen Läsionen kein p16- und DPC4 Protein detektierbar. In zehn der 16 PanIN-2 Läsionen (62%) zeigte p16 Protein vereinzelt Färbeverlust. In vier dieser PanIN-2 Läsionen war gleichzeitig ein *p16^{INK4}*-LOH festzustellen oder eine Sequenzänderung im Exon 2 des *p16^{INK4}* Gens.

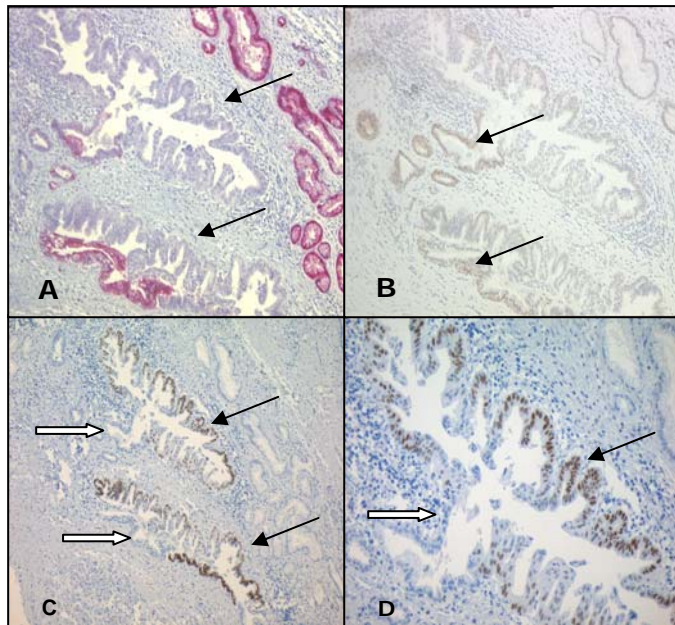


Abb. 27: Immunhistochemische Detektion von p16, DPC4 und p53 Protein in einer PanIN-3-Läsion des Studienpatienten CP10. (A) Ausfall der Proteinexpression für p16 (dunkle Pfeile) und (B) DPC4-Protein im Gangepithel mit hochgradiger Kerndysplasie der und deutlicher Architekturstörung des Epithels (helle Pfeile). In (C) und (D) ist eine Überexpression von p53 (dunkle Pfeile) zu erkennen von dem nicht das gesamte Epithel betroffen ist (helle Pfeile). (A, B x100; C x40; D x200).

3.1.2 Molekulargenetische Analysen von Geweben mit chronischer Pankreatitis

Die Gewebeproben aus chronischer Pankreatitis wurden des Weiteren molekulargenetischer Analyse unterworfen. Es erfolgte eine Gen Analyse mittels Mikrosatelliten-PCR für $p16^{INK4}$, $p53$ und $DPC4$. Eine Gensequenzanalyse der Gene $p16^{INK4}$ und $p53$ wurde bei Studienpatient CP10 durchgeführt.

Es wurden die in Tabelle 19 aufgeführten MSI-Primer verwendet, welche in der Literatur für die LOH-Analyse und Detektion homozygoter Deletionen der Gene $p16^{INK4}$ und $DPC4$ beschrieben wurden (Cairns *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 1996).

Aus den Geweben von 21 Patienten mit chronischer Pankreatitis wurden insgesamt 443 normale Gänge, duktale Metaplasie sowie PanIN Läsionen Laser mikrodissiziert. Die Anzahl der Gänge in den einzelnen Patientengeweben lag zwischen 3 und 108 Gängen.

Die Resultate der Mikrosatellitenanalyse der Genloci $p53$, $p16^{INK4}$ und $DPC4$ sind in Tabelle 44 zusammengefasst. Von den 443 mikrodisszierten Gängen wurden aus 389 (87,8%) Gängen geeignete DNA zur Mikrosatelliten- und Sequenzanalyse isoliert. Im Einzelnen wurden 74 normale Gänge, 81 Duktale Metaplasien, 122 PanIN-1A, 66 PanIN-1B, 31 PanIN-2 und 15 PanIN-3 Läsionen mittels Mikrosatellitenanalyse untersucht. PanIN-3 Läsionen konnte nur im Gewebe des Studienpatienten CP10 gefunden werden. Eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wurde in sieben von 389 (1,8%) Gängen diagnostiziert, davon fünf Läsionen (2 DM, 2 PanIN-1A, 1 PanIN-1B) bei zwei Studienpatienten am $DPC4$ -Lokus und zwei Läsionen (1 DM und 1 PanIN-2) bei einem Studienpatient am $p16^{INK4}$ -Lokus.

Tabelle 44: Mikrosatellitenanalyse der Tumor-Suppressor-Gene *p53*, *p16^{INK4}* und *DPC4*

PanIN	<i>p53</i> -LOH	<i>p16^{INK4}</i> -LOH	<i>DPC4</i> -LOH
N	0/59 (0%)	0/51 (0%)	1/53 (1,8%)
DM	1/59 (1,7%)	4/69 (5,8%)	1/40 (2,5%)
1A	2/97 (2,1%)	2/74 (2,7%)	0/99 (0%)
1B	0/60 (0%)	1/65 (1,5%)	1/43 (2,3%)
2	4/34 (11,8%)	6/36 (16,7%)	3/32 (9,4%)
3	9/15 (60%)	8/15 (53%)	12/15 (80%)

* in Geweben von 21 Patienten mit chronischer Pankreatitis. Gegeben ist die LOH-Frequenz einzelner Tumor-Suppressor-Gene in Prozent der jeweils informativen Gänge. N = normaler Gang; DM = Intraduktales papilläres-muzinöses Neoplasie-Läsion

Es kam zu einer Akkumulation von Mutationen aller drei Tumor-Suppressor-Gene mit steigendem PanIN Grad (Tab. 47). Ein signifikanter Anstieg der LOH-Ereignisse war für den *p53* und *p16^{INK4}* Genlokus im Übergang von PanIN-1B zu PanIN-2 zu erkennen (*p16^{INK4}*: $p=0,02$; *p53*: $p=0,012$). Am *DPC4* Genlokus konnte eine Zunahme der LOH-Ereignisse gezeigt werden, die jedoch nicht signifikant war ($p=0,191$). Im Übergang von PanIN-2 zu PanIN-3 war ein signifikanter Anstieg der LOH-Ereignisse der Genloci aller drei Tumor-Suppressor-Gene (*p16^{INK4}*: $p=0,042$; *p53*: $p=0,011$; *DPC4*: $p=0,001$) zu erkennen. Die in den duktales Metaplasien verzeichnete LOH-Rate von 5,8% am *p16^{INK4}* Lokus war nicht signifikant höher im Vergleich zur LOH-Rate der Genloci *p53* ($p=0,203$) und *DPC4* ($p=0,303$). In den untersuchten Gangläsionen wurden nur LOHs eines Tumor-Suppressor-Gens gefunden. Eine Ausnahme hiervon bildeten die Gangläsionen von Studienpatient CP10, welcher unten separat aufgeführt wird. Eine homozygote Deletion der Gene *p16^{INK4}* und *DPC4* wurde in keiner Gangläsion aller untersuchten Studienpatienten mit chronischer Pankreatitis detektiert.

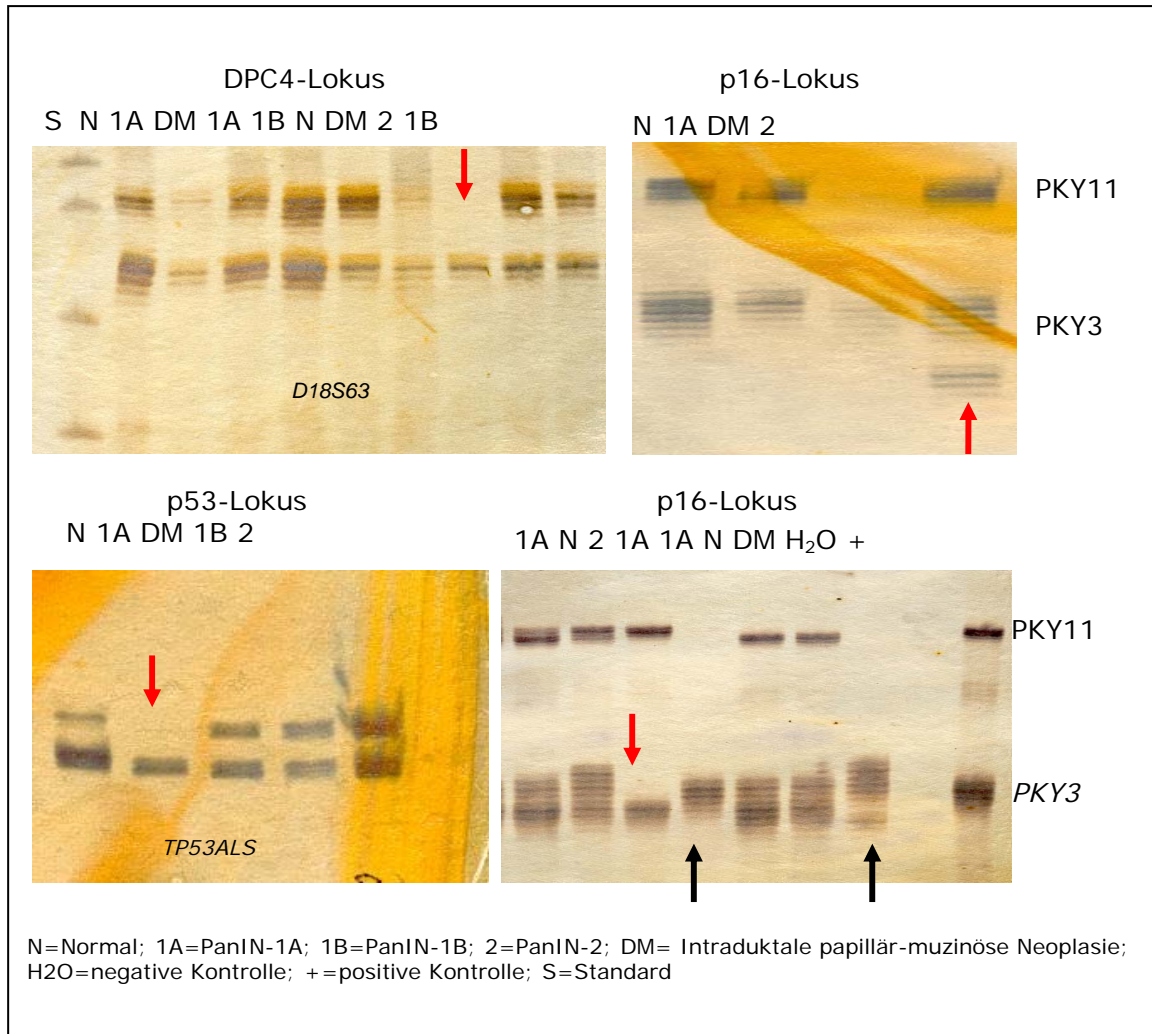


Abb. 28: Beispiele für LOH am $p16^{INK4}$ Locus, $p53$ Locus und $DPC4$ Locus. Laser mikrodyssezierte Zellgruppen wurden durch I-PEP-PCR präamplifiziert und die LOH mit nachfolgender spezifischer Mikrosatelliten-PCR nachgewiesen. Um potenzielle homozygote Deletionen am $p16^{INK4}$ -Locus und $DPC4$ -Locus zu entdecken wurde eine Multiplex-PCR mit dem Primer *PKY11* durchgeführt (längeres PCR-Produkt, obere Banden am $p16^{INK4}$ -Locus, im $DPC4$ -Locus nicht im Bild), welcher eine Genregion zwischen dem $p16^{INK4}$ -Gen und $p15$ -Gen markiert. Oben links: Am $DPC4$ Locus fand sich ein LOH in Reihe 8 in einer DM-Probe (roter Pfeil). Oben rechts: Am $p16^{INK4}$ Locus konnte eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden (Reihe 4, zusätzliche Banden (roter Pfeil)). Unten links: Am $p53$ Locus fand sich ein LOH in Reihe 2 in einer PanIN-1A Probe (roter Pfeil). Unten rechts: Am $p16^{INK4}$ Locus konnte ein LOH in Reihe 3 in einer PanIN-2 Probe nachgewiesen werden (roter Pfeil). In Reihe 4 (PanIN-1A Probe) und Reihe 7 (MD) ist ein Pseudo-LOH (schwarze Pfeile) zu erkennen, welches in nachfolgender Mikrosatelliten PCR nicht bestätigt werden konnte.

Da der Studienpatienten CP10 eine ungewöhnlich hohe Anzahl an PanIN-2 und PanIN-3 Läsionen zeigte, wurde dieser isoliert von den anderen Studienpatienten betrachtet und besonders intensiv molekulargenetisch und zusätzlich zytogenetisch untersucht.

In der Sequenzanalyse von $p16^{INK4}$ Gens sind fünf Punktmutationen detektiert worden. Drei der Mutationen waren in Exon 2 und zwei im Intron 1. Das $p53$ Gen wies eine Sequenzänderung im Exon 8 auf. Die Prolin nach Leucin Transition im Exon 8 des $p53$ Gens wurde in heterozygoter Form bei einer duktaalen Metaplasie und einer PanIN-1A nachgewiesen. In PanIN-2 und PanIN-3 Läsionen wurde sowohl eine heterozygote als

auch eine homozygote Sequenzänderungen nachgewiesen. Diese Prolin nach Leucin Transition konnte in allen PanIN-3 Läsionen gefunden werden, wobei es sich in der Mehrzahl um homozygote Sequenzänderungen handelte. In nur einer der 15 mikrodisszierten PanIN-3 Läsionen konnte kein detektierbares LOH am *p53* Genlokus gefunden werden. Drei der vier PanIN-3 Läsionen mit heterozygoten Sequenzänderungen im Exon 8 des *p53* Gens zeigten ein LOH in der Mikrosatellitenanalyse. In PanIN-2 Läsionen wurde die Prolin nach Leucin Transition im Exon 8 des *p53* Gens in sechs der 16 mikrodisszierten Gänge detektiert, wobei die Hälfte der Sequenzänderungen in heterozygoter Form auffielen. Zwei der drei heterozygoten Sequenzänderungen wurden in der Mikrosatellitenanalyse von einem LOH begleitet, die beiden anderen LOHs wurden zusammen mit homozygoten Sequenzänderungen nachgewiesen. In zwei der homozygoten Sequenzänderungen im Exon 8 konnte kein LOH zu detektiert werden. Ein LOH ohne begleitende Sequenzänderung im Exon 8 wurde nicht gefunden.

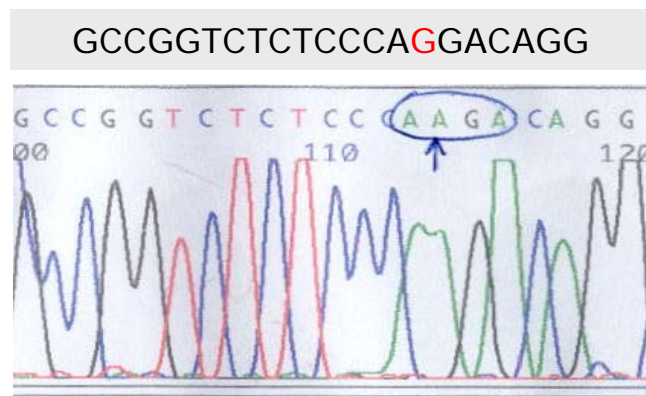


Abb. 29: Die Sequenz Analyse zeigt einen Nucleotid-Austausch von C → T in Exon 8 (bp-835) des *TP53* gene mit einem Aminosäure-Austausch von Prolin nach Leucin

Die Sequenzanalyse von Exon 1 und Exon 2 des *p16^{INK4}* Gens ergab ein ähnliches Spektrum von Sequenzänderungen und begleitendem LOH in der Mikrosatellitenanalyse. Im *p16^{INK4}* Gen konnten insgesamt fünf Mutationen gefunden werden, wobei eine Insertion von zwei Basen (TG, Pos. 263, Exon 2) in 19 PanINs nachgewiesen worden ist, davon nur einmal in heterozygoter Form (eine PanIN-2 Läsion ohne begleitendes LOH am *p16^{INK4}* Genlokus in der Mikrosatellitenanalyse). Alle PanIN-3 Läsionen zeigten die Insertion im Exon 2, wobei nur in acht Fällen gleichzeitig ein LOH am *p16^{INK4}* Genlokus detektiert wurde. In 2 der 3 PanIN-2 Läsionen sowie der DM-Läsion konnte ein LOH bei gleichzeitiger Insertion, in 3 PanIN-2 Läsionen sind LOHs ohne begleitende Sequenzänderung gefunden werden.

Eine G>A Transition im Exon2 (Pos 277) ohne gleichzeitige Insertion wurde in einer PanIN- 2 und einer DM nachgewiesen, wobei hier ein LOH am *p16^{INK4}* Genlokus nicht gefunden wurde.

Ferner wurde eine C>T Transition im Exon 2 (bp 344, Arg>Cys) ohne LOH in einer PanIN-2 nachgewiesen. Im Intron 1 konnte eine C>T Transition in einer PanIN-1A (heterozygot, ohne LOH) in einer Entfernung von 25 bp zum Beginn des Exon 2 sowie

ERGEBNISSE

eine G>A Transition (homozygot ohne LOH) 12 bp vom Beginn des Exon 2 entfernt gefunden werden.

Während alle PanIN-3 Läsionen sowohl *p16^{INK4}* als auch *p53* Gensequenzänderungen aufwiesen und in 80% ein LOH am *DPC4* Genlokus nachgewiesen worden war, war in sechs der 16 PanIN-2 Läsionen (38%) und in zwei der neun DM (22%) ein LOH oder eine Sequenzänderung in zwei der drei untersuchten Gene detektiert worden. In PanIN-1A und PanIN-1B Läsionen wurden keine multiplen Genalterationen gefunden.

Ein LOH am *DPC4* Genlokus wurden in 12 (80%) der PanIN-3 Läsionen und in 3 (19%) der PanIN-2 Läsionen nachgewiesen. Eine Sequenzanalyse des *DPC4* Gens wurde nicht durchgeführt.

Tabelle 45: Sequenzänderungen der Gene *p16^{INK4}* und *p53* im Gewebe des Studienpatienten CP10.

PanIN	n	p16 insTG Exon 2 (bp263)	p16 G>A Exon 2 (bp277)	p16 C>T Exon 2 (bp344)	p16 C>T Intron1 (bp-25)	p16 G>A Intron1 (bp-12)	p53 C>T Exons 8 (bp14501)
N	14	0	0	0	0	0	0
DM	9	1 (11%)	1 (11%)	0	0	0	1 (11%)het
1A	13	0	0	0	1(8%)	0	1 (8%)het
1B	9	0	0	0	0	1(11%)	0
2	16	3 (19%), 1het	1 (6%)	1 (6%)	0	0	6 (38%), 3het
3	15	15(100%)	0	0	0	0	15(100%), 4het

*n = mikrodissizierte Pankreasgänge; het = heterozygote Sequenzänderung; N = normaler Gang; DM = Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie Läsion

Tabelle 46: Gesamte Sequenzänderungen

PanIN	n=	p16 Seq.	p53 Seq.	het. Seq.	p16 LOH	p53 LOH	DPC4 LOH
No	14	0	0	0	0	0	0
DM	9	2 (22%)	1 (11%)	2 (22%)	2 (22%)	0	0
1A	13	1 (8%)	1 (8%)	2 (16%)	0	0	0
1B	9	1(11%)	0	0	0	0	0
2	16	4 (25%)	6 (38%)	4 (25%)	5 (31%)	4 (25%)	3 (19%)
3	15	15(100%)	15(100%)	4 (25%)	8 (53%)	9 (60%)	12 (80%)

Übersicht über die Mutationen der Gene *p16^{INK4}* und *p53* sowie gesamte LOH der Genloci *p16^{INK4}*, *p53* und *DPC4* im Gewebe des Studienpatienten CP10. n = informative mikrodissizierte Pankreasgänge; Seq = Sequenzänderung; het = heterozygote Sequenzänderung; No = normaler Gang; DM = Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie Läsion

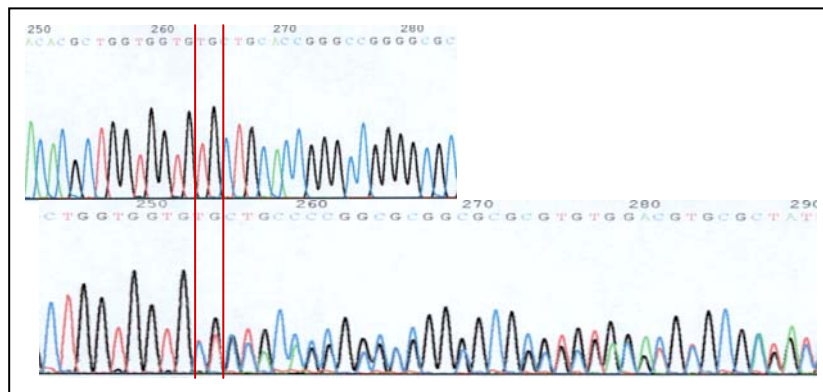


Abb. 30: Sequenzausschnitt $p16^{INK4}$ Exon 2 Studienpatient CP10. Oben: Homozygote Insertion TG bp 263 PanIN-3. Unten: Heterozygote Insertion TG bp 263 PanIN-2.

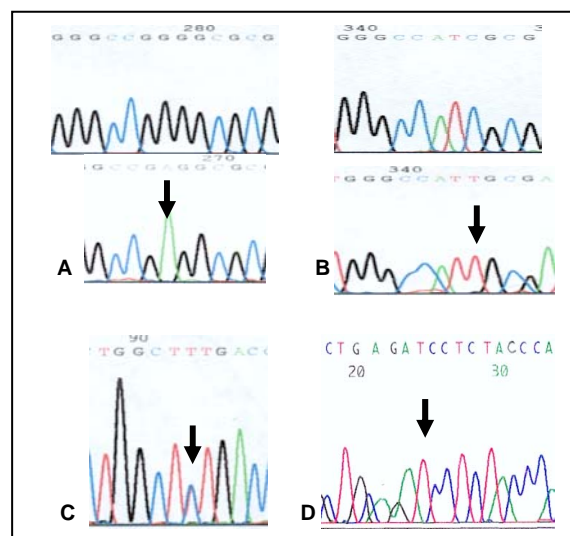


Abb. 31: Sequenzausschnitt $p16^{INK4}$ Intron 1 und Exon 2 Studienpatient CP10.
 A: $p16^{INK4}$ Exon 2 Transition G>A (Pfeil) bp 277 (gly/glu) Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie.
 B: $p16^{INK4}$ Exon 2 Transition C>T (Pfeil) bp 344 (arg/cys) PanIN-2.
 C: $p16^{INK4}$ Intron 1 heterozygote Sequenzänderung C>T (Pfeil) bp -25 PanIN-1A.
 D: $p16^{INK4}$ Intron 1 Transition G>A bp -12 PanIN-1B. Gezeigt ist die Upstream-Sequenz C>T (Pfeil).

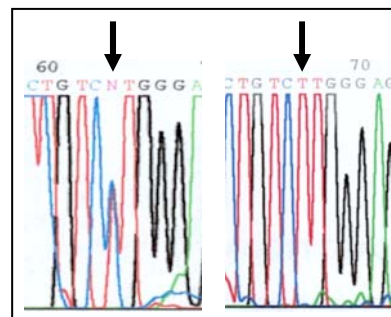


Abb. 32: Sequenzausschnitt $p53$ Exon 8 Studienpatient CP10. Links: Heterozygote Sequenzänderung Transition C>T (Pfeil) bp14501 (pro/leu) DM. Rechts: Homozygote Sequenzänderung Transition C>T (Pfeil) bp14501 (pro/leu) PanIN-3.

3.1.3 Interphase-FISH bei chronischer Pankreatitis.

In ausgewählten PanINs, DM und normalen Pankreasgängen wurde bei Studienpatient CP10 eine zytogenetische Analyse mittels Interphase-FISH zur Untersuchung einer Aneuploidie der duktaalen Epithelien durchgeführt. Eingesetzt wurden Sonden, welche an den Centromeren der Chromosomen 7, 8, und 17 hybridisieren. Von manuell mikrodisssezierten Pankreasgängen wurden die Signale von 237 bis 300 Kernen einzelner Gangläsionen ausgezählt (Abb. 33), wobei jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde (Tab. 50). Es konnte ein gradueller Anstieg aneuploider Zellkerne der Gangläsionen DM und PanIN im Vergleich zum normalen Gangepithel festgestellt werden. Dabei waren zwischen 3% und 8% der Kerne mit vom diploiden Chromosomensatz mit abweichenden Signalen detektiert worden. In DM waren zwischen 15% und 18% der Zellkerne mit aneuploiden Signalen nachgewiesen worden. Insbesondere bei Chromosom 8 und 17 konnten Monosomien gefunden werden, was auf einen LOH hindeutet. Die Anzahl aneuploider Zellkerne in PanIN-1A und PanIN-1B Läsionen unterschieden sich nicht wesentlich. Die Anzahl aneuploider Zellkerne lag zwischen 10% (Chromosom 7) und 18% (Chromosom 17). In PanIN-2-Läsionen waren 8 bis 21% der Zellkerne aneuploid (Chromosom 7). Für die untersuchten Regionen wurden Monosomien häufiger gefunden als Trisomien und Tetrasomien (Tab. 50) In PanIN-3 Läsionen wurden die höchsten Anzahlen aneuploider Zellkerne gefunden. Die Anzahl lag zwischen 18% (Chromosom 7) und 29% (Chromosom 17). Tetrasomien wurden nur in vereinzelt Kernen detektiert, höhergradige zytogenetische Alterationen konnten nicht nachgewiesen werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 33, 34 und Tabellen 50 und 51 dargestellt.

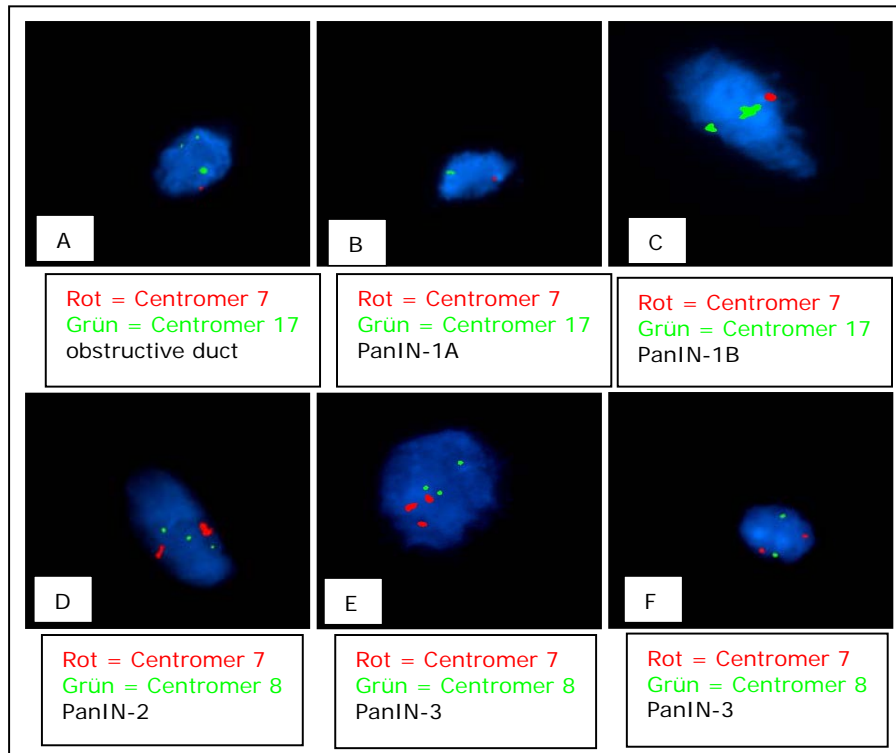


Abb. 33: Repräsentative Beispiele für die Messung der Aneuploidie in Zellen von PanINs und DM nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von Centromersonden der Chromosomen 7, 8 und 18.
 A: Monosomie -Chromosom 7, Trisomie Chromosom 17 eines Zellkerns einer DM.
 B: Monosomie Chromosom 7, Trisomie Chromosom 17 eines Zellkerns einer PanIN-1A.
 C: Monosomie Chromosom 7, Disomie Chromosom 17 eines Zellkerns einer PanIN-1B.
 D: Disomie Chromosom 7, Trisomie Chromosom 8 eines Zellkerns einer PanIN-2.
 E: Trisomie Chromosom 7, Trisomie Chromosom 8 eines Zellkerns einer PanIN-3.
 F: Diploider Chromosomensatz Centromer 7 und 8 eines Zellkerns einer PanIN-3.

Tabelle 47: Ergebnisse der Auszählung der FISH-Signale einzelner Gangläsionen.

Angegeben ist das Ergebnis nach Dreifachauszählung bei Patient CP10.

Fall	Anzahl Kerne	PanIN	Ploidie Ch 7					Ploidie Ch 8					Ploidie Ch 17				
			1	2	3	4	>= 5	1	2	3	4	>= 5	1	2	3	4	>= 5
CP10	260	Normal	1	97	1	1		4	94	1	1		4	92	2	2	
CP10	230	DM	5	85	8	1		11	82	6	1		12	82	5	1	
CP10	282	1a	8	90	2			10	88	2			12	83	4	1	
CP10	300	1b	8	85	7			7	88	4	1		13	84	3		
CP10	300	1b	10	85	5			9	86	5			13	82	4	1	
CP10	260	2	13	79	8			12	81	7			13	82	5		
CP10	237	2	4	92	3	1		8	86	5	1		12	82	6		
CP10	254	3	7	82	9	2		8	80	11	1		11	71	17	1	
CP10	300	3	11	82	6	1		13	77	9	1		11	78	10	1	

Ch = Chromosom

Tabelle 48: Ergebnisse der Auszählung der FISH-Signale einzelner Gangläsionen. Angegeben ist das Ergebnis nach Dreifachauszählung aller untersuchten Patienten

PanIN	Anzahl		Ploidie		CEP3					
	Läsionen	Kerne	Mono	SD	Di	SD	Tri	SD	Tetra	SD
Normal	5	500	3,0	0,8	94,0	0,0	2,5	1,3	0,5	1,0
1	2	200	2,5	0,7	89,5	0,7	7,0	0,0	1,0	0,0
2	6	590	7,0	1,8	84,3	0,8	8,0	0,9	0,7	0,8
3	5	500	8,3	1,4	79,5	1,8	11,3	0,8	0,8	1,0
DM	5	500	5,8	2,2	84,5	1,7	9,6	1,3	0,1	0,3

PanIN	Anzahl		Ploidie		CEP7					
	Läsionen	Kerne	Mono	SD	Di	SD	Tri	SD	Tetra	SD
Normal	8	760	2,7	1,2	95,1	1,5	1,6	0,5	0,6	0,5
1	14	1319	6,7	2,8	88,5	3,3	4,6	2,1	0,2	0,4
2	10	950	8,6	2,6	83,3	2,7	7,7	1,8	0,3	0,4
3	11	1054	8,8	1,6	81,1	1,2	8,8	2,3	1,3	0,8
DM	8	730	6,7	2,2	85,6	1,1	6,8	2,4	0,7	0,7

PanIN	Anzahl		Ploidie		CEP8					
	Läsionen	Kerne	Mono	SD	Di	SD	Tri	SD	Tetra	SD
Normal	8	760	3,9	1,2	94,0	1,4	1,6	0,5	0,5	0,5
1	14	1319	7,4	2,7	87,5	1,5	4,6	1,8	0,5	0,5
2	10	950	9,0	2,1	83,2	1,4	7,3	0,7	0,5	0,5
3	11	1054	9,7	2,7	79,5	1,4	10,1	1,3	1,0	0,7
DM	8	730	8,8	1,8	84,0	1,6	6,7	1,7	0,5	0,5

PanIN	Anzahl		Ploidie		CEP17					
	Läsionen	Kerne	Mono	SD	Di	SD	Tri	SD	Tetra	SD
Normal	8	780	4,1	1,7	93,7	1,7	1,4	0,5	0,6	0,9
1	14	1319	10,6	4,3	84,0	2,9	4,7	1,5	0,7	0,7
2	9	850	9,9	2,2	83,6	1,7	6,0	1,2	0,5	0,4
3	11	1054	8,9	2,1	77,4	3,7	12,2	2,9	1,5	0,7
DM	8	730	9,9	1,5	82,8	0,8	6,8	1,6	0,5	0,7

PanIN-1 = PanIN-1a + PanIN-1b; SD = Standardabweichung

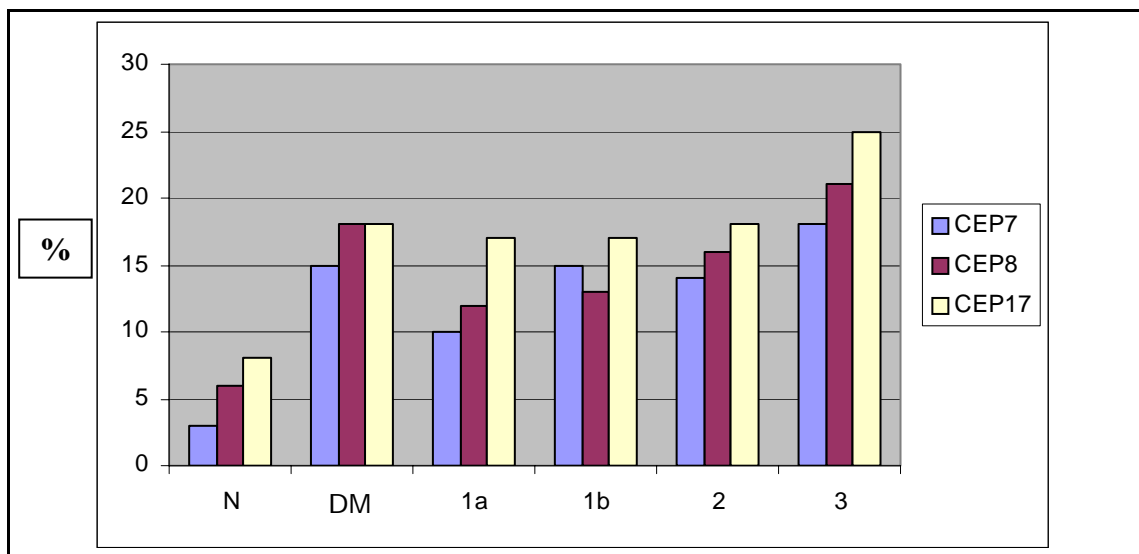


Abb. 34: Anzahl aneuploider Zellkerne in % nach FISH der Centromere der Chromosomen 7 (CEP 7), 8 (CEP8) und 17 (CEP 17) in Zellen von normalem Pankreasgang (N), Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (DM), PanIN-1A (1a), PanIN-1B (1b), PanIN-2 (2) und PanIN-3 (3).

3.2 Mikroarray-Expressionsanalysen von Kolon- und Prostatakarzinomgewebe

3.2.1 RNA-Qualitätskriterien

Die 8 µm dicken Kryomikrotomschnitte normaler Mucosa und Tumorgewebe wurden aus nativen Kolongeweben nach dem HE-Protokoll und dem Arcturusprotokoll angefärbt und Lasermikrodisseziert. Anschließend erfolgte die RNA Isolierung. Mittels des Agilent Bioanalyzer wurde die RNA Qualität überprüft. Die Degradation der RNA der nach dem Arcturus Protokoll gefärbten Proben war deutlich weiter fortgeschritten (Abb. 35, Spur 1 und 2) im Vergleich zum Standard HE-Protokoll (Abb. 35, Spuren 3 und 4).

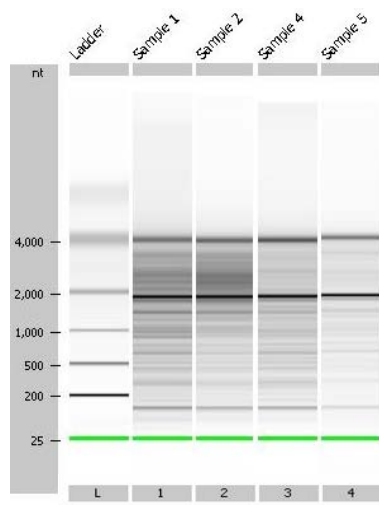


Abb. 35: Darstellung eines digitalen Gelbild (Agilent Bioanalyzer), Proben 1 und 2 werden nach Arcturus Protokoll gefärbt und Proben 3 und 4 mit HE gefärbt. Die 28S/18S Ratio der Proben 1 und 2 lag bei 0,6 und die der Proben 3 und 4 bei 0,9. Sample 1 und 2 Kolongewebeproben mit Arcturus Protokoll gefärbt. Sample 3 und 4 Kolongewebeproben mit Standard HE-Protokoll gefärbt

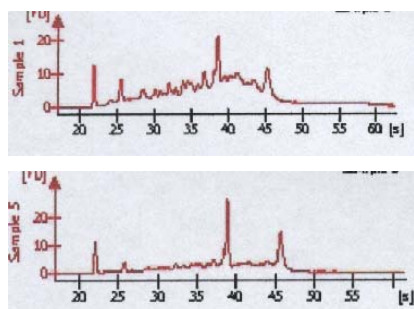


Abb. 36: Mittels Bioanalyzer erstellte Elektropherogramme der Spur 1 oberes Bild und 4 unteres Bild aus Abb. 35

Nach der Färbung und Mikrodissektion wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy-Micro Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und am Bioanalyzer die Qualität der RNA bestimmt

Die Abbildungen zeigen die ermittelten 28S/18S Ratio und die Area under Curve (AUC) für RNA aus Kolonkarzinomgewebe *versus* Normalgewebe. Die Ratio musste $\geq 0,8$ und die AUC musste $\geq 10\%$ sein, um gute Ergebnisse erzielen zu können

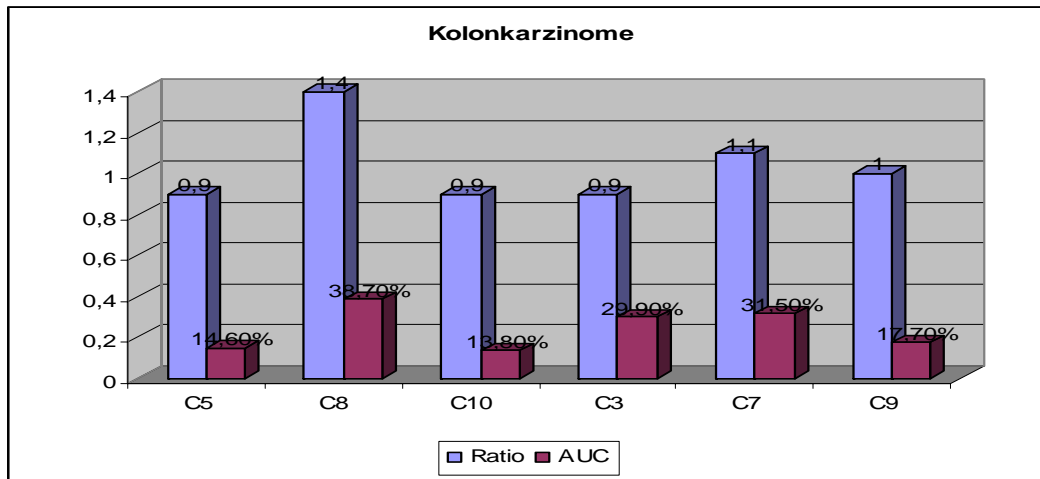


Abb. 37: Darstellung des 28S/18S Ratios und der AUC von Kolonkarzinomgeweben

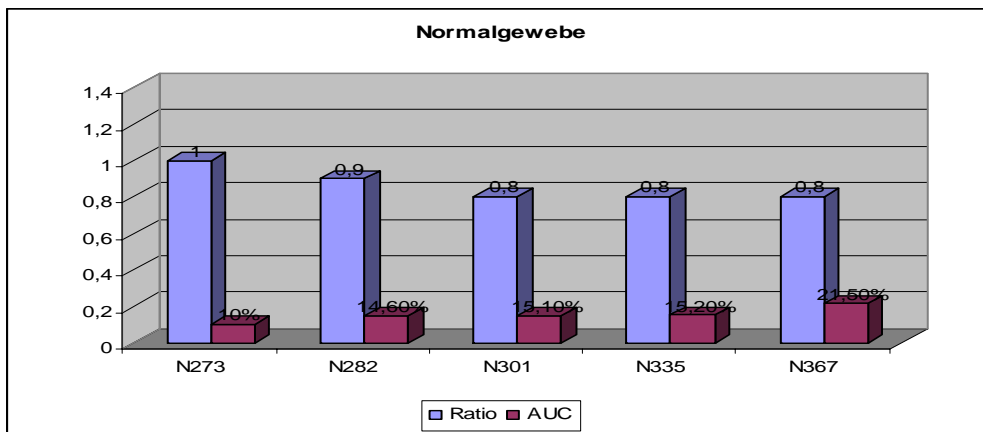


Abb. 38: Darstellung des 28S/18S Ratios und der AUC der Normalgewebe.

Die Histogramme zeigten, dass alle Proben den festgelegten Qualitätsstandards, $\text{Ratio} \geq 0,8$ und $\text{AUC} \geq 10\%$ genügten. Die durchschnittliche RNA-Qualität der Normalgewebe war geringer im Vergleich zum Gewebe der Adenokarzinome.

3.2.2 Identifizierung differenziell regulierter Gene in Kolonkarzinomgeweben

Zur Identifizierung differenziell regulierter Gene (Vergleich Normalgewebe des Kolon mit Kolonkarzinomgewebe) wurden die Expressionsdaten mittels des SAM-Algorithmus (*Significance Analysis of Microarray*) ausgewertet. Der Algorithmus verringert die Anzahl falsch-positiv detektierte Gene (*false discovery rate*, FDR). Mit einer vorgegebenen FDR von 0,001 sind 100 signifikant differenziell exprimierte Transkripte identifiziert worden (Tabelle 49).

Diese Analyse gibt ferner den so genannten *p-value* und *d-value* für jedes Gen an. Der *p-value* gibt die statistische Signifikanz der differenziellen Expression eines Gens an, der *d-*

value das Maß der Deregulation. Ein negatives Vorzeichen gibt dabei eine Reprimierung an.

Tabelle 49: Genliste der differenziell exprimierten Gene

Rang	<i>d-value</i>	<i>p-value</i>	Gen-Name
1	19.3	0	<i>minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 3 (MCM3)</i>
2	-18.2	0	<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 2 (galectin 2) (LGALS2)</i>
3	16.5	0	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma (avian) oncogene family, protein G (MAFG)</i>
4	13.9	0	<i>bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B (BAZ1B).</i>
5	13.6	0	<i>POP7 (processing of precursor, S. cerevisiae) homolog, clone MGC:1986</i>
6	-12.8	0	<i>guanylate cyclase activator 1B (retina) (GUCA1B)</i>
7	-12.6	0	<i>endothelin 3 (EDN3)</i>
8	12.2	0	<i>serinethreonine kinase 15 (STK15)</i>
9	-11.8	0	<i>sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 2 polypeptide (SCN2A2)</i>
10	11.4	0	<i>protein regulator of cytokinesis 1 (PRC1)</i>
11	11.4	0	<i>serinethreonine kinase 6 (STK6)</i>
12	10.9	1.00E-05	<i>flap structure-specific endonuclease 1, clone MGC:8478</i>
13	-10.9	1.00E-05	<i>IgG Fc binding protein (FC(GAMMA)BP)</i>
14	10.8	1.00E-05	<i>cell division protein FtsJ (FJH1)</i>
15	10.7	1.00E-05	<i>Human ionizing radiation resistance conferring protein mRNA</i>
16	10.6	1.00E-05	<i>core-binding factor, beta subunit (CBFB), transcript variant 2</i>
17	10.5	1.00E-05	<i>pregnancy-associated plasma protein A (EST)</i>
18	10.3	1.00E-05	<i>v-MYC avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC)</i>
19	10.3	1.00E-05	<i>cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)</i>
20	10.2	1.00E-05	<i>Scd mRNA for stearyl-CoA desaturase</i>
21	10.2	1.00E-05	<i>retinoid x receptor interacting protein (LOC51720)</i>
22	-10.1	1.00E-05	<i>flavin containing monooxygenase 5 (FMO5)</i>
23	10.1	1.00E-05	<i>Human ovarian beta-A inhibin mRNA</i>
24	9.9	1.00E-05	<i>ribonuclease H1 (RNASEH1)</i>
25	9.9	1.00E-05	<i>HMT1 (hnRNP methyltransferase, S. cerevisiae)-like 2 (HRMT1L2)</i>

Rang	d-value	p-value	Gen-Name
26	9.8	1.00E-05	<i>ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain) (ENC1)</i>
27	9.7	1.00E-05	<i>nucleolin (NCL)</i>
28	-9.7	1.00E-05	<i>solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 4 (SLC17A4)</i>
29	9.7	1.00E-05	<i>GTF2I repeat domain-containing 1 (GTF2IRD1)</i>
30	9.6	1.00E-05	<i>EST</i>
31	9.6	1.00E-05	<i>EST</i>
32	-9.6	1.00E-05	<i>Solute carrier family 26, member 3 (SLC26A3). DRA (Downregulated in Adenoma)</i>
33	-9.6	1.00E-05	<i>calcium-activated chloride channel protein 1 (CaCC1)</i>
34	9.5	1.00E-05	<i>heat shock 70kD protein 9B (mortalin-2), clone MGC:8684</i>
35	9.4	1.00E-05	<i>histone fold protein CHRAC17</i>
36	9.4	1.00E-05	<i>ribonucleotide reductase M2 polypeptide, clone MGC:1551</i>
37	-9.4	1.00E-05	<i>toll-like receptor 3 (TLR3)</i>
38	-9.3	1.00E-05	<i>hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2 (HSD11B2)</i>
39	9.3	1.00E-05	<i>meiotic checkpoint regulator (MCPR)</i>
40	9.2	1.00E-05	<i>minichromosome maintenance deficient (mis5, S. pombe) 6 (MCM6)</i>
41	-9.2	1.00E-05	<i>GC36</i>
42	9.2	1.00E-05	<i>replication factor C (activator 1) 3 (38kD), clone MGC:5276</i>
43	9.2	1.00E-05	<i>non-POU-domain-containing, octamer-binding (NONO)</i>
44	9.2	1.00E-05	<i>neighbor of COX4 (NOC4)</i>
45	9.1	1.00E-05	<i>transcription factor-like 1 (TCFL1)</i>
46	9.0	1.00E-05	<i>Human 2HOR0202</i>
47	9.0	1.00E-05	<i>cDNA: FLJ21804 fis, clone HEP00746, highly similar to HSU64791</i>
48	-9.0	1.00E-05	<i>chromogranin A (parathyroid secretory protein 1) (CHGA)</i>
49	8.9	1.00E-05	<i>EST</i>
50	8.9	1.00E-05	<i>similar to rat HREV107, clone MGC:1240</i>
51	8.9	1.00E-05	<i>farnesyl diphosphate synthase (farnesyl pyrophosphate synthetase)(FDPS)</i>
52	-8.9	1.00E-05	<i>Similar to villin-like, clone MGC:10896</i>

ERGEBNISSE

Rang	d-value	p-value	Gen-Name
53	8.8	1.00E-05	<i>RNA binding protein 1 (RNABP1)</i>
54	8.8	1.00E-05	<i>budding uninhibited by benzimidazole 1 (yeast homolog), beta (BUB1B)</i>
55	8.8	1.00E-05	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1)</i>
56	8.7	2.00E-05	<i>Human CDw44 antigen</i>
57	8.6	2.00E-05	<i>EST</i>
58	8.6	2.00E-05	<i>minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 2 (mitotin) (MCM2)</i>
59	8.5	2.00E-05	<i>dyskeratosis congenita 1, dyskerin (DKC1)</i>
60	8.5	2.00E-05	<i>proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 5, clone MGC:2175</i>
61	8.5	2.00E-05	<i>DNJ3CPR3</i>
62	-8.5	2.00E-05	<i>solute carrier family 21 (prostaglandin transporter), member 2 (SLC21A2)</i>
63	-8.5	2.00E-05	<i>tachykinin 3 (neuromedin K, neurokinin beta) (TAC3)</i>
64	8.5	2.00E-05	<i>brain cellular apoptosis susceptibility protein (CSE1) mRNA</i>
65	8.4	2.00E-05	<i>proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7 (PSMB7)</i>
66	8.3	3.00E-05	<i>spermine synthase (SMS)</i>
67	-8.3	3.00E-05	<i>Alcohol dehydrogenase 3 (class I), gamma polypeptide (ADH3).</i>
68	8.3	3.00E-05	<i>U2 (RNU2) small nuclear RNA auxillary factor 1 (non-standard symbol) (U2AF1)</i>
69	8.3	3.00E-05	<i>16.7Kd protein (LOC51142).</i>
70	8.3	3.00E-05	<i>thyroid hormone receptor interactor 13 (TRIP13)</i>
71	8.3	3.00E-05	<i>ribophorin I (RPN1)</i>
72	8.2	3.00E-05	<i>EST</i>
73	-8.2	3.00E-05	<i>amiloride binding protein 1 (amine oxidase (copper-containing)) (ABP1).</i>
74	8.1	3.00E-05	<i>timeless (Drosophila) homolog (TIMELESS)</i>
75	8.1	3.00E-05	<i>folate transportercarrier (LOC81034)</i>
76	-8.1	3.00E-05	<i>IMAGE-2270843</i>
77	8.1	3.00E-05	<i>EST</i>
78	8.1	3.00E-05	<i>Human snRNP polypeptide B</i>
79	8.1	3.00E-05	<i>Human L-iditol-2 dehydrogenase</i>
80	8.1	3.00E-05	<i>EST</i>

Rang	d-value	p-value	Gen-Name
81	8.0	3.00E-05	<i>EST</i>
82	7.9	3.00E-05	<i>EST</i>
83	7.9	4.00E-05	<i>chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta) (CCT7)</i>
84	7.9	4.00E-05	<i>lysyl-tRNA synthetase mRNA</i>
85	7.9	4.00E-05	<i>EST</i>
86	7.8	4.00E-05	<i>isolate Liv chaperone protein HSP90 beta (HSP90BETA)</i>
87	7.8	4.00E-05	<i>NCK adaptor protein 2, clone MGC:1698</i>
88	7.8	4.00E-05	<i>XPMC2 protein (LOC57109)</i>
89	7.8	4.00E-05	<i>protein disulfide isomerase related protein (calcium-binding protein, intestinal-related), clone MGC:8346</i>
90	7.8	4.00E-05	<i>Chromosome 21 open reading frame 45 (C21ORF45).</i>
91	7.8	4.00E-05	<i>DNA sequence from clone RP3-322L4 on chromosome 6</i>
92	7.7	4.00E-05	<i>EST</i>
93	7.7	4.00E-05	<i>chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma) (CCT3)</i>
94	7.7	4.00E-05	<i>non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in (NME1)</i>
95	7.6	4.00E-05	<i>transketolase (tk)</i>
96	7.6	5.00E-05	<i>ribonucleotide reductase M1 polypeptide (RRM1)</i>
97	7.6	5.00E-05	<i>EST</i>
98	7.6	5.00E-05	<i>15.5 kD RNA binding protein</i>
99	7.5	5.00E-05	<i>EST</i>
100	7.5	5.00E-05	<i>palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)</i>

Aus diesen 100 differenziell exprimierten Genen wurden sieben signifikant exprimierte Gene gefunden, von denen sechs Zellzyklus relevant und an der Telomer Erhaltung beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um *MCM2*, *MCM3*, *MCM6*, *CDK4*, *c-MYC*, *DKC1*. Bei *SLC26A3 (DRA)* handelt es sich um ein Tumor-Suppressor-Gen, dessen Expression sich auf die Mukosa von Kolon-Normalgewebe beschränkt (Schweinfest *et al.*, 1993). Die Expression von DRA in Adenokarzinomen des Kolon war im Vergleich zum Normalgewebe signifikant in der Expression reduziert. Diese Ergebnisse konnten mittels RT-PCR bestätigt werden.

3.2.3 RNA-Qualität von Formalin-fixiertem Kolon-Gewebe

Ziel dieser Untersuchung war der Vergleich zwischen Frischgewebe und fixierten Gewebeproben im Hinblick auf die RNA-Qualität.

Zur Untersuchung der RNA Qualität aus aservierten Gewebeproben wurden Formalin-fixierte Paraffin (FFPE) Gewebeproben von Normal- und Tumorgewebe des Kolons ausgewählt, die in den Jahren zwischen 2001 und 2005 im Institut für Pathologie am Klinikum Kassel gesammelt worden waren. Um auszuschließen, dass die Färbe- bzw. Isolierungsmethode Einfluss auf die RNA-Qualität und -Quantität hat, wurden verschiedene Methoden angewandt. Ferner wurde untersucht, ob Fixieren und Einbetten unter Routinebedingungen die gleiche Ausbeute und Qualität erzielt, im Vergleich zur Gewebeaufbereitung unter sterilen Bedingungen.

Zur Optimierung der RNA-Qualität nach Isolierung aus FFPE-Geweben wurden verschiedene Parameter der Gewebeaufarbeitung, manuelles abkratzen von Gewebeschnittpräparaten, Zelldissektion mittels Lasermikrodissektion und verschiedene Färbemethoden auf ihren Einfluss auf die RNA-Degradation hin untersucht. Dazu wurden die Zellgewinnungsverfahren mit folgenden Färbemethoden kombiniert: Standard HE, Methylenblau, Arcturus und Toluidinblau (Abbildungen 39 bis 43).

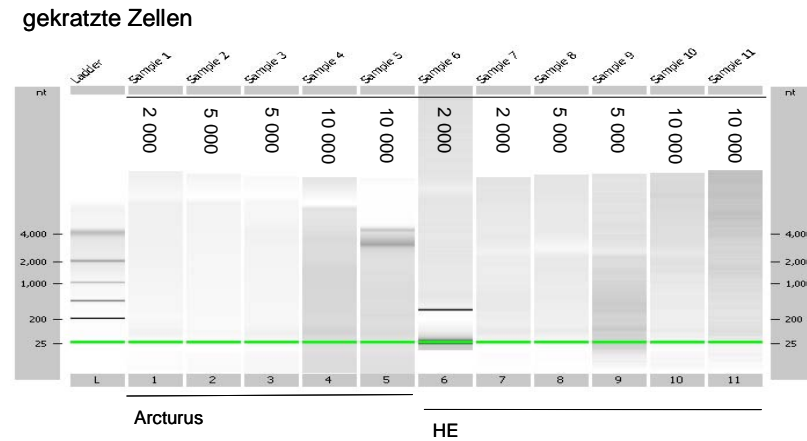


Abb. 39: Gelbild gekratzter Zellen nach Isolierung mit Hilfe des Paradise-Kits und Arcturus bzw. HE-Färbung. Weder Isolierungs- noch Färbemethode scheint brauchbar zu sein.

gekratzte Zellen

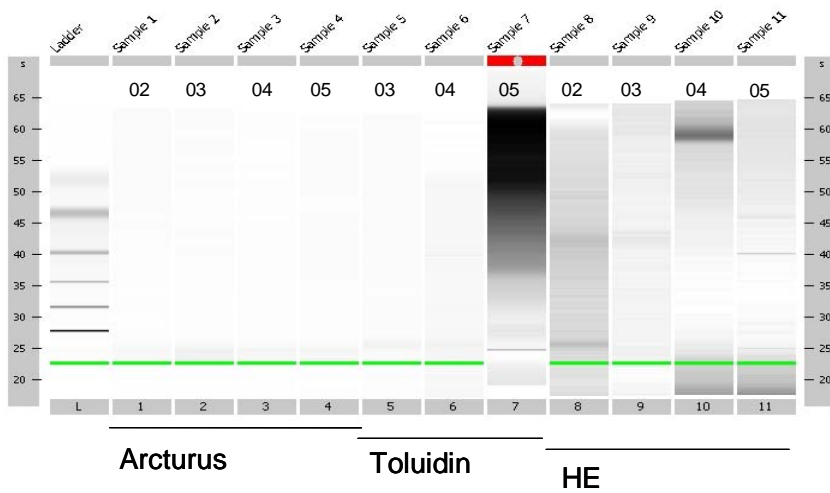


Abb. 40: Gelbild gekratzter Zellen nach Isolierung mit Hilfe des Qiagen-Kits und Arcturus-, Toluidin- bzw. HE-Färbung. Hier ist zu erkennen, dass neuere Blöcke mit HE-Färbung am geeignetsten erscheinen.

gekratzte Zellen

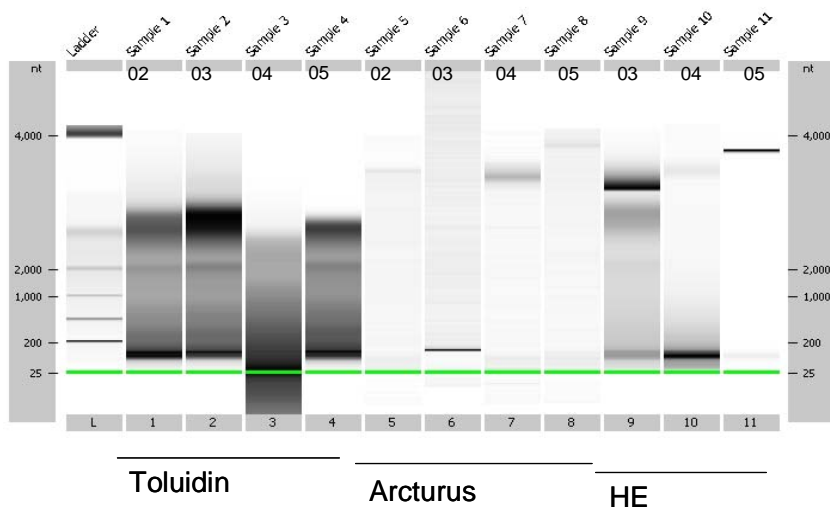


Abb. 41: Gelbild gekratzter Zellen aus verschiedenen Jahrgängen, nach Isolierung mit Hilfe des Roche-Kits und Toluidin-, Arcturus- bzw. HE-Färbung. Hier zeigt sich, dass die Toluidin-Färbung das beste Ergebnis erzielte.

gekrazte Zellen

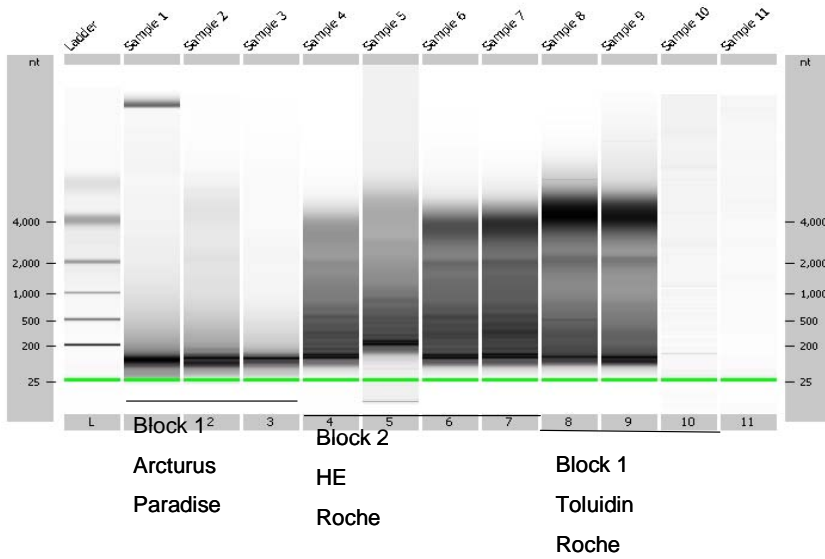


Abb. 42: Gelbild gekrazter Zellen aus frischen, nicht steril gewonnener Gewebeblöcken, nach Isolierung mit Hilfe des Paradise-, bzw. Roche-Kits und Arcturus-, Toluidin bzw. HE-Färbung. Toluidin-Färbung erbrachte hier das beste Ergebnis.

sterile Gewebeblöcke, 80- 100 000 Zellen lasermikrodisseziert, Toluidinfärbung

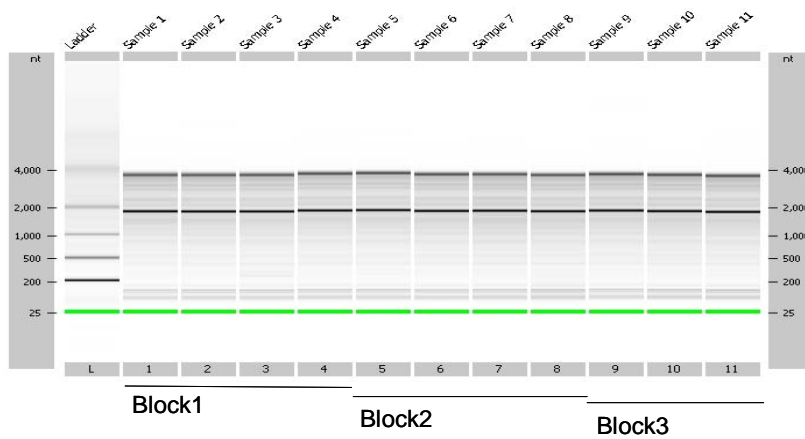


Abb. 43: Gelbild lasermikrodissezierter gepoolter Zellen aus steril gewonnen Gewebeblöcken nach Isolierung mit Hilfe des Roche-Kits und Toluidin-Färbung. Deutlich sichtbares bestes Ergebnis.

Nach Färbung und Mikrodissektion der Gewebe wurde die RNA mit Hilfe des Roche High-pure-RNA-preparation-kit, dem Arcturus Paradise Reagent System und dem Qiagen RNeasy micro-kit isoliert und aufgereinigt. Am Bionalyzer wurde die Qualität der RNA bestimmt.

Die Effizienzen von reverser Transkription und PCR hängen stark von der Qualität und der Menge der als Ausgangs-Template verwendeten RNA ab. Es war daher sehr wichtig, intakte RNA als Ausgangs-Template einzusetzen. Selbst Spuren von kontaminierenden RNasen in der RNA-Probe könnten eine RNA-Degradation verursachen, was dann zu verkürzten cDNA-Produkten führt. Verunreinigungen wie z.B. durch Proteine, Poly-Anionen (z. B. Heparin), Salze, EDTA, Ethanol, Phenol und andere Chemikalien können

die Aktivität und Prozessivität der reversen Transkriptasen und der Taq-DNA-Polymerase beeinflussen. Um eine reproduzierbare und effiziente RT-PCR sicherzustellen, war es wichtig, die Qualität und Menge der Ausgangs-RNA zu bestimmen. Für die Untersuchung wurden Primer hergestellt für das Housekeeping Gen *β-Actin*. Die Primer wurden so gewählt, dass die eine Hälfte des Primers mit dem 3'-Ende eines Exons und die andere Hälfte mit dem 5'-Ende des benachbarten Exons hybridisiert. Die Primer sollten dann an cDNA binden, die aus gespleißter mRNA als Template synthetisiert wurde, jedoch nicht an genomische DNA. Somit wurde die Amplifikation von DNA-Kontaminationen vermieden und der Grad der Degradation ermittelt.

Es wurde gezeigt, dass die RNA-Isolierung mit dem Roche High-pure-RNA-preparation-kit kombiniert mit der Toluidin-Färbung das beste Ergebnis erzielte, mit einer AUC größer 10% und einer 28S/18S Ratio größer 0,8 (Abb. 42). Ferner wurde gezeigt, dass FFPE-Gewebeproben die unter sterilen Bedingungen fixiert und eingebettet wurden eine deutlich höhere Quantität mit im Schnitt 180ng im Vergleich zu Gewebeproben die routinemäßig behandelt wurden mit durchschnittlich 60 ng (Abb. 43). Nach Untersuchung mittels RT- und *real-time*-PCR für *β-Actin* zeigten die steril gewonnen Proben eine signifikant höhere Qualität im Vergleich zu den Proben, die unter Routinebedingungen gewonnen wurden. Anhand der Degradationsuntersuchung wurde gezeigt, dass FFPE-Gewebeproben aus den Jahren vor 2003 keine verwertbare RNA für retrospektive Untersuchungen enthielten.

3.2.4 RNA Qualität von transurethral resezierten Prostata-Gewebeproben

Es wurde RNA aus 16 Gewebeproben von neun Patienten mit hormonresistentem Prostatakarzinom (HRPC), die mittels transurethraler Resektion gewonnen wurden, isoliert. Die RNA-Qualität wurde durch die 28S/18S rRNA Ratio und der *area under curve* (AUC) Daten der 28S und 18S rRNA Peaks sowie der RNA *integrity number* (RIN) (Bionalyzer, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) überprüft.

3.2.5 Qualitätskontrolle von Mikroarray Daten der Prostata-Gewebeproben

Es wurden Prostata-Gewebeproben von 34 Patienten mittels Mikroarray-Technik analysiert. Sechs BPH-Proben von fünf verschiedenen Patienten, zwölf PCA-Proben von neun verschiedenen Patienten und 16 HRPC von neun verschiedenen Patienten.

Die Qualitätskriterien *background*, *scaling factor* (SF) und prozentualer Anteil der *present calls* sind in Abbildung 44 aufgeführt.

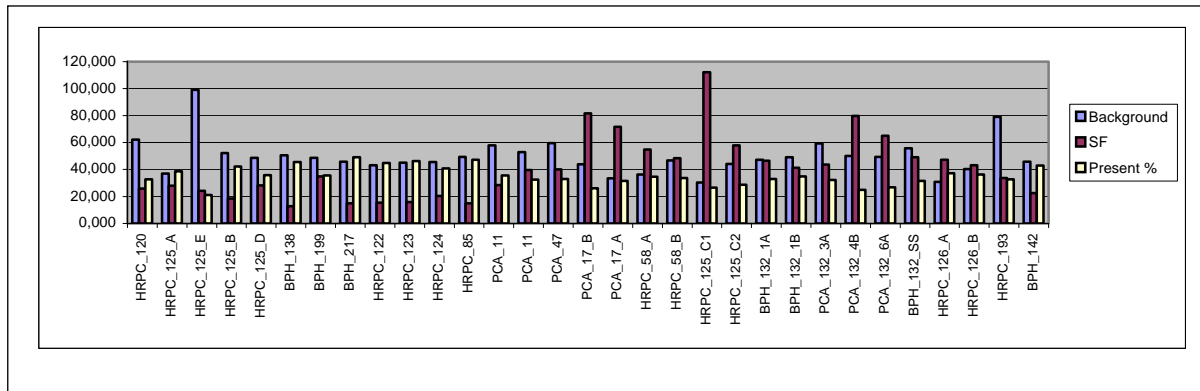


Abb. 44: Balkendiagramm der Qualitätskriterien *background*, *scaling factor* und prozentualer Anteil an *present calls* der einzelnen Prostata-Arrayexperimente. Hier fallen HRPC_125_E mit erhöhtem *background* und HRPC_125_C1 mit erhöhtem *scaling factor* auf.

Der prozentuale Median der *present calls* lag bei 38,5%.

Die RNA aller Gewebeproben mit Ausnahme der TU Resektate HRPC_120, HRPC_125_E und HRPC_125_C zeigten eine AUC größer 10% mit einem Median von 15,6 (Abb. 45).

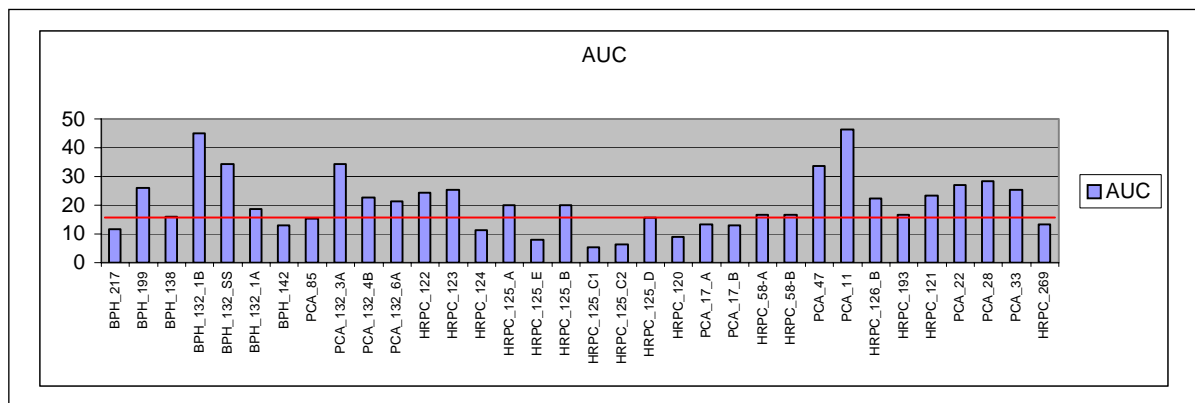


Abb. 45: Balkendiagramm des RNA-Qualitätskriterium AUC der einzelnen Prostata-Arrayexperimente

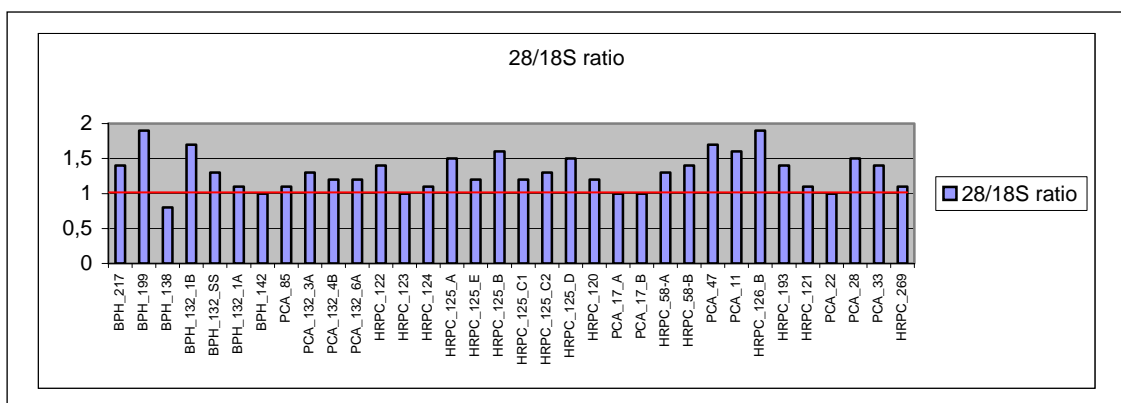


Abb. 46: Balkendiagramm des Qualitätskriterium Relation 28S zu 18S RNA der einzelnen Prostata-Arrayexperimente

Die RNA aller TUR Gewebeproben hatten eine 28S/18S Ratio größer 0.8 mit einer mittleren Ratio von 1,15 (Abb. 46).

Ferner wurde ein RNA *boxplot* erstellt, in dem die durchschnittliche Signalintensität aller Transkripte auf dem HG_FOCUS Array dargestellt wurden, wobei die Probesets im Plot in 5' zu 3' Bereich aufgetragen sind (Abb. 47)

Der Plot zeigte, dass bis auf zwei Proben alle vergleichbare *present call*-Intensitäten aufwiesen. Die Probe HRPC_125_C1 zeigte bereits bei dem Kriterium AUC (>10) und *background* (extrem hoch) und bei der Boxplotanalyse nicht die geforderten Richtwerte und wurde aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Ferner wurde die Gewebeprobe HRPC_85 ebenfalls aus der Analyse heraus genommen, da sich diese in allen Cluster Analysen im Vergleich zu allen anderen Gewebeproben different verhielt. Hier sei zu erwähnen, dass diese Probe als einzige von einem Hoden ablatierten Patienten stammt.

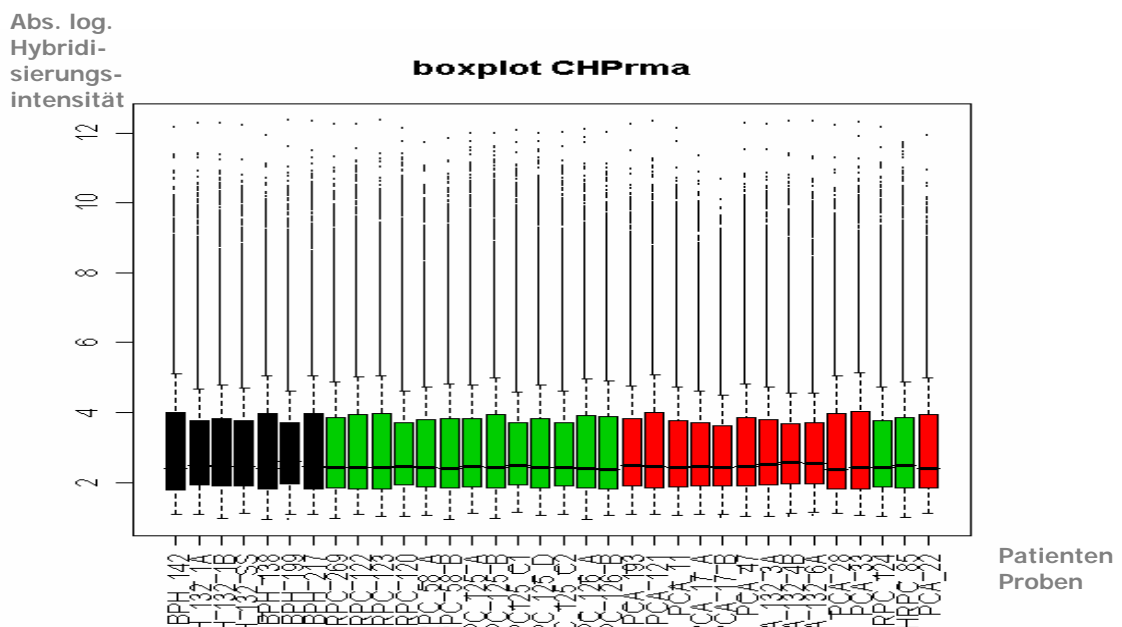


Abb. 47: *boxplot* der Prostata Experimente nach Logarithmierung der Werte (*shift* zur Normalverteilung) erstellt mit dem Statistikprogramm R. Schwarz BPH, grün HRPC, rot PCa. Die Y-Achse spiegelt das Maß der Expressionsintensität wieder.

3.2.6 Reproduzierbarkeit

Es wurden technische und biologische Replikate hergestellt. Anhand dieser Replikate sollte die Reproduzierbarkeit der Experimente demonstriert werden. Dazu wurden mehrere markierte cDNA-Proben aus derselben RNA hergestellt (technische Replikate) bzw. wird RNA aus verschiedenen transurethral resezierten Gewebeproben desselben Patienten isoliert (biologische Replikate). Die so gewonnene markierte cDNA wurde auf HG-FOCUS Arrays (Affymetrix) hybridisiert.

Um das Verhalten der technischen und biologischen Replikate zu prüfen, wurden die Pearson Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Gruppen verglichen. Der Korrelationskoeffizient aller der HRPC Proben lag zwischen 0,88 und 0,98.

3.2.7 Hierarchisches Clustern der Replikate

Ziel dieser mathematischen Untersuchung war, dass die angewendeten Methoden zu reproduzierbaren Ergebnissen führen. Beim hierarchischen Clustern wurde gezeigt, dass sowohl die biologischen als auch die technischen Replikate jeweils in die gleiche Gruppe fallen.

Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die etablierte Versuchsdurchführung zu reproduzierbaren Daten führt. Die durchgeführten Methoden waren sowohl technisch als auch biologisch reproduzierbar.

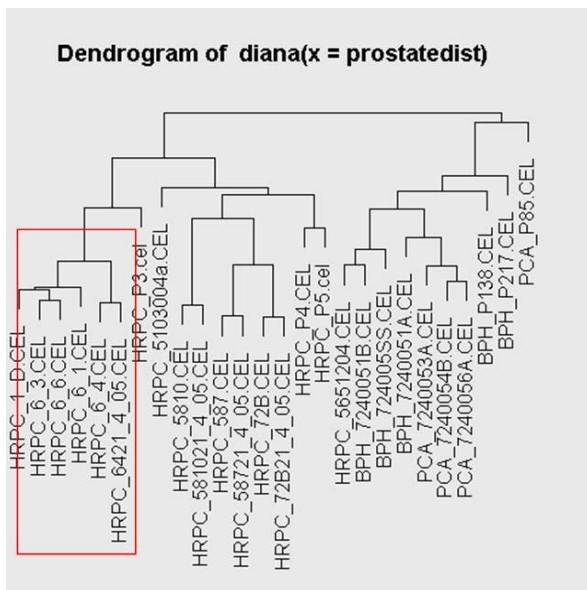


Abb. 48: Dendrogramm in dem die Gruppe der biologischen Replikate gezeigt wird. HRPC_1_D, HRPC_6_1, HRPC_6_3, HRPC_6_4, HRPC_6_6 und HRPC_6421_4_05 (durch roten Kasten markiert); Pearson Korrelationskoeffizient 0,98

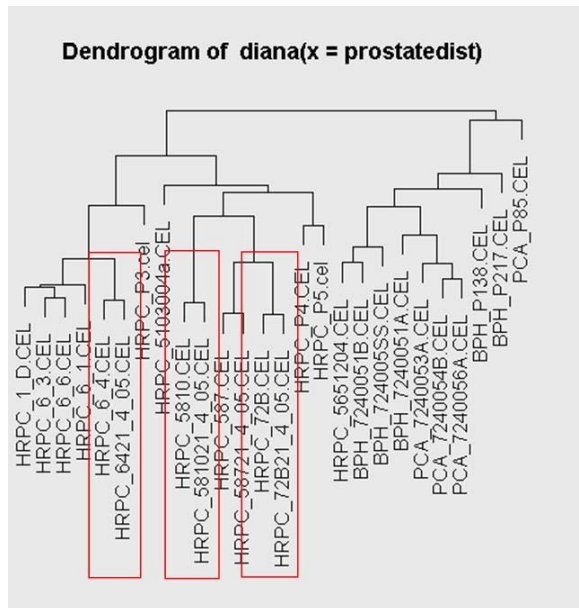


Abb. 49: Dendrogramm in dem die Gruppen der technischen Replikate gezeigt sind. HRPC_6421_4_05, HRPC_6_4, HRPC_581021_4_05, HRPC_5810, HRPC_72B, und HRPC_72B21_4_05 (mit roten Kästen markiert); Pearson Korrelationskoeffizient 0,98

3.2.8 Vergleich von Expressionsprofilen transurethral gewonnener Resektate mit chirurgisch extrahierten Prostata-Gewebeproben

Ziel dieser Untersuchung war, festzustellen ob HRPC-Material, das mittels transurethraler Resektionsmethode (TUR) gewonnen wurde mit PCa-Material, das chirurgisch entnommen wurde, zu vergleichen ist. Da die Schnittführung bei TUR mittels Elektrokauterisierung erfolgte d.h. mit erheblicher Temperatureinwirkung auf das zu untersuchende Gewebe zu rechnen war. Bei chirurgischer Schnittführung mittels Skalpell war nicht zu erwarten. Um die Expressionsprofile zwischen hormonresistenten und hormonsensitiven Prostatakarzinom Proben vergleichen zu können, musste deshalb der so genannte TUR Effekt untersucht werden. Die entstehende Hitze könnte Einfluss auf die RNA Qualität und damit auf entsprechende Expressionsprofile haben.

Dazu wurden HG-FOCUS Array Expressions-Profile von fünf chirurgisch gewonnenen Resektaten (von Patienten mit PCa und BPH) verglichen mit sieben TU Resektaten (der gleichen Diagnose). Die RNA Isolierung und Proben Generierung erfolgt nach beschriebenen Protokoll. Die Qualitätskontrolle erfolgte mittels Bioanalyzer Technik.

Der mediane RIN Wert lag bei 7,25 (TUR). Nur bei einem TU Resektat (HRPC_120) war der RIN Wert unter 6,2. Die Qualitätskriterien *Background*, *Noise*, *Scaling Factor*, prozentualer Anteil der *Present Calls* und die 3'/5' Ratio von *GAPDH* und *β-Actin* wurden zusammengefasst in Abbildung 46 aufgeführt. Diese Daten wurden mit den Array Expressionsdaten der anderen 16 TUR und 7 CR Gewebeproben verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die TU Resektate Ergebnisse den Mindestqualitätsanforderungen

entsprachen. Es konnten dennoch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) bei den Qualitätskriterien AUC ($p = 0,002$) und RIN ($p = 0,028$) gezeigt werden. Um technische Effekte zu eliminieren, wurden die Expressionsdaten zwischen TUR und CR Proben der gleichen Diagnose unterschiedlichen Patienten verglichen; vier TUR PCa mit fünf chirurgisch gewonnenen PCa Resektaten. Von insgesamt 8746 mit dem Array detektierbaren Genen wurden 2471 in einer der beiden Gruppen nachgewiesen. Um hoch signifikant differenziell exprimierte Gene zwischen den zu vergleichenden Gruppen zu identifizieren, wurde der SAM Algorithmus (*Significant Analysis of Microarrays*, Tusher et al, 2001) angewendet. Mit einer *False Discovery Rate* (FDR) von 0,057 wurden 680 differenziert exprimierte Genen gefunden. Die 680 differenziert exprimierten Gene waren alle bei TUR Gewebeproben reprimiert. Die TUR-spezifischen Gene wurden aus den folgenden Analysen ausgeschlossen

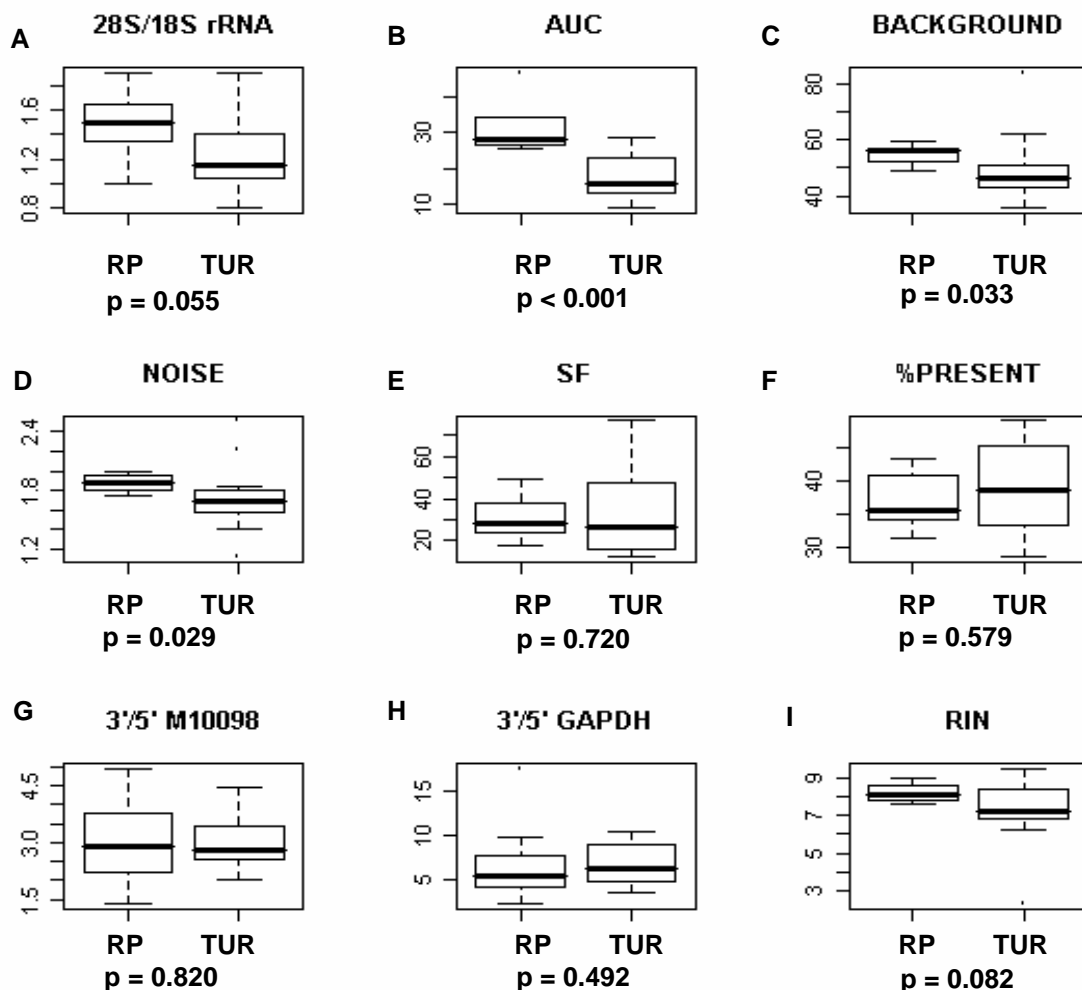


Abb. 50: Zusammenfassung der Qualitätskriterien *Background*, *Noise*, *Scaling Factor*, prozentualer Anteil der *Present Calls* und die *3'/5' Ratios* von GAPDH und β -Aktin. CR = chirurgischer Resektat; TUR = transurethrale Resektion.

Mit den übrigen Genen wurde eine Expressionsmatrix erstellt, welche die mittleren Signalintensitätswerte von acht HRPC und acht PCa Patienten enthielt (mit $\geq 80\%$ *present* oder *marginal* Signale in mindestens einer Gruppe). Von acht PCa Patientenproben waren vier PCa chirurgisch resektiert. Es konnte mittels der ANCOVA Kovarianzanalyse (Mansmann and Meister, 2005) gezeigt werden, dass die Korrektur des biologischen Effekts (HRPC vs. PCa) gegenüber dem technischen Effekt (TUR vs. RP) eine Signifikanz von $p = 0.0004$ aufwies. Eine Korrektur des technischen Effekts zeigte gegenüber dem biologischen Effekt hingegen einen p -value von 0,06. Der biologische überwog den technischen Effekt, trotzdem durfte der Einfluss des technischen Effektes nicht wie angenommen vernachlässigt werden. Die 680 TUR-Effekt spezifischen Transkripte / Gene wurden eliminiert und der ANCOVA Algorithmus wurde erneut auf die verbliebenen Gene angewendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich der biologische Effekt ($p = 0.0013$) weiterhin signifikant gegenüber technischen Effekt ($p = 0.247$) verhielt. Durch den Ausschluss der 680 TUR-Effekt spezifischen Gene wurde ein Vergleich der hormonresistenten Prostatakarzinom Patienten mit den hormonsensitiven Prostatakarzinom Patienten vorgenommen. Bei dem Vergleich konnte somit der Einfluss der technischen Effekte (unterschiedlichen Resektionsverfahren) weitgehend eliminiert werden und nur noch der biologische Unterschied zwischen den Patientengruppen eine Rolle spielte (siehe 3.2.10).

3.2.9 Cluster Analyse der BPH, PCa und HRPC Proben

Eine Cluster Analyse der BPH, PCa und HRPC Proben wurde durchgeführt um analysieren ob die einzelnen Gewebeproben gleicher Herkunft in eine Gruppe fielen. Dem Clusterverfahren wurden 2297 Gene und 21 Patienten zugrunde gelegt mit $\geq 80\%$ *present* oder *marginal* Signalen in mindestens einer Gruppe (mit Eliminierung des TUR-Effekt). Die Expressionsprofile der Proben HRPC_125E und BPH_199 wurden wegen des Verhaltens im *digestion plot* aus der Untersuchung ausgeschlossen (Abb. 51)

Von Patientenproben die mehr als einmal auftraten, wurde der mittlere Signalwert der Expression für die weitere Analyse verwendet. Zum Vergleich aller Gruppen wurde der HOPACH Algorithmus (van der Laan und Pollard, 2003) angewandt. Um die Stabilität der Cluster einzuschätzen wurde eine Bootstrap Analyse, die der HOPACH Algorithmus beinhaltetete, durchgeführt (Abb. 52)

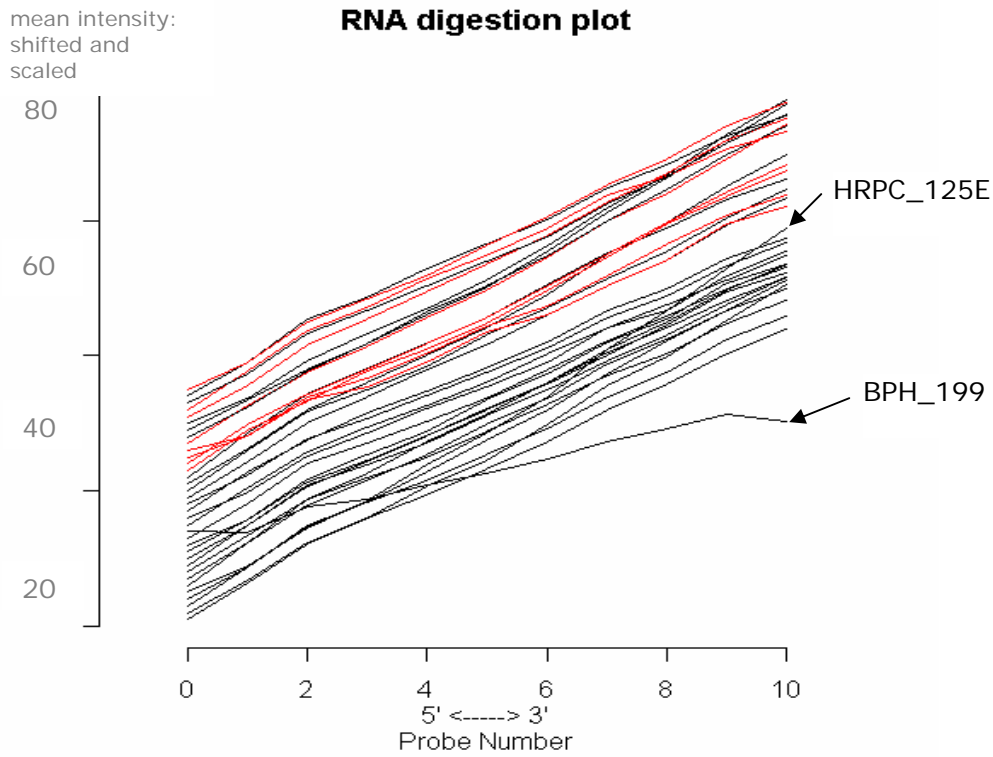


Abb. 51: Digestion plot zur Untersuchung der linearen RNA Degradation

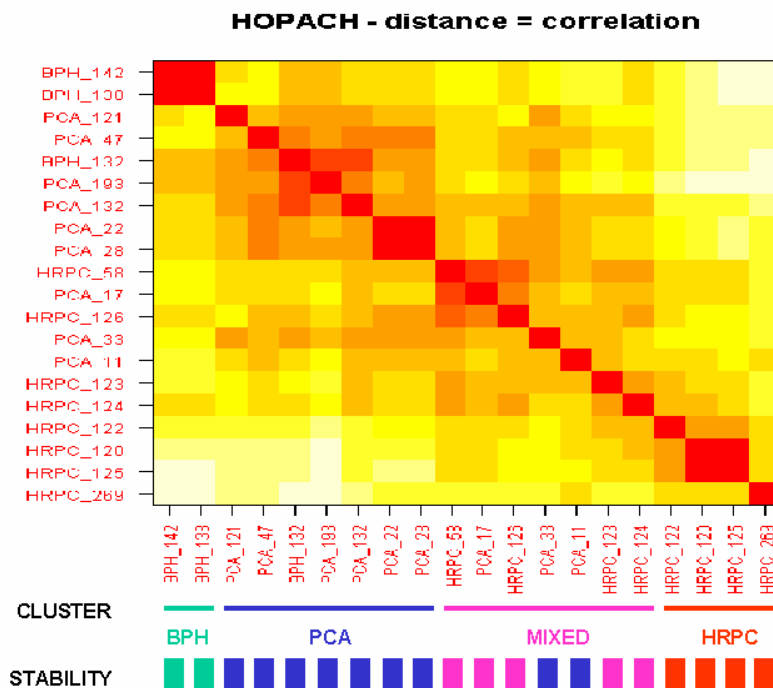


Abb. 52: HOPACH-Analyse zur Cluster-Stabilität von BPH-, PCA- und HRPC-Gewebeproben auf der Basis von 2322 Genen

Es wurden vier Gruppen detektiert: eine reine BPH-Gruppe, eine PCa-Gruppe, eine gemischte HRPC / PCa-Gruppe und eine reine HRPC-Gruppe.

Nach divisivem und agglomerativem Clustern wurden die in der HOPACH Analyse gefundenen Gruppen bestätigt (Abb. 52, 53).

Von Patient 132 sind zwei verschiedene TU Resektate in die Untersuchung eingeflossen. Das eine Resektat wies einen Tumoranteil von über 95% auf, das andere nur BPH Gewebe. So ist zu erklären, dass sowohl beim agglomerativen als auch beim divisiven Clustern BPH 132 in die PCA Gruppe clustert (Abb. 53).

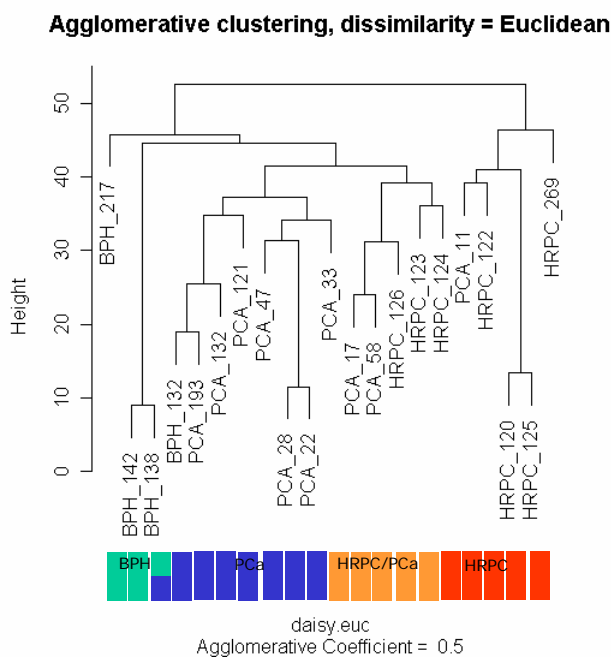
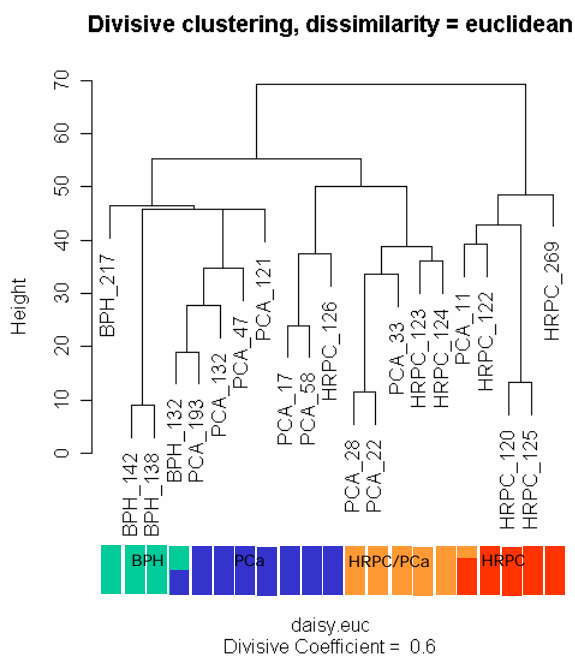


Abb. 53 oben divisives Clustern der einzelnen Array-Experimente, unten agglomeratives Clustern zur Analyse von Gruppenverhalten. Bei beiden Clusterverfahren ist zu sehen, dass BPH 132 mit PCA 193 clustert und ein sich Mischcluster aus HRPC und PCA Gewebeproben abzeichnet.

3.2.10 Identifizierung von Genen, die an der Entstehung von hormonresistenten Prostatakarzinomen beteiligt sind

Um die differenziell regulierten Gene im Vergleich HRPC zu PCa Gewebeproben zu identifizieren, wurde eine Expressionsmatrix erstellt, die Daten von 1424 Transkripten mit $\geq 80\%$ Present oder Marginal Calls von 8 HRPC und 8 PCa Gewebeproben enthielt. 680 TUR spezifische Transkripte wurden auf diese Weise aussortiert. Mit Hilfe des SAM Algorithmus konnten 282 Transkripte als signifikant differenziell reguliert im Vergleich zwischen hormonresistenten und Hormon sensitiven Prostatakarzinomen eingestuft werden, mit einer *false discovery rate* (FDR) von ≤ 0.05 . Die *top ten* der differenziell regulierten Gene sind in Abb. 54 Aufgeführt. Sechs der zehn Gene sind involviert im Energie-Stoffwechsel, die anderen sind potentiell beteiligt an der Transkription (*ZFP36*), am Zytoskelett-Signalweg (*CDC42EP3*), Stress Antwort (*BAG3*) und MAP-Kinase Signalweg (*STK24*).

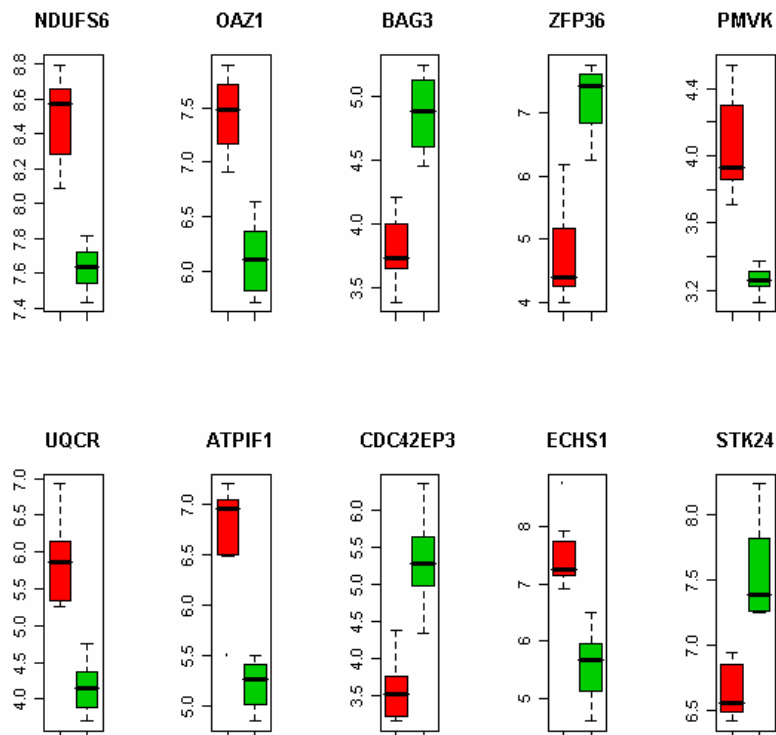


Abb. 54 „Top ten“ der differenziell regulierten Gene im Vergleich von HRPC (rot) und PCA (grün) Gewebeproben mit Hilfe des SAM Algorithmus. Die y-Achse zeigt den Logarithmus der absoluten, normalisierten Expressionswerte auf.

3.2.11 HRPC spezifische Gene

Es wurden drei Gene ermittelt, die nur bei HRPC-Patientenproben signifikant ($p > 0,05$) differenziell exprimiert waren (Tabelle 50).

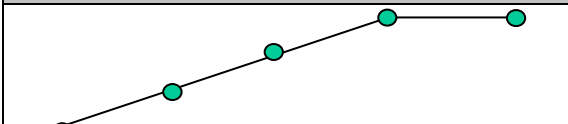
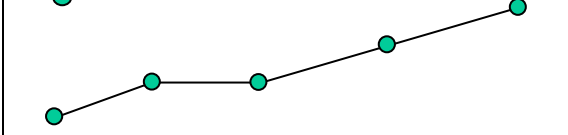
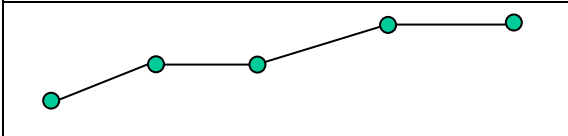
Tabelle 50

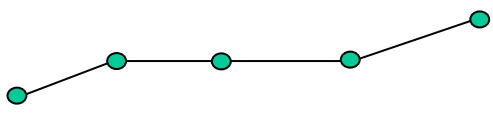
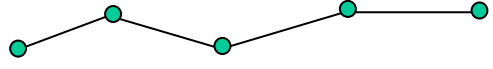
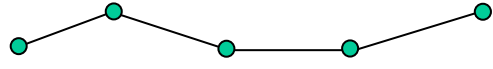
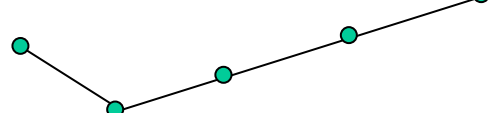
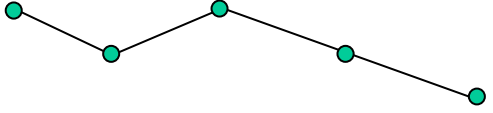
Gene Symbol	Probe Set ID	Gene Title
YWHAZ	200640_at	Tyrosin 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Aktivierungsprotein, zeta Polypeptide
PSMA2	201317_s_at	Proteasom Untereinheit, alpha Typ, 2
ABCE1	201872_s_at	ATP-Bindungskassette, Unterfamilie E (OABP)

3.2.12 Vergleich der Genexpressionsprofile der fünf verschiedenen Krankheitsstufen: benigne Prostatahyperplasie BPH, Prostatakarzinom PCa, hormonsensitives Prostatakarzinom hsPCA, frühes hormonresistentes Prostatakarzinom fHRPC und spätes hormonresistentes Prostatakarzinom sHRPC

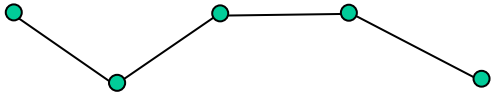
Es wurde ein Vergleich der Genexpressionsprofile der fünf verschiedenen Krankheitsstufen durchgeführt, um zu klären ob es HRPC-spezifische Gene gibt, die ein bestimmtes Verlaufs Muster in unterschiedlichen Krankheitsstufen zeigten. Angefangen mit der benignen Prostatahyperplasie (BPH) über das ausschließlich chirurgisch behandelte lokale Prostatakarzinom (PCa), das Hormon behandelte lokale sensitive Prostatakarzinom (hsPCA), das mit LHRH behandelte Hormon resistente so genannte frühe Prostatakarzinom (fHRPC) und das mittels maximaler Androgenblockade (MAB) behandelte so genannte späte Prostatakarzinom (sHRPC). Dabei sollten Gene detektiert werden, die sich im Krankheitsverlauf gemäß der angenommenen Vorgaben (Geneexpressions Verlauf), wie im Folgenden erklärt, verhalten. Induktion = Strich nach oben, gleich bleibend reguliert = waagerechter Strich, reprimiert = Strich nach unten siehe Tabelle 51.

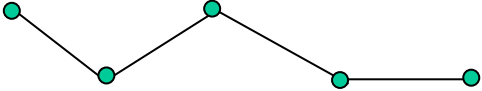
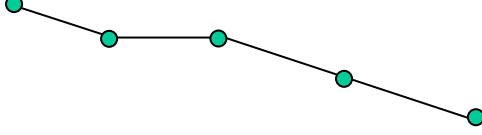
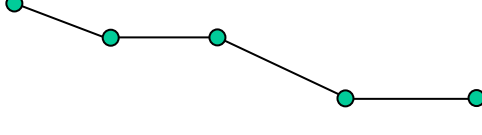
Tabelle 51: Genexpressionsprofile der verschiedenen Krankheitszeitpunkte

Genexpressionsprofil BPH – PCA – hsPCA – fHRPC - sHRPC	Cluster Nr.	Cluster Größe	Gene
	1	1	<i>TRIB1</i>
	2	1	<i>COX5A</i>
	3	11	<i>TACSTD1; AFF1; GUSB1; SLC25A13; FOXA1; OGT; DDAH1; MLX; EIF2AK1; HYPK; ZNF350</i>

Genexpressionsprofil BPH – PCA – hsPCA – fHRPC - sHRPC	Cluster Nr.	Cluster Größe	Gene
	4	17	<i>NOL5A; FKBP4; RPS17; GSPT1; ALCAM; RER1; RPN2; RPL23A; TUBB2; ABCC5; PTCH; EIF4B; NUDT4; DSG2; MCCC1; LOC51334; ARS2</i>
	5	15	<i>QP-C; TPD52; PRDX4; PYCR1; ARMET; UGDH; STEAP1; SYT17; MCCC2; TMSB10; RPS26; GOLPH2; SS18L2; REPIN1; TRIM36</i>
	6	1	<i>MARCKSL1</i>
	7	2	<i>AZIN1; PSMD10</i>
	8	69	<i>GSN; SPARCL1; TACC1; ACTA2; DSTN; HTRA1; SH3BGRL; VAMP3; VIM; DPYSL3; MYH11; CLIC4; ANXA2; OAT; IER3; JAK1; PPP1R12B; PGM1; CUGBP2; CDKN1A; AP3S1; CTSK; MYLK; LTBP1; GBP2; FBN1; SYNPO; C1QR1; ATXN1; CAV2; BCL2; FZD7; PURA; SCHIP1; 13CDNA73; DOC1; LMO2; EDNRA; APRIN; SSPN; CSF2RB; FOXF1; CSRP2; MEIS2; ACTN1; LGALS3; TUBA3; TAX1BP3; MEF2C; ID4; PSIP1; MAF; TGFB111; LEPR; PMP22; TPM1; C1R; MXRA7; CAST; RND3; FOXC1; RAB31; SORBS1; C5orf5; PLSCR4; JAM2; WFDC1; TNS1; KLF4</i>

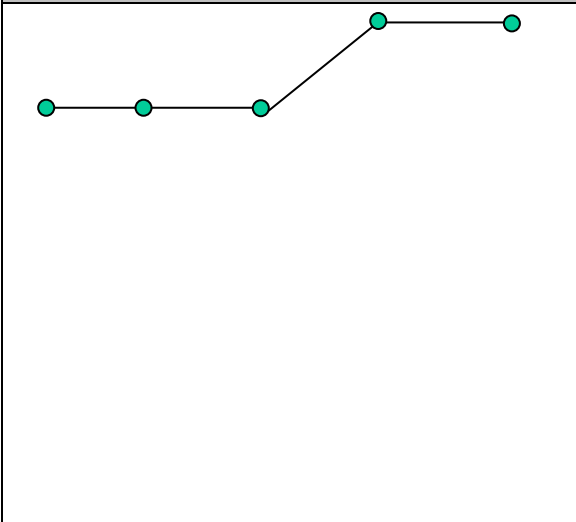
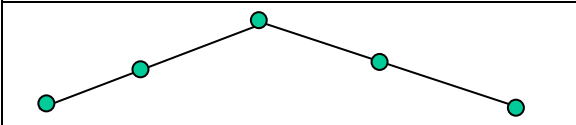
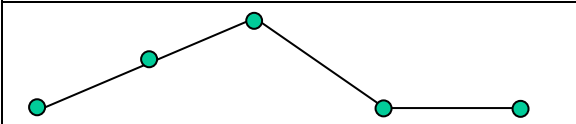
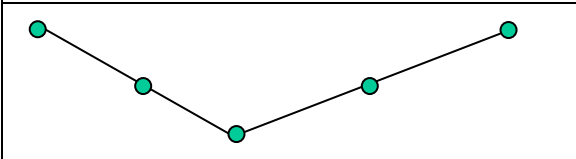
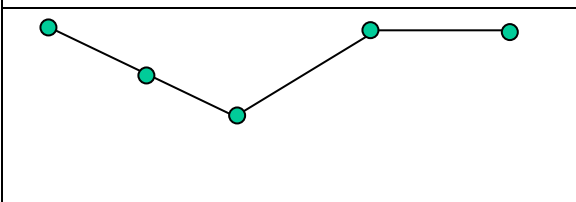
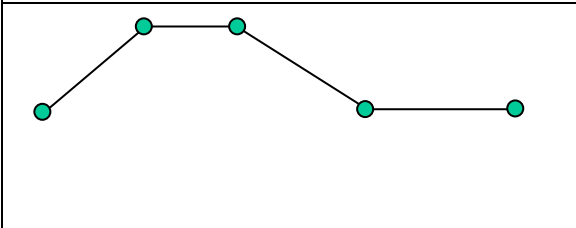
ERGEBNISSE

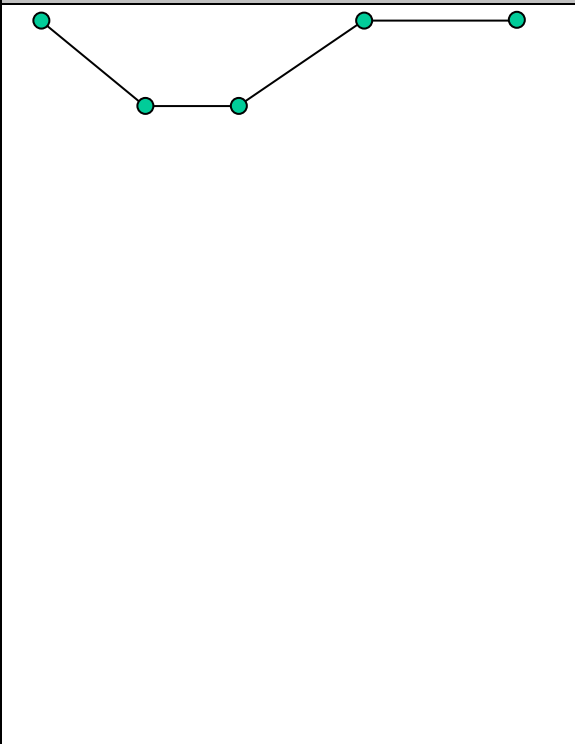
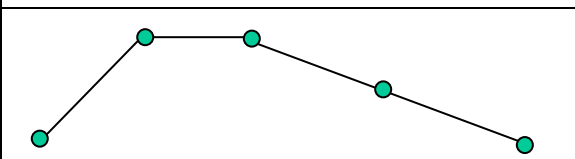
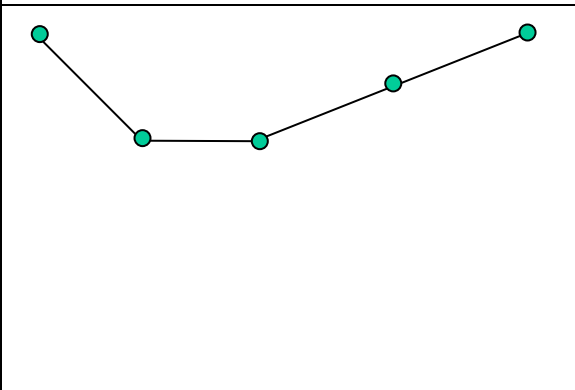
Genexpressionsprofil BPH – PCA – hsPCA – fHRPC - sHRPC	Cluster Nr.	Cluster Größe	Gene
	9	62	<i>MCL1; EPAS1; TM9SF2; PRNP; SCP2; SF3A1; PPP2CB; RYBP; OPTN; ALS2CR3; SDFR1; KLF10; COPS2; EPS8; IFNGR1; SEC24B; DNAJB9; SUCLA2; DCTN6; MFAP1; STAM; FRZB; CTSO; IF; ARHGAP29; TCEAL1; SGCB; KAL1; UGP2; RAB1A; TLOC1; CTGF; HBP1; ADFP; PROSC; ENPP2; RTN4; COL4A1; MYL6; RHOQ; ATG12; CSNK1A1; SLC1A1; CFH; JAG1; NR3C1; ZFP106; GOLGA7; CAB39; KLHDC2; MAN1A2; ERBB2IP; MORF4L1; COPS4; VPS4B; FYCO1; GOLGA5; USP16; P2RY5; SLC38A2; USP3; RAB9A</i>

Genexpressionsprofil BPH – PCA – hsPCA – fHRPC - sHRPC	Cluster Nr.	Cluster Größe	Gene
	10	108	<p> <i>MSN; CALM1; VCL;</i> <i>ABLIM1; BLCAP; PFKP;</i> <i>PLP2; NFE2L2; MBNL1;</i> <i>ANXA4; ALDH2; DUSP3;</i> <i>ETF1; PPP1R12A; CALD1;</i> <i>RRAGA; SFRS4; GC20;</i> <i>IL13RA1; IDH3A; TJP2;</i> <i>MXI1; PPP3CB; IDS;</i> <i>PITPNB; TNKS; INPP1;</i> <i>LPP; ABCD3; CDC23;</i> <i>WFS1; CRYZ; SMAD2;</i> <i>TP53BP2; AKAP11;</i> <i>S100A4; CEBPZ; DDB2;</i> <i>CAMLG; FEZ1; AGL;</i> <i>ZNF185; WBP4; LMOD1;</i> <i>MTR; DNAJB4; SF3A3;</i> <i>SLC9A6; E2F6; CREB1;</i> <i>CD83; TGFB3; HLF;</i> <i>ARL4; ACTC; PER2;</i> <i>DNC11; TAGLN; BTG3;</i> <i>SELE; PLAGL1; FLNC;</i> <i>ADD1; DSCR1; MACF1;</i> <i>ADH5; SPOP; STAU;</i> <i>TSPAN6; TNFRSF10B;</i> <i>NDUFS4; SURB7; ZA20D2;</i> <i>IDH3B; MCAM; RANBP5;</i> <i>CALM1; NOTCH2; YT521;</i> <i>MYST4; TPM4; NCAM1;</i> <i>SNAI2; SNAPC5; SACS;</i> <i>RABGAP1; CDKN1C;</i> <i>BMPR1A; CAP1; SHC1;</i> <i>RBM9; TMBIM1; PBEF1;</i> <i>BAG3; CCNB1IP1; NFYB;</i> <i>LMCD1; HECA; EIF4ENIF1;</i> <i>SART2; COPZ2; PTPLA;</i> <i>ADAMTS5; USP25;</i> <i>B4GALT5; WASF2; ITSN1;</i> <i>SLC24A3</i> </p>
	11	13	<p> <i>CSR1; CCND2; PAM;</i> <i>ACVR1; DCAMKL1;</i> <i>CX3CR1; ALDH1A2; C1S;</i> <i>ENTPD1; RGN; PRKCA;</i> <i>FXD6; MSRA</i> </p>
	12	25	<p> <i>WDR1; SERPING1;</i> <i>AKR1B1; ALDH3A2; ANK2;</i> <i>FAM8A1; DFNA5; NT5E;</i> <i>MEIS1; MLC1SA; COX7A1;</i> <i>PLN; GNAZ; RARB; KCNJ8;</i> <i>PLAG1; GSTM5; NDP; CLU;</i> <i>UROD; RXRB; LMO4;</i> <i>SERPINE2; GATM; HBXAP</i> </p>

Genexpressionsprofil BPH – PCA – hsPCA – fHRPC - sHRPC	Cluster Nr.	Cluster Größe	Gene
	13	85	<i>PARK7</i> ; <i>SMAP</i> ; <i>CD63</i> ; <i>LAPTM4A</i> ; <i>ARL6IP5</i> ; <i>PAFAH1B1</i> ; <i>CD59</i> ; <i>TXNIP</i> ; <i>MGST3</i> ; <i>TIA1</i> ; <i>CCND3</i> ; <i>PSMD7</i> ; <i>SMAP</i> ; <i>RNF14</i> ; <i>SEC63</i> ; <i>CREBL2</i> ; <i>TJP1</i> ; <i>VWF</i> ; <i>ZMYND11</i> ; <i>GBP1</i> ; <i>UBE2B</i> ; <i>CBFB</i> ; <i>LEPR</i> ; <i>APPBP2</i> ; <i>RNF103</i> ; <i>AXL</i> ; <i>SYBL1</i> ; <i>SP100</i> ; <i>INPP5A</i> ; <i>BAZ2B</i> ; <i>RNF6</i> ; <i>PGCP</i> ; <i>KLF9</i> ; <i>COX11</i> ; <i>PKD2</i> ; <i>GADD45A</i> ; <i>TRIP4</i> ; <i>NEBL</i> ; <i>HNMT</i> ; <i>NID2</i> ; <i>PSMB9</i> ; <i>RCBTB2</i> ; <i>FAS</i> ; <i>LAMA2</i> ; <i>AKAP7</i> ; <i>LDB2</i> ; <i>CALM2</i> ; <i>CR1</i> ; <i>ATP6V1E1</i> ; <i>ATRX</i> ; <i>ATP6V1D</i> ; <i>RNF11</i> ; <i>TCF12</i> ; <i>NCOA1</i> ; <i>BCL2L2</i> ; <i>HBS1L</i> ; <i>NR2F1</i> ; <i>MAGI2</i> ; <i>C9orf26</i> ; <i>ASAH1</i> ; <i>LAT</i> ; <i>H3F3B</i> ; <i>H2AFV</i> ; <i>PSMD14</i> ; <i>EFHA1</i> ; <i>ROCK1</i> ; <i>SEP7</i> ; <i>FBXL7</i> ; <i>PIK4CA</i> ; <i>GOS2</i> ; <i>SNX3</i> ; <i>ZMYM6</i> ; <i>COX7C</i> ; <i>MEF2A</i> ; <i>FEZ2</i> ; <i>HLA-A</i> ; <i>PUM2</i> ; <i>NDUFA4</i> ; <i>MAT2B</i> ; <i>RPS27L</i> ; <i>BRP44L</i> ; <i>PRKD3</i> ; <i>FTS</i> ; <i>RAP2C</i> ; <i>MORF4L1</i>
	14	5	<i>KIF5B</i> ; <i>CD53</i> ; <i>ENTPD4</i> ; <i>LOH11CR2A</i> ; <i>LHFP</i>
	15	20	<i>PEA15</i> ; <i>MMP2</i> ; <i>FVT1</i> ; <i>TNFAIP2</i> ; <i>PLCG2</i> ; <i>CLOCK</i> ; <i>EBI2</i> ; <i>CALD1</i> ; <i>AQP1</i> ; <i>PRKCB1</i> ; <i>SLIT2</i> ; <i>PARD3</i> ; <i>CAPN3</i> ; <i>FGFR1</i> ; <i>CARS</i> ; <i>OSR2</i> ; <i>CECR1</i> ; <i>SFXN3</i> ; <i>TNS1</i> ; <i>BNIP3L</i>
	16	25	<i>HSPD1</i> ; <i>SCD</i> ; <i>PAICS</i> ; <i>ABCE1</i> ; <i>VAPB</i> ; <i>SLC33A1</i> ; <i>CDC2</i> ; <i>KRAS</i> ; <i>PFN2</i> ; <i>PDCD8</i> ; <i>P4HA1</i> ; <i>APLP2</i> ; <i>MRPL3</i> ; <i>DAP3</i> ; <i>GATA2</i> ; <i>ATR</i> ; <i>SLC7A11</i> ; <i>PCCB</i> ; <i>HOXA9</i> ; <i>NUSAP1</i> ; <i>ZNF706</i> ; <i>NDUFC2</i> ; <i>SRPRB</i> ; <i>ZNF544</i> ; <i>ARPC5L</i>

ERGEBNISSE

Genexpressionsprofil BPH – PCA – hsPCA – fHRPC - sHRPC	Cluster Nr.	Cluster Größe	Gene
	17	41	<i>ARF1; PRDX6; COX6A1; RBM4; COX8A; WSB2; SCAMP3; BNIP3; WDR23; COASY; ATP6V1A; SLC39A6; JTV1; UQCRH; NDUFV2; KATNB1; PDCD6; PMVK; COX17; CROT; FGF13; FANCC; MID2; ARPC3; ELOVL5; TXN; MDH2; EWSR1; POP7; TPI1; HOXA10; SATL1; EIF4E2; MTCH2; RBX1; TRIB3; IHPK2; SLC35F2; Cep70; C20orf18; ATP6V0C</i>
	18	4	<i>DUSP1; BTG2; ZFP36; SGK</i>
	19	3	<i>GAS7; IRF6; TCF4</i>
	20	7	<i>RPS5; AHSA1; EIF4A1; EIF3 S8; GAPDH; RPLP0; C6orf48</i>
	21	4	<i>UQCR; MAGED2; UBE2I; NIT 2</i>
	22	23	<i>TPP1; CKAP4; BRD4; RBBP6; SNTB2; CCL14; PHF20; FAL; GRP171; SRRM2; DDX18; UB N1; MYD88; CD74; CBLB; FYN; LYST; PABPN1; LOC399 491; PITPNC1; HSD17B7; SH3BP4; PHF1</i>

Genexpressionsprofil BPH – PCA – hsPCA – fHRPC - sHRPC	Cluster Nr.	Cluster Größe	Gene
	23	63	<i>DAD1; ASCC3L1; OAZ1; EEF2; RAN; XRCC6; LAMP2; MGEA5; MDH1; RAD23B; TARS; NDUFA5; YME1L1; VBP1; GRSF1; ARL1; SMC4L1; USP14; GBAS; SPTLC1; HBCIP; IKBKAP; GMFB; STCH; ARL3; OXCT1; HEXIM1; U2AF1; NDUFS1; FECH; DCK; TERF1; SEC61G; RAB4A; RTCD1; NDUFS6; TSNAX; NUPL2; DCTN3; RGS4; ZBTB11; ACAT1; WBSCR1; SEC13L1; SMARCA4; SFRS1; CYCS; DUT; AK2; RDBP; DCTD; PSMA1; PDCD10; LYPLA1; GCSH; COX5B; SDHC; SNX5; MASA; TPARL; NDUFA8; NDUFA3; DPM3; ZNF226; WDR61; ADSS; PRDX2</i>
	24	4	<i>FOXO3A; CRYM; CD3D; C3</i>
	25	36	<i>RPL35; NCL; YWHAZ; RPLP1; PSMB7; RPL23; CCT3; TUF; PSMA2; CCT6A; RCN2; NCBP2; DDX39; COPS5; SMARCD2; SEC24C; POLR2K; TAF15; HPRT1; SMARCA3; IMPA1; PRPF19; RFC5; CKS2; NEK4; TMEM5; TBPL1; CANX; STX3A; TAF2; PXMP3; UBE2N; NDUFA10; PFDN2, CHORDC1; NOLA1</i>

Zur Kontrolle wurden Expressionsprofile von Alpha-Methylacyl-CoA Racemase *AMACR* über die fünf verschiedenen Erkrankungszeitpunkte erstellt, der ein bekannter PCa Biomarker ist (Hessels *et al.*, 2004). Abb 55A zeigt eine Box-Plot Darstellung der Genexpression von *AMACR*, die in PCa eine Erhöhung und in hsPCa eine Regression erfährt. Einen erneuten Anstieg der Genexpression zeigte *AMACR* in HRPC Gewebeproben. Ebenfalls erniedrigte Expressionen in hormon sensitiven PCa haben die Gene *PSA* (*prostate specific antigene*) und *Kallikrein2* aufgewiesen (nicht gezeigt).

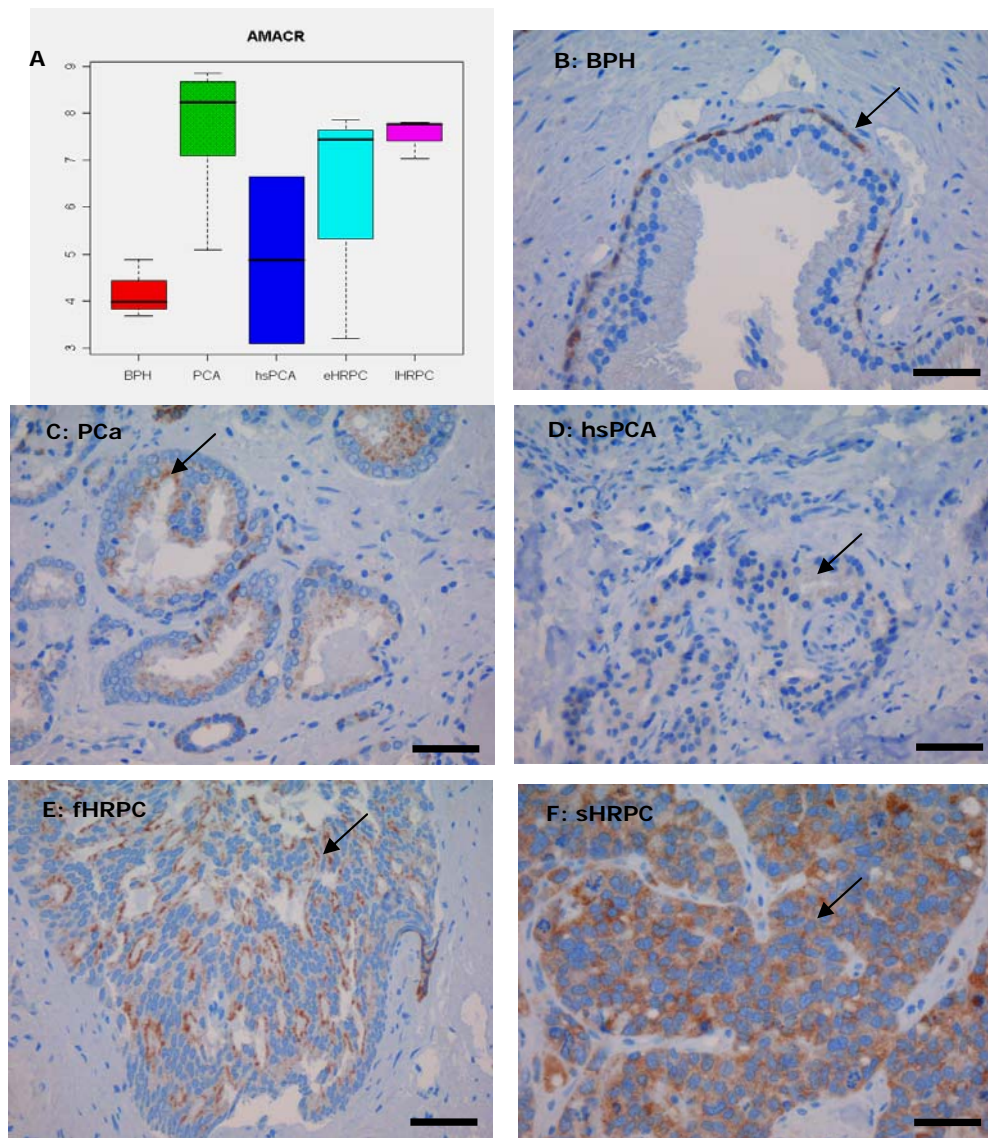


Abb. 55: A: Expressionsprofile der fünf verschiedenen Krankheitszeitpunkte B-F: Repräsentative AMACR-, p63-, HMW-CK-IHC-Bilder der einzelnen Zeitpunkte (x200). BPH = benigne Prostatahyperplasie, nur Basalzellen angefärbt; PCa = Prostatakarzinom, vereinzelt Basalzellen angefärbt, deutliche Färbung der luminalen Tumorzellen; hsPCA = hormonsensitives Prostatakarzinom, schwache Färbung der luminalen Tumorzellen; fHRPC = frühes hormonresistentes Prostatakarzinom, vereinzelt Basalzellen angefärbt, deutliche Färbung der luminalen Tumorzellen; sHRPC = spätes hormonresistentes Prostatakarzinom, starke Färbung der Tumorzellen

Zur Validierung dieser Genexpressionsprofile die anhand der Daten des HG-Focus Mikroarray erstellt wurden, wurde eine immunhistochemische (IHC) Untersuchung angeschlossen. Es wurde ein IHC-Antikörper-Cocktail aus AMACR, dem Basalzellen-Marker p63 und HMW-CK zusammengestellt (Abb. 55 B-F). Es konnte ein Anstieg der AMACR Expression im Vergleich HRPC zu PCa Gewebeprobe nachgewiesen werden. Zur Validierung der mittels des HG-FOCUS Mikroarrays erstellten Genexpressionsprofile wurde ein AMACR Antikörper Cocktail der auch einen Basal Zellmembran Marker p63 und HMW CK enthielt (55B-F). In BPH Gewebe war keine zytoplasmatische AMACR-Färbung festzustellen (55B), im Gegensatz zu PCa (55C), wo hingegen die Färbekraft in

hormonsensitiven PCa Gewebeproben reduziert war (55D). In hormonresistenten PCa Proben konnte eine Zunahme verzeichnet werden (55E, F). Eine deutliche Basalzell-Färbung war nur bei BPH-Gewebeproben nachgewiesen worden. Es konnte gezeigt werden, dass ein AMCR-Anstieg ein Hinweis auf die Entstehung eines HRPC ist.

3.2.13 Bestätigung der Array-Ergebnisse aus Prostata-Gewebeproben der differenziell regulierten Transkripte mittels RT-PCR

Zur Validierung der Mikroarray Experimente und statistischen Analysen, wurden Primer für *JUND*, *PMVK* und *HADH2* für anschließende RT-PCR Untersuchungen hergestellt. *JUND* war bereits als reprimiert in hormonresistenten Prostatakarzinomen beschrieben worden (Best *et al.*, 2005). *PMVK* wurde ausgewählt, um eine exakte Trennung der HRPC und PCa Gewebeproben zu erreichen, da es unter den *top ten* der differenziell regulierten Gene im Vergleich HRPC vs. PCa zu finden war. *HADH2* wegen seines Potentials zur Aktivierung von DHT (Bauman *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Microarray-Daten mit den Lightcycler-Daten zu vergleichen waren (Abb. 56).

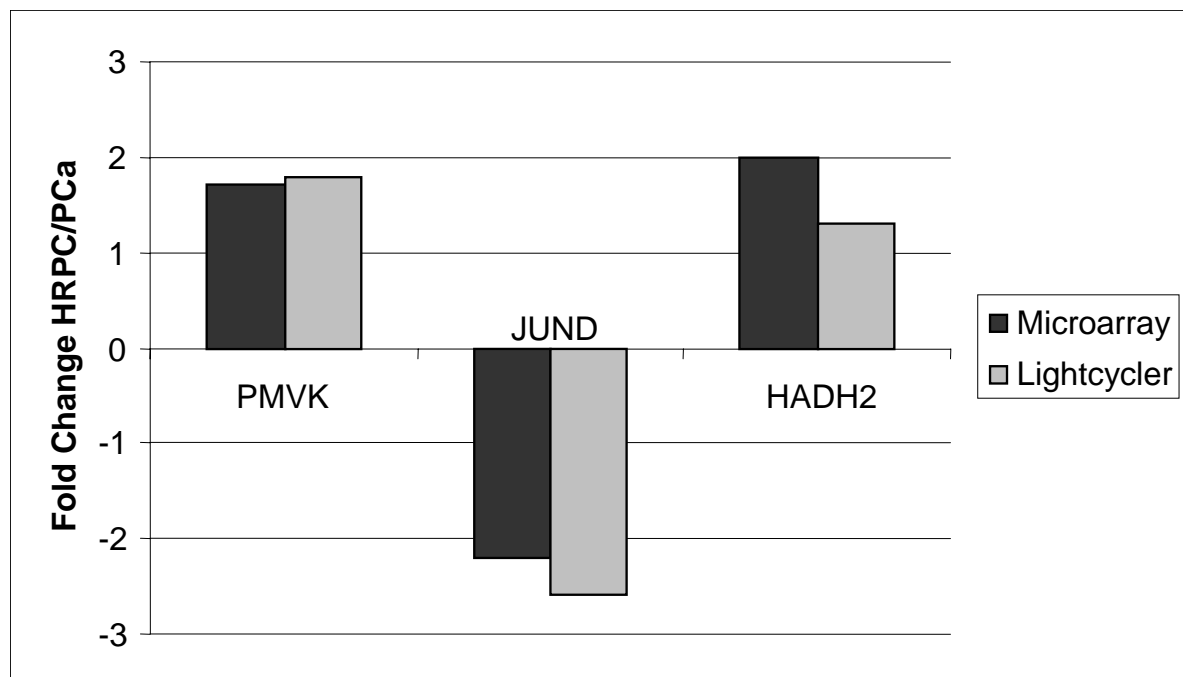


Abb 56. Graphische Darstellung der Deregulation von PMVK, JUND and HADH2 im Vergleich zwischen Mikroarray und RT-PCR (Lightcycler) Ergebnisse

3.2.14 Differenziell regulierte Signalwege im Verlauf der Hormonresistenz der Prostatakarzinoms

Es sollten biologische Signalwege aufgedeckt werden, die bei auftretender Hormonresistenz betroffen sind. Zu diesen Zweck wurde eine KEGG Annotation und der

Global Test Algorithmus (Goeman *et al.*, 2004) auf die Expressions-Matrix der 1424 differenziell regulierten Transkripte angewandt. Dieser Test ermöglichte Gruppen von Genen verschiedener Größe zu vergleichen, weil der Test der Gruppe einen bestimmten p-Wert zuordnet und nicht jedem Gen einzeln. Die Korrektur der p-Werte erfolgte nach der Methode von Benjamini and Hochberg (1995). Es wurden 76 Signalwege gefunden mit einem korrigierten p-Wert >0,05 und mindestens zwei Transkripten pro Signalweg. Eine Auswahl von 35 Signalwegen ist in Tabelle 52 dargestellt.

Tabelle 52 Differenziell regulierte Signalwege

Anzahl Transkripte auf dem Chip	Differenziell regulierte Transkripte	% Transkripte auf dem Chip	korrigierter p-Werte	Signalweg
77	17	0,220779221	0.003117	Ribosomale Proteinproduktion
12	2	0,166666667	0	Glykosaminoglycan Degradation
13	2	0,153846154	0.001578	Fettsäure-Biosynthese (Signalweg eins)
93	13	0,139784946	0.001183	Oxidative Phosphorylierung
37	5	0,135135135	0.001183	Valin, Leucin und Isoleucine Degradation
46	5	0,108695652	0.001936	Benzoate Degradation via CoA Ligation
29	3	0,103448276	0.006863	Proteasomen
33	3	0,090909091	0.001183	Butanoate Metabolismus
23	2	0,086956522	0.001183	beta-Alanine Metabolismus
23	2	0,086956522	0.007438	GPI Anker Biosynthese
35	3	0,085714286	0	Lysine Degradation
24	2	0,083333333	0.001578	Limonene and Pinene degradation
28	2	0,071428571	0.005325	Notch Signalweg
28	2	0,071428571	0.007438	ATP Synthese
71	5	0,070422535	0.001578	Pyrimidine Metabolismus
29	2	0,068965517	0.001578	Propanoate Metabolismus
30	2	0,066666667	0.00355	Ubiquitin mediated proteolysis
62	4	0,064516129	0.001578	Fettsäure-Biosynthese (Signalweg zwei)
35	2	0,057142857	0	Stärke und Saccharose Metabolismus
73	4	0,054794521	0.001183	Adherens junction
41	2	0,048780488	0.006984	Fruktose und Mannose Metabolismus
144	7	0,048611111	0.001183	Focal adhesion
88	4	0,045454545	0.00355	Zellzyklus
44	2	0,045454545	0.004102	Nicotinate und Nicotinamide Metabolismus
170	6	0,035294118	0.002185	Regulation des Actin-Cytoskelett
57	2	0,035087719	0.00284	Glycerophospholipid Metabolismus
57	2	0,035087719	0.004642	Inositol Phosphate Metabolismus
58	2	0,034482759	0.00307	Glycolyse / Glukoneogenese
121	4	0,033057851	0.002582	Purin Metabolismus
211	6	0,028436019	0.001183	MAPK Signalweg
72	2	0,027777778	0.002185	Synthese und Degradation von Ketonkörpern
86	2	0,023255814	0.012909	Apoptose
94	2	0,021276596	0.002367	Tight junction
176	3	0,017045455	0.001936	Calcium Signalweg
225	2	0,008888889	0.002367	Cytokine-Cytokine Receptor Interaktion

Signalwege die den höchsten prozentualen Anteil an induzierten Transkripten auf dem Chip aufwiesen, betrafen hauptsächlich HRPC Gewebeproben. So z.B. ribosomale Transkription, oxidative Phosphorylierung, ATP-Synthese, Fettsäure Metabolismus / Biosynthese, Proteasomen, Ubiquitin vermittelte Proteolyse und Glykolyse / Glukoneogenese. Die signifikante Induktion der Phosphomevalonat Kinase (*PMVK*), Hydroxyacyl-Coenzyme A Dehydrogenase, Typ II (*HADH2*) und eine Induktionstendenz von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase (*HMGCR*), zeigten einen Anstieg der Steroid Biosynthese in HRPC an. Des Weiteren konnte eine Reprimierung von Transkripten in HRPC Gewebeproben detektiert werden, die die fokale Adhäsion, das Aktin Zytoskelett und die *adherence junctions* betrafen. Ferner waren folgende Signalwege signifikant in der Ausbildung der Hormonresistenten beim Prostatakarzinom beteiligt: Notch Signalweg, Zellzyklusregulation, MAP-Kinase Signalweg, Calcium abhängiger Signalweg und Apoptose (Tabelle 53).

Tabelle 53

Zellzyklus	
Gen	Differenziell reguliert in HRPC
<i>CDKN1A</i>	reprimiert
<i>CDC2L5</i>	reprimiert
<i>GAK</i>	induziert
<i>CCND1</i>	induziert

Apoptose	
Gen	Differenziell reguliert in HRPC
<i>PPP3CB</i>	reprimiert
<i>CASP9</i>	reprimiert

MAPK Signalweg	
Gen	Differenziell reguliert in HRPC
<i>YWHAZ</i>	induziert
<i>DUSP1</i>	reprimiert
<i>PPP3CB</i>	reprimiert
<i>JUND</i>	reprimiert
<i>STK24</i>	reprimiert
<i>FGF13</i>	induziert

Calcium abhängiger Signalweg	
Gen	Differenziell reguliert in HRPC
<i>SLC25A5</i>	induziert
<i>PPP3CB</i>	reprimiert
<i>MYLK</i>	reprimiert

NOTCH Signalweg	
Gene	Differenziell reguliert in HRPC
<i>CTBP2</i>	reprimiert
<i>NOTCH2</i>	reprimiert

4 DISKUSSION

Aus molekulargenetischen Forschungsergebnissen ist bekannt, dass Krebs durch irreparable Schäden in bestimmten Klassen von Erbanlagen entsteht. Vor allem drei Gruppen von Genen haben die Wissenschaftler in den letzten beiden Jahrzehnten identifiziert, die bei Krebs häufig verändert bzw. mutiert sind: die so genannten Proto-Onkogene, Tumor-Suppressor-Gene und Reparatur-Gene.

Sowohl Onkogene als auch Tumor-Suppressor-Gene kommen in allen gesunden Körperzellen vor. Sie regulieren dort üblicherweise die Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Während Onkogene generell Wachstum der Zelle fördern, wird es von Tumor-Suppressor-Genen inhibiert. Verliert dieses genetische Kontrollsystem seine Balance, kommt es zu unkontrolliertem Zellwachstum und es entsteht ein Tumor.

Als exogene Ursachen der genetischen Veränderungen werden heute drei Gruppen Krebs auslösender Mechanismen unterschieden, die auch als so genannte Karzinogene bezeichnet werden:

1. Chemische Substanzen
2. Viren
3. Strahlen

Nach heutigen Erkenntnissen sind etwa fünf bis zehn Prozent aller Krebserkrankungen auf eine erbliche Veranlagung zurückzuführen. Außerdem werden Psychische Faktoren und Ernährungsgewohnheiten in Betracht gezogen.

Maligne Neoplasien entstehen durch genetische und epigenetische Veränderungen somatischer Zellen. Aufgrund der Notwendigkeit der Akkumulation von mehreren Mutationen zur Ausbildung einer malignen Zelle, ein Prozess, für den eine lange Reihe von Zellteilungen notwendig erscheint, wird angenommen, dass das initiale Mutationsereignis für viele Neoplasien auf Stammzellniveau zu suchen sein muss. Die typische maligne Zelle entsteht schrittweise in einem so genannten Mikroevolutionsprozess, der über Jahre zu einer Akkumulation von fünf bis zehn kritischen Mutationen in einer spezifischen Zelle führt (Vogelstein und Kinzler, 1993). Jede dieser Mutationen, die hauptsächlich Gene für Zellteilungsregulation, Apoptoseregulation und DNA-Reparatur betreffen, führt zu einem kleinen Selektionsvorteil der betroffenen Zelle gegenüber den Nachbarzellen, bis ein Zellklon entsteht, der den Gesamtorganismus gefährdet (Thompson, 1995).

Die Zukunft der tumorrelevanten Biomarkerforschung wird sich nicht allein mit der Identifikation neuer *targets* beschäftigen, sondern mit der Aufklärung so genannter Marker-Profile, welche Hinweise auf entstandene möglicherweise maligne Zellklone geben.

Die Identifizierung der komplexen Zusammenhänge und die Auswirkungen auf den Gesamtorganismus sind dabei von entscheidender Bedeutung.

Basierend auf dem stetig wachsenden Wissen um die genetischen Erkrankungen, welche für maligne oder nicht maligne pathologische Prozesse verantwortlich sind, sind molekulargenetische Daten wertvolle Parameter, die nicht nur die konventionelle histopathologische Diagnose ergänzen, sondern auch eine Basis zur Aufklärung der Erkrankung bieten.

4.1 Mögliche Testsysteme zur Untersuchungen von Genmutationen in komplexen Gewebeverbänden

4.1.1 Molekulargenetische Analysen von Signaturmutationen (*p16^{INK4}*, *p53* und *DPC4*) für das Pankreaskarzinom in Geweben chronischer Pankreatitis

Tumorgewebe oder zytologische Präparate bestehen gewöhnlich aus heterogenen Zellpopulationen, wodurch die molekulargenetische Analyse einzelner Zellen eines Zellverbands erheblich erschweren kann. Je homogener die Zellpopulation, desto spezifischer und verlässlicher ist die gewonnene Untersuchungsinformation. In den letzten Jahren haben technische Fortschritte insbesondere auf dem Gebiet der Laser gestützten Mikrodissektion die PCR- Analyse geringster Mengen genomischer DNA oder RNA bis auf Einzelzellniveau hin ermöglicht (Dietmaier *et al.*, 1999; Heinmöller *et al.*, 2002a, b; Lizardi *et al.*, 1998; Schütze *et al.*, 1998).

Die Untersuchungen zur Mutagenese und somit auch u.a. zur Karzinogenese umfassen die Darstellung der Mutationsfrequenz und des Mutationsspektrums einer morphologisch normalen Zelle in ihrem ursprünglichen Gewebeverband. Ein hierfür etabliertes *in vivo* Testsystem war ein transgenes Maus Mutationssystem der Firma Stratagene, welche eine transgene Mauslinie zur Durchführung von *in vivo* Mutagenese-Versuchen entwickelt hatte (Big Blue TM Mouse Mutagenesis Assay System). Dieses System kann Substanzen auf ihre mutagene Wirkung zu testen.

Die transgenen Big Blue TM-Mäuse enthielten in ihrem Genom Kopien eines rekombinanten Lambda-Bakteriophagen, der das alpha Fragment des *lacZ* Gens und das *lacIq*-Repressorgen aus *E. coli* trägt. Mutationen konnten das *lacIq*-Gen inaktivieren. Nach der Behandlung der transgenen Mäuse mit mutagenen Substanzen wurde die DNA aus den Organen der Tiere isoliert, die ins Tiergenom integrierte Phagen-DNA *in vitro* in Phagen Partikel verpackt und zur Infektion eines *E. coli* K12-Stammes (SCS-8 oder VCS 257) verwendet, der das *lacZ*-Gen nur bei Abwesenheit eines funktionsfähigen *lacq*-Gens exprimiert. Phagenpartikel mit Mutationen im *lacq*-Gen waren an der Bildung von blauen Plaques auf Indikatormedium zu erkennen (Nishino *et al.*, 1996). Die Qualifizierung der

entstandenen Mutanten lässt Rückschlüsse darauf zu, ob eine Testsubstanz in Mäusen Mutationen induziert (Arrault *et al.*, 2002).

So sind die verschiedensten Akkumulationswege von Mutationen in den einzelnen Geweben innerhalb des Lebenszyklus der Maus untersucht worden. Hierbei wurden verschiedene Zelltypen (z.B. Lebergewebe mit Hepatozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten etc.) gemeinsam untersucht, ohne die einzelnen Zellarten zu diskriminieren. Dieser experimentelle Ansatz erlaubte allerdings nur recht grobe Aussagen über das Mutationsspektrum eines Gewebeverbands und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Organe des Menschen bleibt zweifelhaft.

Die Mutagensensibilität in menschlichen Geweben kann z.B. auch über endogene Reportergene gemessen werden. Dazu wurde am häufigsten das *HPRT*-Gen in T-Zellen untersucht. Der *HPRT*-Genmutationstest, ist ein Testverfahren bei dem die Mutationen durch den Verlust der Aktivität des Enzyms Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) erkannt werden. Dieses wandelt freie Purinbasen in die entsprechenden Nucleosidphosphate um und macht sie dadurch für die Synthese von Nucleinsäuren verfügbar. Die Selektion der Mutationen beruht auf der unterschiedlich ausgeprägten Toxizität der synthetischen Purinbase 6-Thioguanin (TG) für die mutierten und unveränderten Zellen. TG wird in Zellen mit funktionsfähigem HPRT in derart toxische Nucleotide umgewandelt mit der Folge dass diese absterben. Der Verlust der HPRT-Aktivität z.B. durch eine Genmutation hingegen führt zur Resistenz gegenüber TG. Für den HPRT-Genmutationstest wurden meist Hamster-Zelllinien (CHO) verwendet (Metzler *et al.*, 2001). Der Vorteil dieser Methode ist, im Vergleich zu mikrodisszierten Zellen mit vermuteter Mutation, dass der Test sehr genau die Zellen mit Mutation selektiert. Der Nachteil ist, dass die Mutationen künstlich erzeugt werden und daher keinen direkten Vergleich zu zufällig entstandenen Mutationen erlaubt.

Der Geneotypisierungs-Assay des *p53* Gens kann ebenfalls zur Analyse eines Mutationsspektrums verwendet werden. Hierbei konnten Mutationen nachgewiesen werden, welche innerhalb der Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease lagen. Durch den Einsatz repetitiver Restriktionsendonukleasen, im Wechsel mit PCR Amplifikation, konnten diese an Restriktionsstellen detektiert und quantifiziert werden. Anhand dieses Verfahrens sind eine hohe *p53* Mutationsbelastung (*mutation load*) in normalen Lungengeweben bei Patienten mit Bronchialkarzinomen festgestellt worden. Dabei wurden die bekannten Signaturmutationen von Zigarettenrauchinhaltsstoffen als Grundlage für den Assay verwendet (Hussain *et al.*, 2001). Ein erhöhter *p53 mutation load* wurde auf diese Weise auch bei Patienten mit Colitis ulcerosa gefunden (Hussain *et al.*, 2000). Der Nachteil der Methode bestand darin, dass nur wenige Codons analysiert

werden konnten und die histologische Kontrolle der mutierten Zelle/Zellpopulation *in situ* nicht möglich war.

Die immunhistochemische Anfärbung des p53 Protein, dessen mutationsinduzierte Stabilisierung erst zu einer immunhistochemisch detektierbaren Anfärbung führte, erlaubte eine *in situ* Analyse von p53 Mutationen in Einzelzellen oder Gewebestrukturen. Allerdings wurden hierdurch nicht alle Mutationen im p53 Gen detektiert, da z.B. Stop-Mutationen nicht zu einer p53 Protein Stabilisierung führen. Ferner erlaubte die immunhistochemische Expressionsanalyse nicht die genaue Lokalisation der Mutation im p53 Gen. Auf Grund der mangelnden Fixierung und der damit verbundenen Vorbehandlung der Gewebe eignete sich FFPE-Gewebe nur sehr eingeschränkt für diese Untersuchungen. Alternativ konnte natives Gewebe untersucht werden. Ling *et al.* verglichen in diesem Zusammenhang morphologisch gesundes Epidermis-Gewebe mit Gewebe sonnenexponierter Areale und haben dort eine deutlich erhöhte Anzahl von p53 Mutationen gefunden. Die Mikrodissektion gefärbter Einzelzellen aus diesem Gewebeverband mit anschließender molekulargentischer Bestimmung des Mutationsspektrums lieferten den Beweis von Sonnenlicht induzierten Signaturmutationen (Ling *et al.*, 2001). Die Verwendung von nativem Gewebe hat wesentliche Nachteile, da dieses Gewebe in der Regel nur sehr eingeschränkt verfügbar sind und die Archivierung mit hohen Kosten verbunden wären.

Wie oben bereits erwähnt, ist die immunhistochemische Expressionsanalyse nur eine indirekte Methode zur Detektion einer mutmaßlichen p53 Mutation. Mutationen im p53 Gen stabilisieren oft das resultierende Protein, so dass es immunhistochemisch detektiert werden kann (Davidoff *et al.*, 1991). Das p53 Protein hat eine Halbwertszeit von etwa 30 bis 50 Minuten (Ashcroft *et al.*, 1999) und kann deswegen *in vivo* durch immunhistochemische Detektionsmethoden nur schwer nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit von Wildtyp p53 kann auf bis zu drei Stunden durch Komplexbildungen mit beschädigter DNA oder durch Phosphorylierung von Serin-15 steigen (Albrechtsen *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 1995). Die Stabilisierung des p53 Proteins mit verlängerter Halbwertszeit *in vivo* erfolgt unter anderem durch eine gestörte MDM2 gesteuerte Degradation des Proteins als Folge der Mutation. Ferner kann Wildtyp p53 Protein als Antwort auf DNA-Degradation, Hypoxie, Aktivierung durch Onkogene, posttranslationale Modifikation, Phosphorylierung oder Acetylierung stabilisiert werden (Albrechtsen *et al.*, 1999; May *et al.*, 1999). Dadurch kann eine immunhistochemische Detektion von Wildtyp p53 Protein möglich werden. Die Mutationsdiagnose von p53 beruhte auf der Annahme dass mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesenes p53 eine Mutation besaß. Die oben aufgeführte natürliche Stabilisierung des p53 Proteins konnte eine falsch positive Mutationsdiagnose zur Folge haben. Eine weitere Ursache einer falsch positiven immunhistochemischen Mutationsdiagnose entstand durch die Gewebepreparation.

Durch eventuell zu starke Mikrowellen- oder Dampfvorbehandlung zur Antigenmaskierung, konnte der Schwellenwert der p53 Protein Detektion stark herabgesetzt und das Wildtyp p53 Protein sichtbar gemacht werden (Dowell *et al.*, 1996, Darnton *et al.*, 1998). Daraus folgte, dass Genmutationen in immunhistochemisch p53 positive Zellen mittels *p53* Sequenzierung verifiziert werden sollten.

Der Schlüssel zum Verständnis der Biologie des Pankreaskarzinoms liegt in der Erforschung progressionsrelevanter genetischer Alterationen im Tumor und seinen nicht invasiven Vorläuferläsionen. Die Kenntnis der molekularen Genetik des Pankreaskarzinoms ermöglicht die Entwicklung neuer Frühdiagnostiktests sowie neuer *targets* zur therapeutischen Intervention. Die schrittweise Akkumulation genetischer Mutationen in Proto-Onkogenen, Tumor-Suppressor-Genen und DNA-Reparatur-Genen im Verlauf des Karzinogenese Prozesses wurde für eine Vielzahl sporadischer neoplastischer Gewebeveränderungen gesichert (Fearon *et al.*, 1990; Mao *et al.*, 1997).

Gene oder epigenetische Veränderungen, welche eine wesentliche Rolle im Verlauf der Karzinogenese beim Pankreaskarzinom spielen, sollen im Folgenden aufgelistet werden:

Für die Onkogene das K-ras und Her2/neu wurde die Beteiligung an der Pankreaskarzinogenese gut dokumentiert. Nahezu alle Mutationen im K-ras Onkogen finden sich im Codon 12 und das Pankreaskarzinom gehört zu den Tumoren mit der höchsten Mutationsfrequenz, die je nach Nachweismethode und Gewebedissektionstechnik fast 100% betrug (Almoguera *et al.*, 1988; Rozenblum *et al.*, 1997). Schon in ersten morphologisch erkennbaren präneoplastischen Gangveränderungen konnten K-ras Mutationen gefunden werden, sogar in normalen Pankreasgeweben sind K-ras Mutationen in einer Frequenz zwischen 19% und 38% beschrieben worden (Tada *et al.*, 1996; Lüttges *et al.*, 1999, 2000; Berger *et al.*, 1999). In Gangläsionen bei chronischer Pankreatitis fanden sich K-ras Mutationen in einer Frequenz zwischen 18% und 62,5% (Rivera *et al.*, 1997, Yanagisawa *et al.*, 1993, Lüttges *et al.*, 2000). Auf Grund der bereits guten Charakterisierung dieser genetischen Veränderungen in Pankreasgeweben und der dokumentierten mangelnden Spezifität einer K-ras Mutation bezüglich einer Früherkennung beim duktalem Pankreaskarzinom (Lüttges *et al.*, 1999, 2000; Löhr *et al.*, 2005) wurde auf eine Untersuchung dieser genetischen Alteration in dieser Arbeit verzichtet.

Her-2/neu (c-erbB-2) Onkogen:

Ein weiteres wichtiges Proto-Onkogen im Karzinogeneseprozess zahlreicher Tumoren war Her-2/neu. Dies ist der Familie der epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptoren (EGFR) zugehörig. Her-2/neu kodiert ein transmembranöses Glykoprotein von 185kDa. Die Amplifikation und Überexpression war in zahlreichen Tumoren nachweisbar (Slamon *et al.*, 1987; Day *et al.*, 1996; Sibilia *et al.*, 2000). In Pankreaskarzinomen fand sich eine

breit gestreute Angabe zur Überexpression von Her-2/neu (zwischen 21% [Safran *et al.*, 2001] und 80% [Apple *et al.*, 1999]), wenn die Bestimmung mittels Immunhistochemie erfolgte. Nur 27% der positiven IHC-Fälle aber zeigten eine mittels FISH messbare Amplifikation (Safran *et al.*, 2001). Während bei chronischer Pankreatitis und in anderen nicht neoplastischen Pankreasgeweben keine Her-2/neu Überexpression erkennbar waren, zeigte sich beim duktalem Pankreaskarzinom bereits in frühesten morphologisch fassbaren Gangveränderungen eine Überexpression (Day *et al.*, 1996, Apple *et al.*, 1999, Yamanaka *et al.*, 1993).

Dass die Überexpression von Her-2/neu von bedeutender biologischer Wichtigkeit beim Pankreaskarzinom ist, wurden in *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt. So wurde eine Wachstumsinhibition von Pankreaskarzinomzelllinien und Pankreaskarzinom Xenografts durch Blockierung des EGFR-Signalwegs mittels Antikörper oder durch Expression von dominant-negativen EGFR-Allelen gezeigt (Watanabe *et al.*, 1996, Wagner *et al.*, 1996, Overholser *et al.*, 2000). Da auch die Rolle von Her-2/neu im Verlauf der Karzinogenese analog zu K-ras beim duktalem Pankreaskarzinom gut dokumentiert worden ist, wurde auf die Untersuchung in dieser Arbeit verzichtet.

Neben den oben beschriebenen Genmutationen wurden weitere genetische Alterationen mit niedriger Mutationsfrequenz in Pankreaskarzinomen gefunden. BRCA1 und BRCA2 Mutationen sind typisch für hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinome (*Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. The breast cancer linkage consortium*, 1999; Thompson *et al.*, 2002). Bei familiären Pankreaskarzinomen wurde in 17% bis 19% eine BRCA2 Mutation gefunden (Murphy *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2003). BRCA2 gehört zu den Genen mit einer regulatorischen Funktion genetischer Stabilität und ist sowohl an der Reparatur von DNA-Schäden als auch der Überwachung einer geordneten Transkription der Gene beteiligt (Venkitamaran, 2002). Bisher wurde nur in einer PanIN-3 Läsion eines Patienten mit Keimbahnmutation eine BRCA2 Mutation gefunden. In weiteren 13 PanIN-1A bis PanIN-2 Läsionen wurden keine Mutationen nachgewiesen (Goggins *et al.*, 2000). BRCA1 schien ebenfalls in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms eine Rolle zu spielen, Beger und Kollegen hatten 2004 gezeigt, dass eine reduzierte Expression des Gens sowohl in den untersuchten Pankreaskarzinome als auch in Geweben chronischer Pankreatitis mit jeweils 50% vorlag.

Mutationen in den DNA *mismatch repair* Genen (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*), welche ursprünglich im Zusammenhang mit dem hereditären nicht Polypösen Kolon Karzinom Syndrom (HNPCC) beschrieben wurden, wurden in 1% bis 17% aller Pankreaskarzinome beschrieben (Yamamoto *et al.*, 2001, Nakata *et al.*, 2002, Rozenblum *et al.*, 1997). Ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Pankreaskarzinomen wurde in HNPCC-Syndrom Familien als gesichert angenommen (Aarnio *et al.*, 1995).

Die DNA Methylierung und die damit verbundene Inaktivierung von Genen ist ein weit verbreitetes Phänomen in Tumoren. Etwa 50% aller humanen Gene besitzen CpG Inseln, in der Promotorregion der Gene. Die Methylierung verschiedener Gene (z.B. *p16^{INK4}*, *Rb*, *VHL*, *hMLH1*, *hMSH2*) wurde in zahlreichen Tumorentitäten beschrieben, so auch beim Pankreaskarzinom (Ueki *et al.*, 2000). Neben *p16^{INK4}* wurde auch das Gen Preproenkephalin (*ppENK*), welches eine wachstumshemmende Funktion ausübt, in 90% der Pankreaskarzinome methyliert gefunden (Ueki *et al.*, 2001). Die Methylierung von Genen, welche eine wichtige Rolle während des Karzinogeneseprozesses spielen, findet schon sehr früh in der Krebsentwicklung statt. Die Methylierung des *p16^{INK4}* Gens stieg in PanIN-1A von 12% auf 21,4% in PanIN-3 Läsionen an. Für das *ppENK* Gen ist ein Anstieg in diesen Läsionen von 7,7% auf 46,2% nachgewiesen worden. Normales (nicht neoplastisches) Epithel hingegen war nicht methyliert (Fukushima *et al.*, 2002). Die Ergebnisse für PanINs aus Geweben chronischer Pankreatitis waren bisher widersprüchlich, da Fukushima *et al.* (2002) keine Methylierung in der Promoterregion von *ppENK* und *p16^{INK4}* in 22 PanIN-1A bis PanIN-3 feststellten, während Gerdes *et al.* (2001) in 20% (2 von 10 PanIN-1A) eine *p16^{INK4}* Promoter Hypermethylierung zeigte.

Eine erhöhte Proliferationsrate normaler Zellpopulationen gilt als wesentliche Ursache für die Entstehung von Tumoren (Preston-Martin *et al.*, 1990). Es wird angenommen, dass Mutationen in Genen, die den Zellzyklus steuern oder Wachstumssignale vermitteln in nahezu allen Tumoren nachweisbar sind (Sherr 2001). Eine oder mehrere Mutationen in den Tumor-Suppressor-Genen *p53*, *p16^{INK4}* und *DPC4* wurden in fast allen duktalem Pankreaskarzinomen nachgewiesen. Alterationen dieser Gene gelten deshalb als Signaturmutationen für das Pankreaskarzinom (Bardeesy *et al.*, 2002).

Diese drei Gene wurden in Geweben mit duktalem Pankreaskarzinom und chronischer Pankreatitis in dieser Arbeit intensiv untersucht, hierauf soll im Folgenden näher eingegangen werden.

In humanen Zellen wird der Zellzyklus zum Teil durch Cyclin-Kinase-Inhibitoren gesteuert. Es wird angenommen, dass menschliche Zellen einen Cyclin-Kinase-Inhibitor (CKI) herstellen. Obwohl das Protein noch nicht identifiziert wurde ist bekannt, dass humane Zellen mehrere an der Regulation des Zellzyklus beteiligte CKI-Moleküle exprimieren. Diese werden in zwei Klassen eingeteilt:

1. CDK-Inhibitor-Proteine, von denen sämtliche CDK1-, CDK2-, CDK4- und CDK6-Cyclin Komplexe gehemmt werden.
2. Inhibitoren der Kinase 4 (INK4). Von diesen Proteinen werden spezifisch CDK4-CyclinD- und CDK6-CyclinD-Komplexe gebunden und gehemmt.

Experimentell kann eine Überexpression von INK4-Protein hervorgerufen werden, wobei die erhaltenen Zellen die G1-Phase nicht mehr durchlaufen können. Dabei wirkt das

INK4-Protein p16 als Tumor-Suppressor. Die Aufgaben der anderen INK4-Proteine sind bisher unbekannt.

In vielen Krebszellen ist das Gen für den CDK-Inhibitor p16 ausgefallen und fehlt für eine normale und wirkungsvolle Regulation des Zellzyklus. In den letzten Jahren ist das Verständnis der Funktion der Zellzykluskontrolle und dessen Bedeutung für die Tumorgenese erweitert worden. Das Pankreaskarzinom unterscheidet sich von allen epithelialen Tumoren durch eine sehr hohe Prävalenz an inaktivierenden Mutationen des *p16^{INK4}* Gens. Es wurde gezeigt, dass *p16^{INK4}* in 96% der untersuchten Pankreaskarzinome inaktiviert, in 38% der Fälle mutiert, in weiteren 42% homozygot deletiert war. In einem geringen Anteil (ca.15%) war *p16^{INK4}* durch eine Hypermethylierung des Promotors in der Expression reduziert (Caldas *et al.* 1994; Schutte *et al.* 1997).

Das *CDKN2A* Tumor-Suppressor-Gen codiert ungewöhnlicherweise zwei Tumor-Suppressor-Gene mittels unterschiedlicher Leseraster des ersten Exons, das in die gemeinsamen Exons 2 und 3 mündet. So entsteht *p14ARF* (*alternative reading frame*) aus Exon 1 β und *p16^{INK4}* aus Exon 1 α . *p16^{INK4}* blockt spezifisch *CDK4* und *CDK6*, *p14ARF* den *p53* Suppressor *MDM2*, was zu einer vermehrten Bereitstellung von p53 Protein in der Zelle führt (Sherr 2001). Im Pankreaskarzinom wurde häufig eine Inaktivierung beider Genteilstücke durch homozygote Deletion, LOH mit somatischer Mutation im verbleibenden Allel oder durch Inaktivierung mittels Methylierung der Promotorregion gefunden (Schutte *et al.*, 1997).

Das *p53* Tumor-Suppressor-Gen (17p13) wurde in mehr als 50% aller humanen Tumoren (Greenblatt *et al.*, 1994) und in bis zu 81% aller duktaalen Pankreaskarzinomen mutiert gefunden (Rozenblum *et al.*, 1997, Heinmöller *et al.*, 2000). Die Inaktivierung erfolgte in der Regel durch eine missense Mutation im einen Allel sowie einem LOH des anderen Allels. *p53* spielt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der genetischen Homöostase der Zelle. Es integriert verschiedenste Signalwege. Eine der möglichen gravierenden Folgen eines Funktionsverlustes von *p53* besteht in der Entstehung genetischer Instabilität in nachfolgenden Zellgenerationen (Hainaut *et al.*, 2000).

Das von Hahn *et al.* (1996a, 1996b) charakterisierte Gen *DPC4* (*SMAD4*) ist Bestandteil der intrazellulären Signalkette der TGF- β vermittelten Wachstums- und Differenzierungsregulation. Eine Störung dieser Signalkette trägt zum Erwerb eines Zellphänotyps mit ungebremster Wachstumsregulation bei und ist somit im Prozess der Karzinogenese von Bedeutung (Dai *et al.*, 1998, Heldin *et al.* 1997). Eine weitere wesentliche, für die Tumorentstehung und -progression wichtige Funktion scheint die Suppression der Angiogenese zu sein (Schwarte-Walthoff *et al.*, 2000).

In den molekulargenetischen Untersuchungen beim duktaalen Pankreaskarzinom und der chronischen Pankreatitis wurde in dieser Arbeit die *whole genome amplification* (I-PEP-

PCR) Technik verwendet (Dietmaier *et al.*, 1999; Heinmöller *et al.*, 2002). Die Technik der Präamplifizierung bietet sich vor allem dann an, wenn kleinste Zellmengen untersucht werden sollen. Ferner ist es möglich aus unstrukturierten Geweben wie z.B. Tumoren eine Untersuchung zahlreicher kleiner, von einander getrennter Areale durchzuführen. Ziel der Untersuchungen in Pankreasgeweben mit chronischer Pankreatitis war die Analyse der Signaturmutationen (*p16^{INK4}*, *p53* und *DPC4*) in einzelnen PanINs mittels I-PEP-PCR und immunhistochemischer Expressionsanalyse des p53 Proteins, insbesondere unter der Fragestellung des zeitlichen Verlaufs des Eintretens einzelner Mutationen in PanINs. Hierdurch lassen sich möglicherweise Erkenntnisse zur Relevanz einzelner Genmutationen zur Karzinogenese beim Pankreaskarzinom herleiten und somit auch mögliche Anwendungen von Mutationsuntersuchungen in der Entwicklung von Biomarkern insbesondere für das Pankreaskarzinom, welche bei Risikopatienten (langjährige chronische Pankreatitis) einsetzbar wären.

Da die molekulargenetischen Alterationen in Geweben mit Pankreaskarzinom bereits gut dokumentiert wurden, war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, die Untersuchung von PanINs in Geweben chronischer Pankreatitis. Hierbei sollte ermittelt werden ob sich die bekannten Signaturmutationen beim Pankreaskarzinom (*p16^{INK4}*, *p53* und *DPC4*) auch in PanINs nachweisen lassen. Dazu wurde eine LOH Analyse von mikrodisssezierten PanINs1-3 in Geweben chronischer Pankreatitis sowie von Gängen normaler Morphologie durchgeführt. Dabei sollte eine Reihenfolge des Auftretens bestimmter Mutationen im Sinne einer molekularen Progression ermittelt werden. Da die I-PEP-PCR Technik die simultane Analyse multipler Gene in einer Läsion gestattete, sollte auch die Akkumulation einzelner Mutationen in verschiedenen PanIN Graden gemessen werden. Eine sehr wichtige Unterscheidung einzelner PanIN Grade war das Vorliegen oder das Fehlen einer nukleären Atypie der nicht invasiven Gangepithelien. Das Auftreten einer nukleären Atypie spiegelte eine fortgeschrittene genetische Instabilität wider. Diese Übergangszone (Progressionszone) war für die Erforschung des Karzinogeneseprozesses von besonderer Bedeutung. Im Pankreas befindet sich diese Übergangszone gemessen an der nukleären Atypie zwischen PanIN-1B (keine nukleäre Atypie) und PanIN-2 (leichtgradige nukleäre Atypie). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten wurden mit einer parallel dazu durchgeführten Expressionsanalyse des p53 Proteins in Karzinomen und den dazugehörigen PanIN korreliert.

Die pathogenetisch frühen genetischen Alterationen eigneten sich besonders gut für ein Screening zum Erfassen von Risikopatienten. Das *K-ras* Gen wurde als Kandidat für ein einfaches Screening diskutiert, jedoch hatte sich dieser Marker als zu unspezifisch für ein konkretes *risk assessment* herausgestellt (Kuska *et al.*, 1999, Howes *et al.*, 2000).

In Gangläsionen bei chronischer Pankreatitis fanden sich *K-ras* Mutationen in einer Frequenz zwischen 18% und 62,5% (Rivera *et al.*, 1997, Yanagisawa *et al.*, 1993,

Lüttges *et al.*, 2000). Bei der alleinigen Detektion einer *K-ras* Mutation konnte nicht auf ein gesteigertes neoplastisches Potential der untersuchten Läsion geschlossen werden. Die Signifikanz einer solchen Mutation in Geweben chronischer Pankreatitis erschien nach ersten vorsichtigen Einschätzungen gering. Nach einem Langzeit *follow up* bei 20 Patienten mit chronischer Pankreatitis und einer aus Pankreassekret diagnostizierten *K-ras* Mutation wurde nach 78 Monaten kein duktales Pankreaskarzinom diagnostiziert (Furuya *et al.*, 1997).

Eine fehlende Klassifizierung analog dem PanIN-System der untersuchten intraduktalen Läsionen in früheren Studien, erschwerte zusätzlich eine Vergleichbarkeit der erhobenen Daten. Mittels Immunhistochemie wurde kein Genausfall von *p53* gefunden (Lüttges *et al.*, 2000). Insbesondere in Gewebeproben von Patienten mit chronischer Pankreatitis korrelierten die IHC-Daten nur eingeschränkt mit dem Mutationsstatus. Als Folge der Entzündung konnte eine positive p53 Protein Immunhistochemie bei Wildtyp *p53* häufig nachgewiesen werden (Maake *et al.* 1997). Heterozygote Mutationen, die ein erhöhtes Risiko für den Ausfall beider Wildtyp Allel darstellten, wurden durch diese Technik nicht erfasst. In einer Studie, bei der molekulare Untersuchungen zum Status des *p53* Gens bei chronischer Pankreatitis durchgeführt wurden, wurden Mutationen bei 10% der Patienten gefunden (Gansauge *et al.*, 1998). Diese Daten waren unvollständig und wenig hilfreich für die genaue Zuordnung von Morphologie und für die molekulare Diagnostik. In dieser Studie wurde weder eine Mikrodissektion der Gangläsionen durchgeführt, noch wurde histopatologisches Grading erhoben.

Das *p16^{INK4}* Gen wurde bisher in nur wenigen Fällen mit chronischer Pankreatitis untersucht. Mit immunhistochemischen Analysen konnte Gerdes *et al.* (2001) einen Expressionsverlust in 40% der untersuchten PanIN-1A Fälle feststellen. Sequenzänderungen der DNA wurden nicht gefunden. In dieser Studie wurde keine LOH-Diagnostik durchgeführt, sodass der genaue molekulare Inaktivierungsmechanismus des *p16^{INK4}* Gens nicht bekannt war. Die Ergebnisse für PanINs aus Geweben chronischer Pankreatitis sind wie bereits oben diskutiert bisher widersprüchlich (Fukushima *et al.*, 2002; Gerdes *et al.*, 2001). In einer Studie mit Geweben von 122 Patienten mit chronischer Pankreatitis hatten Rosty *et al.* (2003) einen p16 Proteinverlust in keiner der PanIN-1A Läsionen gefunden, hingegen einen Verlust in 11% der PanIN-1B, in 16% der PanIN-2 und in 40% der PanIN-3 Läsionen.

Für das *DPC4* Gen lagen gegenwärtig nur vereinzelte Untersuchungen in Geweben chronischer Pankreatitis vor. Diese basierten alle auf immunhistochemischen Untersuchungen auf der Grundlage der Arbeiten von Wilentz *et al.* (2000b). Darin wurde gezeigt, dass ein Verlust der DPC4-Färbung in der IHC eine Inaktivierung des Gens auf molekularer Ebene verlässlich widerspiegelt. Die immunhistochemische Expressionsanalyse analog zu der Untersuchung des p53 Proteins, gab keine Auskunft

über eine möglicherweise bereits vorliegende heterozygote Mutation in PanIN-1 oder PanIN-2. Tang *et al.* (2002) hatten hingegen keine *DPC4* Inaktivierung gefunden. Bei McCarthy *et al.* (2001) waren bei zwei Patienten mit chronischer Pankreatitis PanIN-3 Läsionen zu finden, ferner zeigte einer der beiden Patienten einen Expressionsverlust des *DPC4* Protein. PanIN-1 und PanIN-2 Läsionen zeigten keinen Expressionsverlust. Einen Expressionsverlust in Läsionen PanIN-1a bis PanIN-3 wurde in der oben genannten Studie von Rosty *et al.* (2003) nicht gefunden. Costentin *et al.* (2002) hatten *p16^{INK4}*- und *DPC4* Gendelektionen in mittels ERCP-Technik gewonnenem Pankreassekret gefunden. Diese Autoren hatten mittels einer Multiplex PCR-Technik eine Deletion im *DPC4* Gen in 58% der Karzinomgewebe und 36% in Geweben chronischer Pankreatitis identifiziert.

Bisher wurden noch keine vergleichenden molekulargenetische Untersuchungen aller drei Signaturgene für das duktales Pankreaskarzinom im Vergleich zu Geweben chronischer Pankreatitis angestellt. Die vorliegende Arbeit stellt die ersten Ergebnisse molekulargenetischer Studien von Laser mikrodisezierten PanINs in diesem Zusammenhang vor.

In dieser Arbeit wurden die ersten Ergebnisse molekulargenetischer Studien von Laser mikrodisezierten PanINs aus Geweben chronischer Pankreatitis von 21 Patienten präsentiert. Hierbei wurden sowohl LOH-Analysen der Gene *p53*, *p16^{INK4}* und *DPC4* als auch partiell Sequenzanalysen der Gene *p53* und *p16^{INK4}* durchgeführt. Ergänzt wurde diese Untersuchungen durch immunhistochemische Expressionsanalysen der Gene *p16^{INK4}*, *p53* und *DPC4*. Hierbei sollte untersucht werden, ob es bereits in Geweben chronischer Pankreatitis zu Mutationen dieser Gene kommt. Dabei war von besonderem Interesse, welche PanIN-Grade von diesen Mutationen betroffen wurden. Ferner sollte bestimmt werden, ob sich die zeitliche Abfolge einzelner Mutationsereignisse an Hand der Präsenz heterozygoter Mutationen festlegen lässt. Schließlich war von Interesse, ob eine Aneuploidie in PanINs messbar ist und ob diese mit molekulargenetischen Daten zu korrelieren ist. Zusätzlich zu PanINs sind auch DM mikrodiseziert worden, welche häufig als Regeneratgänge in dicht fibrosierten Gewebearealen zu finden waren. Die Arbeitshypothese war, dass in diesen Regeneratgängen ein chronischer hyperproliferativer Stimulus möglicherweise zu einem erhöhten Zellturnover führt, was möglicherweise über längere Zeit zu einer Akkumulation von Mutationen führen könnte (Preston-Martin *et al.*, 1990). Es wurden sowohl in PanINs als auch in DM Mutationen in allen drei Tumor-Suppressor-Genen gefunden, allerdings in geringer Anzahl. Eine Ausnahme hiervon bilden PanIN-3 Läsionen, welche im Gewebe eines Studienpatienten (CP10) gefunden wurden. Dieser besondere Fall soll weiter unten ausführlicher diskutiert werden. PanIN-1 Läsionen, welche häufig in chronischer Pankreatitis als auch in normalen Geweben anzutreffen waren (Abraham *et al.*, 2003) zeigten zusammen mit DM

eine LOH-Rate zwischen 2,1% (*p53*-LOH) und 5,8% (*p16^{INK4}*-LOH), wobei hier kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit einzelner Genveränderungen zu erkennen war. Allerdings zeigte sich ein Trend für ein häufigeres LOH-Ereignis am *p16^{INK4}* Genlokus. PanIN-1 Läsionen und DM repräsentierten das überwiegende Spektrum der Gangläsionen in chronischer Pankreatitis. PanIN-2 Läsionen und PanIN-3 Läsionen waren weitaus seltener und sind in dieser Arbeit in sehr ähnlicher Anzahl im Vergleich zu bisher publizierten Daten zu finden (Abraham *et al.*, 2003). Allerdings zeigte auch diese Arbeit analog zu Daten beim Pankreaskarzinom eine Steigerung der LOH-Ereignisse im Übergang von PanIN-1B zu PanIN-2 und auch zum Übergang zu PanIN-3 Läsionen. Hier fand sich eine signifikante Anhäufung der LOH-Ereignisse aller drei untersuchten Genloci mit Ausnahme von LOH-Ereignissen am *DPC4* Genlokus im Übergang von PanIN-1B zu PanIN-2, sodass auch die PanINs in chronischer Pankreatitis als echte Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms aufzufassen waren. Dies galt insbesondere für die höhergradigen PanINs (PanIN-2 und speziell PanIN-3). Die geringe Anzahl von gefundenen LOH-Ereignisse in DM und PanIN-1 Läsionen bis maximal 5,8% ließ in den Fällen ohne höhergradige PanINs (PanIN-2 und PanIN-3) jedoch ein nur geringes Progressionsrisiko annehmen. Hierfür sprach auch, dass in den immunhistochemischen Expressionsanalysen in DM und PanIN-1 Läsionen kein Ausfall von *p16* Protein, *p53* Protein oder *DPC4* Protein gesehen wurden. Auch in PanIN-2 Läsionen wurde kein Ausfall des *p53* Proteins und des *DPC4* Proteins gefunden, allerdings zeigte das *p16* Protein bereits in 20% der Gänge eine reduzierte Expression, was auf einen Ausfall des Gens hindeutete. Diese Zahlen deckten sich auch überraschend gut mit dem gefundenen Progressionsrisiko in ein duktales Pankreaskarzinom bei chronischer Pankreatitis von etwa 5% (Lowenfels *et al.*, 1993, 1997). Hervorzuheben sei, dass in DM eine ähnlich hohe Anzahl LOHs aller drei Tumor-Suppressor-Gene gefunden wurden, im Vergleich zu PanINs, sodass diese Gangläsionen für das molekulargenetische Progressionsmodell eine gleichartige Wertigkeit wie insbesondere PanIN-1 Läsionen erhalten sollten. Bemerkenswert war weiterhin, dass sich die hier gefundene Mutationsrate der Gene *p16^{INK4}* und *p53* in den Geweben chronischer Pankreatitis nur teilweise mit den bisher publizierten Daten deckte. Allerdings wurden bisher keine LOH-Analysen durchgeführt und/oder PanIN-Läsionen nur unzureichend klassifiziert, sodass die Daten dieser Arbeit mit andernorts erhobenen Daten nur eingeschränkt vergleichbar sind. Auch wurden in der vorliegenden Arbeit keine Methylierungsanalysen durchgeführt. Gerdes *et al.* (2001) hatten in 40% der untersuchten PanIN-1A Läsionen einen Ausfall des *p16^{INK4}* Gens nach immunhistochemischer Expressionsanalyse nachgewiesen, wogegen in der vorliegenden Arbeit keine Proteinausfälle in PanIN-1 Läsionen registriert werden konnten. Ferner hatten Gerdes *et al.* (2001) in 20% eine *p16^{INK4}* Promotor Hypermethylierung nachgewiesen, welche von Fukushima *et al.* (2002) bei chronischer Pankreatitis nicht gefunden wurden. Gerdes *et al.* (2001) hatten in der Sequenzanalyse des *p16^{INK4}* Gens

keine Mutationen nachgewiesen, eine LOH Analyse wurde nicht durchgeführt. So blieb der inaktivierende Mechanismus für zumindest einen Teil der PanIN Läsionen unklar. In der Studie von Rosty *et al.* (2003) war ein gradueller Anstieg des $p16^{INK4}$ Expressionsverlustes mit steigendem Grad der PanIN Läsionen nachgewiesen worden, wobei diese Daten den in vorliegender Arbeit gefundenen Daten am nächsten kamen. Unterschiedliche methodische Ansätze waren möglicherweise auch für die diskrepanten Ergebnisse verantwortlich. Insbesondere die Beurteilung der immunhistochemischen Expression des p16 Proteins war im Allgemeinen problematisch (Biankin *et al.*, 2004). In PanIN-1 Läsionen fanden sich gewöhnlich eine nur geringe physiologische Expression des p16 Proteins (etwa 1% der Epithelien) zusammen mit der geringen Zellmenge, da es sich in der Regel um kleine Gangläsionen handelte. Hierdurch bestand die Gefahr, dass es zur falsch positiven Diagnose eines Verlusts der p16 Proteinexpression kam. Welche der bisher publizierten Daten am ehesten der *in vivo* Situation bei chronischer Pankreatitis entsprachen muss durch weitere Studien geklärt werden, hier insbesondere unter Berücksichtigung einer Sequenzanalyse einzelner Gene, welche eine Erfassung heterozygoter Genauffälle gestattet. Generell lässt sich festhalten, dass sich ähnlich wie in duktalem Pankreaskarzinomen assoziierten PanINs auch in chronischer Pankreatitis ein LOH einzelner Gene vor dem immunhistochemisch detektierten Ausfall des jeweiligen Proteins fand (Lüttges *et al.*, 2001).

4.2 Aneuploidie und Krebs

Die Aneuploidie ist eine Genommutation, bei der einzelne Chromosomen zusätzlich zum üblichen Chromosomensatz vorhanden sind oder fehlen. Sie ist in malignen Tumoren ein häufig zu beobachtendes Phänomen. Ob Aneuploidie eine Folge oder die Ursache von Krebs ist, ist seit langem umstritten (Bialy, 2001). Bereits vor einem Jahrhundert wurde von Boveri Aneuploidie als Ursache von Krebs vorgeschlagen (Boveri, 1914). Ein halbes Jahrhundert später konnte dann allerdings gezeigt werden, dass Krebszellen nicht klonal für Aneuploidie sind, wohl aber für Genmutationen. Daraufhin wurde die Theorie aufgegeben und seither die Genmutation als Ursache und Aneuploidie als Folge der Krebsentstehung angesehen. Neuere Erkenntnisse führten zu der Annahme, dass Aneuploidie als eigenständiges Ereignis zu betrachten sei, welches zur malignen Transformation und dem Tumor-Progressionsprozess beiträgt (Sen *et al.*, 2000). Dies begründet sich auf folgende Feststellungen:

1. Spezifische Chromosomen Aneusomien (durch *in situ*-Hybridisierung und vergleichende genomische Hybridisationstechniken in primären Tumoren nachgewiesen) korrelierten mit bestimmten Tumorphänotypen, z.B. bei Prostatakarzinomen (Toma *et al.*, 2005).

2. Aneuploide Tumorzelllinien und *in vitro* transformierte Nagerzellen wiesen eine erhöhte genetische Instabilität auf und deuteten darauf hin, dass Aneuploidie ein dynamisches Ereignis sein könnte, welches mit der malignen Transformation von Zellen assoziiert ist (Li *et al.*, 1997; Duesberg *et al.*, 2000a).

3. Eine Anzahl mitoserelevanter Gene, welche die Chromosomen Verteilung regulieren, wurden in humanen Tumorzellen in mutierter Form vorgefunden (Cahill *et al.*, 1998). Dies deutete darauf hin, dass solche Mutationen bei der Induktion von Aneuploidie eine Rolle spielen. Einige dieser Genmutationen, welche eine ungleiche Chromosomenverteilung in den Tochterzellen erlaubten, induzierten *in vitro* eine maligne Transformation von Zellen.

Im Gegensatz zu oben genannten Überlegungen, welche von Genmutationen als Grundlage der Aneuploidie- Induktion ausgehen, wurde von Duesberg *et al.* (2000a) sogar die Karzinogenese als ein zweistufiger Aneuploidie-induzierter Prozess, der keine Beteiligung von Genmutationen benötigt, postuliert:

1. Initiation durch eine präneoplastische Aneuploidie in zumeist histomorphologisch normalen Zellen.

2. Autokatalytische Weiterentwicklung des Karyotyps der initiierten Zelle durch numerisch und strukturell veränderte Centrosomen und an der Mitose beteiligten Proteine. Dies könnte zu einer Vielzahl neuer Karyotypen führen, unter denen sowohl nicht neoplastische als auch neoplastische maligne Zellklone gefunden werden können (Analog der Evolution neuer Spezies).

Duesberg und Rasnick (2000) begründeten ihre Hypothese

(a) mit der Aneuploidie solider Tumoren,

(b) der Aneuploidie-Induktion durch genotoxische und nicht-genotoxische Kanzerogene,

(c) der starken Änderung biochemischer Phänotypen durch Aneuploidie und fehlender phänotypischer Veränderung durch Mutation von Onkogenen und Tumor-Suppressor-Genen,

(d) der Immortalisierung von Zellen durch Aneuploidie,

(e) der Schaffung abnormer nicht-karzinogener Phänotypen durch Aneuploidie,

(f) der Proportionalität von Aneuploidiegrad und Ausmaß der Abnormität in Tumor- und anderen Zellen,

(g) der Variation biologischer Phänotypen durch Polyploidie und

(h) der Variation der Chromosomenzahl als Basis der Artenbildung. Dabei sahen sich

Duesberg *et al.* (2000b) durch Versuche zur Arzneimittelresistenz in transformierten Zellen und Interpretation (Li *et al.*, 2000) einer Arbeit von Hahn *et al.* (1999), die die Ursache in der Genmutation sehen unterstützt, bestätigt.

Die Ursache der Aneuploidie war vermutlich auf eine Störung des Spindelapparates oder der Zahl der Centromeren während der Mitose zurückzuführen. Kommt es zur verfrühten

Zellteilung, ohne dass sich die Chromosomen in der Metaphase adäquat ausgerichtet haben, resultiert eine Aneuploidie. Eine wichtige Regulatorfunktion kommt hierbei den Genen *mad2* und *bub1* zu, deren Expression bei Mamma- bzw. Kolonkarzinomen gestört waren (Cahill *et al.*, 1998; Li *et al.* 1996; Michael *et al.* 2001). Vertreter der *bub/mad*-Genfamilien (*bub*: budding uninhibited by benzimidazole; *Mad* mitotic arrest defective) spielen beim Übergang von Meta- zu Anaphase durch Erkennung und Bindung an freie Kinetochore eine Rolle. Sie induzieren im aktivierten Checkpoint ein Wartesignal, welches u.a. die APC/C-cdc20 (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*)-vermittelte Degradation von Securin und somit die Trennung der Chromatiden hemmt (Abb. 57).

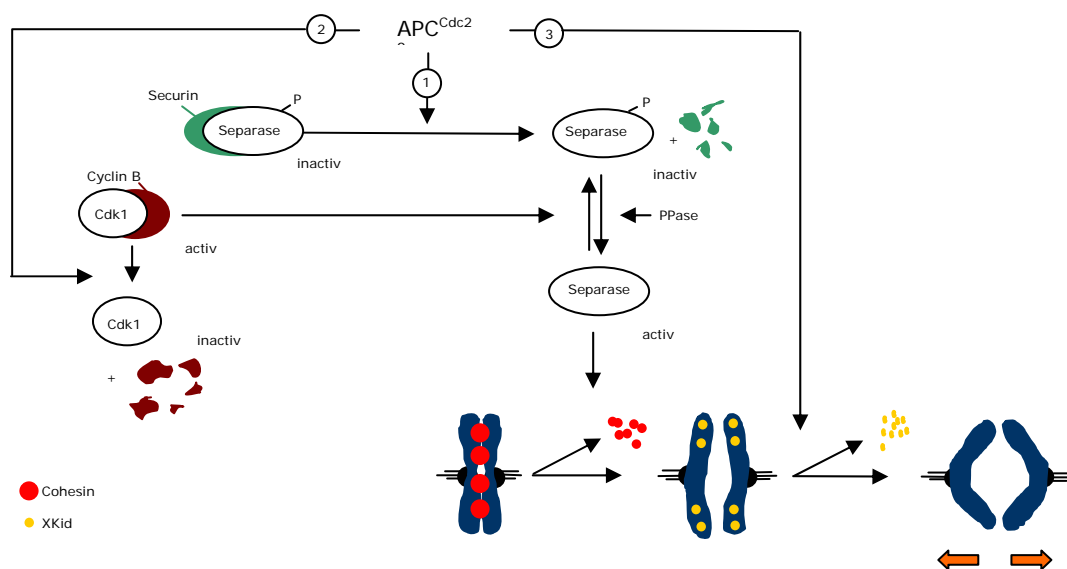


Abb. 57: Regulation der Anaphase durch APC^{Cdc20}

APC^{Cdc20} initiiert die Anaphase in durch mindestens drei Mechanismen (1) APC^{Cdc20} verhindert die Aktivierung von der Protease Separase durch Vermittlung der Degradation von Securin. Aktivierte Separase trennt Schwesterchromatiden mit Hilfe von Cohesin Komplexen. (2) APC^{Cdc20} hilft ferner bei der Separase Aktivierung durch die Initiation der Degradation von CyclinB und anderen mitotischen Cyclinen. Cyclin Degradation inaktiviert Cdk1, welches wiederum die Abspaltung der inhibitorischen Phosphatgruppe bewirkt, welches von der Separase durch die Protein Phosphatase (PPases) bewirkt wird. (3) APC^{Cdc20} initiiert des Weiteren die Degradation des Kinesins Xkid auf den Chromosomenarmen. Xkid ist ein Microtubuli plus Ende-gerichteter Motor, der die Chromosomen zu den Spindelpolen zieht. Xkid Degradation, erleichtert daher die Segregation des Chromatids zu den Spindel Polen in der Anaphase.

Peters *et al.* hatten (2002) gezeigt, dass MAD2/BUB1 normalerweise über eine Blockade des APC (*anaphase-promoting-complexes*), des zentralen Koordinators der Chromosomen-Segregation einen vorzeitigen Abbau von Securin verhindern, dieser Faktor trug dadurch wesentlich zur Aufrechterhaltung der Chromosomenstabilität bei (Cortez *et al.*, 2001). Zellen mit defektem Checkpoint, konnten weitere Mitosen durchlaufen und somit chromosomale Aberrationen und weitere sekundäre genetische

Störungen anhäufen. (Dorken *et al.*, 2004). Auch Zahl und Größe der Centromere spielten eine Rolle, beispielsweise korrelierte eine Centromeramplifikation mit Chromosomeninstabilität und aneuploidem Chromosomensatz (Lingle *et al.*, 2002)

Die Beeinträchtigung von Kontrollinstanzen wie BRCA1/2 oder p53, die über die Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden wachen, konnte ebenfalls zur Chromosomeninstabilität führen (Levitt *et al.*, 2002). Upender *et al.* (2004) hatten gezeigt, dass in präneoplastischen Läsionen, sowie in Zellkultur-Systemen in denen die Zellen unterschiedlichen Karzinogenen ausgesetzt werden, solche chromosomalen Aneuploidien als erste Alterationen identifiziert werden konnten.

Der Einsatz von CGH-Analysen (Comparative Genomische Hybridisierung) an Pankreaskarzinomen zeigten häufig wiederkehrende genetische Verluste auf Chromosom 8p, 9p, 17p, 18q, 19p und 21, sowie Gewinne auf 3q, 5p, 7p, 8q, 12p und 20q (Solinas-Toldo *et al.* 1997; Ghadimi *et al.* 1999; Mahlamakiet *al.* 2002)

Die Konservierung von Tumor und Tumor-Grad-spezifischen Mustern der chromosomalen Aneuploidien spielen eine grundlegende Rolle in der Tumorgenese. Möglicherweise besteht durch die Expression eines oder mehrerer Gene eines aneuploiden Chromosoms der notwendige Selektionsvorteil (Upender *et al.* 2004). Es konnte durch das Einbringen eines zusätzlichen Chromosoms in eine immortalisierte Zelllinie gezeigt werden, dass sich die Expression der Gene dieses Chromosoms signifikant erhöhte. Diese Beobachtungen stimmten mit den Ergebnissen von vergleichbaren Analysen an aneuploiden kolorektalen, pankreatischen und renalen Karzinomzelllinien überein, in denen das Transkriptionsniveau mit der Mehrzahl der aneuploiden Chromosomen korrelierte (Phillips *et al.*, 2001).

Die Chromosomeninstabilität (CIN) hat sich als mögliche Ursache für die Karzinogenese weitgehend etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Entstehung von Darmkrebs durch die Mutation eines CIN-Gens und nicht wie bisher angenommen, durch die Mutation eines Tumor-Suppressor-Gens, verursacht wird (Vogelstein *et al.* 1993; Nowak *et al.* 2002). Dieser Meinung stehen die Arbeiten von Duesberg *et al.* (2004, 2005, 2007) und Fabarius *et al.* (2003) kontrovers gegenüber. Diese Autoren favorisieren als initiiertes Ereignis der Tumorgenese immer noch eine chromosomale Instabilität und nicht eine Mutation in einem spezifischen Gen.

4.2.1 Welches Ereignis erfolgt zuerst: LOH oder Basenmutation?

Lüttges *et al.* (2001) präsentierten Ergebnisse einer hochinteressanten Studie mit der Frage, in welcher Reihenfolge es zu einer Inaktivierung beider Allele der Gene *p53* und *DPC4* kommt: Findet ein LOH vor oder nach einer Basenmutation im Verlauf der biallelischen Inaktivierung statt? Die Beantwortung dieser Frage war von fundamentaler Bedeutung für das Verständnis der Karzinogenese multipler Tumoren. Hierzu wurden in

PanINs LOH und simultane immunhistochemische Analysen durchgeführt, mit dem Hintergrund, dass eine positive p53 oder negative DPC4 Immunhistochemie die vollständige Inaktivierung des jeweiligen Gens widerspiegelte (Wilentz *et al.*, 2000b). Als Ergebnis konnte von Lüttges *et al.* (2001) gefunden werden, dass die große Mehrzahl der PanINs einen immunhistochemisch gemessenen Genausfall erst im PanIN-3 Stadium aufwiesen, während es bereits früher, nämlich schon im PanIN-2 Stadium zu einem Auftreten von LOHs in 88% der Läsionen (zumindest in einem der untersuchten Genloci) kam. Hieraus wurde geschlossen, dass ein LOH einer intragenetischen Basenmutation vorausgeht.

Per Definition benötigen Proto-Onkogene nur eine Mutation in einem der beiden Allele zur Umwandlung zum Onkogen. Bei Tumor-Suppressor-Genen müssen beide Allele zum vollständigen Ausfall der Genfunktion inaktiviert werden. Zum Ausfall des *p53* Gens kommt es nach einem LOH des einen Allels und gleichzeitiger Basenmutation auf dem anderen Allel. Dieser Mechanismus trat auch häufig bei der Geninaktivierung von *p16^{INK4}* (20% homozygot deletiert) und *DPC4* (35% homozygot deletiert) auf. Ein weiterer Mechanismus der zur Allel Inbalance führen kann, ist eine Methylierung der Promotorregion der Gene. Die Promotormethylierung konnte in Kombination von intragenetischer Basenmutation oder LOH im *p16^{INK4}* Gen nachgewiesen werden (Duesberg *et al.*, 2000). Nach Wilentz *et al.* (2001) wäre eine alternative Erklärung für die Ergebnisse von Lüttges *et al.* (2001), dass es zu einer Basenmutation in einem bisher unbekanntem Tumor-Suppressor-Gen auf Chromosom 17 oder 18 gekommen war. LOH den zweiten Schritt der Inaktivierung des unbekanntem Tumor-Suppressor-Gens darstellte. Möglicherweise hatte zu diesem Zeitpunkt bereits eine Basenmutation zumindest in einer Subpopulation der betroffenen PanINs vorgelegen. Die Hypothese von Wilentz *et al.* (2001) wurde durch drei Argumente unterstützt:

1. In Familien mit hereditären Krebsyndromen wie z.B. bei *BRCA2*-Keimbahnmutation kam es erst im PanIN-3 Stadium zu einem LOH des Wildtyp Allels (Goggins *et al.*, 2000). Auch bei Patienten mit einer *p53* Keimbahnmutation erfolgte die Inaktivierung des verbleibenden Wildtyp Allels erst im Verlauf der Karzinogenese mittels LOH oder alternativer Mechanismen (Huusko *et al.*, 1998; Hainaut *et al.*, 2000). Der vollständige *p53*-Inaktivierungsmechanismus war komplex, da sporadisch multiple Mutationen zusätzlich zu der Keimbahnmutation im *p53* Gen akkumulieren und ein LOH in einigen entstandenen Tumoren nicht festgestellt werden konnte. Ein möglicher Mechanismus war hier eine Deletion des Wildtyp Allels gefolgt von einer Duplikation des mutierten Keimbahn Allels, sodass die zusätzlichen Mutationen zu einer genetischen Instabilität und somit zur Karzinomentstehung führen konnte. Ein LOH wurde mit molekulargenetischen Techniken nicht gefunden. Es wurde vermutet, dass in diesem Fall die Keimbahnmutation eine so genannte *low penetrance* Mutation war, die zusätzlich verstärkende Mutationen

auf dem Wildtyp Allel oder dem Keimbahnmutations- Allel bedurfte (Varley *et al.*, 1999). Keimbahnmutationen könnten sich im Vergleich zu sporadisch entstandenen Tumoren für den Karzinogeneseprozess möglicherweise unterschiedlich auswirken. Ein Beispiel ist das hereditäre Li Fraumeni Syndrom, bei dem kein erhöhtes Krebsrisiko für Tumoren des oberen aero-digestiven Systems besteht, obwohl sporadische Tumoren aus dieser anatomischen Lokalisation sehr häufig *p53* Mutationen aufwiesen (Hainaut *et al.*, 2000).

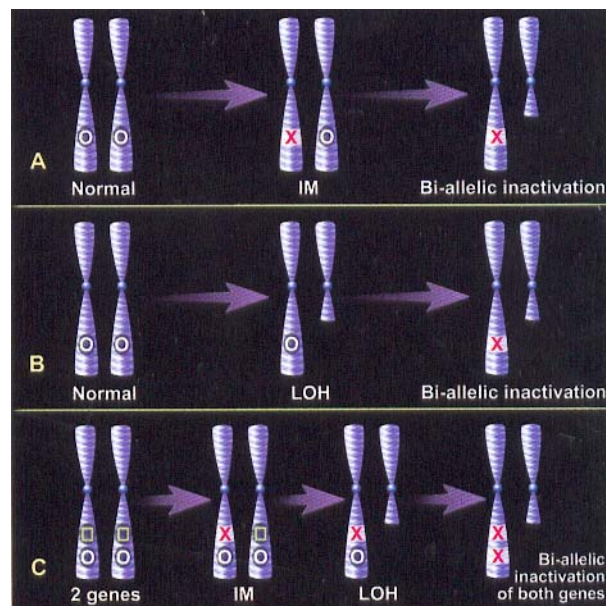


Abb. 58. Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen. Die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen benötigt die Inaktivierung beider Allele. Dies geschieht gewöhnlich durch eine intragenische Mutation (IM) in einem Allel verbunden mit dem Verlust des anderen Allels (LOH). In diesem Diagramm wurden drei verschiedene Szenarien für diesen Vorgang beschrieben. Der Kreis repräsentiert ein bereits charakterisiertes Gen auf einem Allel. Das Viereck repräsentiert ein bisher unentdecktes Gen. Ein X repräsentiert eine IM in einem der beiden Gene. A: IM passiert bevor einem LOH eines einzelnen Gens. B: LOH ist das erste Ereignis. C: IM passiert in einem bisher unentdeckten Gen. (Viereck), welches auf dem gleichen Chromosomenarm liegt wie das untersuchte bekannte Gen. Ein LOH geschieht auf dem gegenüberliegenden Arm und deletiert beide Wild Typ Kopien. Schließlich führt eine IM im bekannten zu untersuchenden Gen (Viereck) zu einer biallelic Inaktivierung (Wilentz *et al.*, 2001)

2. Es gab Hinweise, dass auf den Chromosomen 17p und 18q noch weitere, bisher unbekannte Tumor-Suppressor-Gene existierten. So war die von Lüttges *et al.* (2001) angegebene LOH-Frequenz auf 17p und 18q wesentlich höher als die immunhistochemisch bestimmte Inaktivierungsfrequenz von *p53* und *DPC4* in PanIN-3 Läsionen (jeweils 60% LOH versus 41% IHC auf 17p und 88% LOH versus 41% IHC auf 18q). Die Daten der vorliegenden Arbeit belegten ein ähnliches Verhältnis für *p53* LOH, zusätzlich war eine eingeschränkte Korrelation von LOH und *p53* IHC in PanIN-3 Läsionen gefunden worden, da sowohl *p53* positive IHC bei fehlendem LOH (19% PanIN-3) als auch LOH bei fehlender *p53* IHC (17%) auftraten. Diese Daten sprachen dafür, dass neben *p53* und *DPC4* noch andere Gene auf den Chromosomen deletiert sein könnten, wie z.B. *DCC* auf 18q (Hilgers *et al.*, 2000, Barbera *et al.*, 2000).

3. Theoretische Überlegungen führten zu der Annahme, dass das Auftreten einer Basenmutation vor einem LOH möglicherweise mit einem Selektionsvorteil für die Zelle verbunden war. Gerade für das *p53* Gen wurden in zahlreichen Studien Hinweise darauf gefunden (Hainaut *et al.*, 2000). Für Tumor-Suppressor-Gene (z.B. *p53*) sind drei Wirkmechanismen vorstellbar: a. Dominant onkogen, d.h. das mutierte Allel erwirbt eine neue Funktion und wirkt somit z.B. über eine Promotordysregulierung anderer Gene onkogen. b. Dominant negativ, d.h. das mutierte Allel interferiert mit dem Wildtyp Allel in einer negativen, inhibitorischen Weise, welches ultimativ zum Verlust des Wild Typ Allels über LOH führt. c. Null Mutation, d.h. ein mutiertes Protein hat eine neutrale Wirkung auf das verbleibende Wildtyp Allel sowie den Zellmetabolismus. Ein LOH mit verbleibendem Wild Typ Allel hätte vermutlich zunächst keinen vergleichbaren Selektionsvorteil. Vorausgesetzt der *gene dosage effect* ist bei dem verbliebenen Gen hinsichtlich der zellulären Proliferations- oder DNA-Reparaturkontrolle von untergeordneter Bedeutung.

Die Studie von Lüttges *et al.* (2001) ließ diese Fragen weitgehend unbeantwortet. Die Untersuchung des Funktionszustandes eines Gens mittels IHC gibt keine exakte Antwort über den Mutationszustand beider Allele und lieferte nur indirekte Rückschlüsse auf den vorliegenden Inaktivierungsmechanismus. Gleichzeitig durchgeführte LOH Analysen könnten vor allem hinsichtlich des genauen Zeitpunkts der Inaktivierung des zweiten Allels und des Mutationszustandes keine Rückschlüsse geben.

Die in dieser Studie durchgeführte I-PEP-PCR bietet die Möglichkeit, beide Allele mehrerer Gene einer PanIN bezüglich ihrer Mutationen (LOH oder Basenmutation) auf molekularer Ebene zu analysieren, um so einen exakten Zeitpunkt des Ausfalls der einzelnen Allele zu bestimmen. Hierfür wurde eine LOH-Analyse mittels Mikrosatelliten PCR mit simultaner Sequenzanalyse des *p53* Gens und des *p16^{INK4}* Gens in singulären PanINs durchgeführt. Die molekularen Ergebnisse wurden mit immunhistochemischen Färbeergebnissen korreliert. Die Beantwortung der Frage nach den molekularen Ereignissen im Verlauf der Karzinogenese des duktales Pankreaskarzinoms war von fundamentaler Bedeutung für das Verständnis der Biologie dieses aggressiven Tumors sowie für die generellen Mechanismen der Karzinogenese. Ferner waren diese Erkenntnisse hilfreich für die Entwicklung von Früherkennungsstrategien. Diese Arbeit hatte das Ziel, sich der Beantwortung dieser wichtigen Fragen mit Hilfe o.g. molekularen Analysestrategie anzunähern.

Einer der Studienpatienten mit chronischer Pankreatitis (CP10) wies in den untersuchten Geweben das ungewöhnliche Bild aller Stufen von PanIN-1A bis PanIN-3 auf. Dies hatte die Gelegenheit geboten, das bislang postulierte molekulare Progressionsmodell für das Pankreaskarzinom detailliert für die einzelnen PanIN Grade zu überprüfen und auszuweiten. Dieser Patient konnte somit als Indexpatient für nachfolgende

Untersuchungen zum molekularen und auch zytogenetischen Progressionsmodell des duktales Pankreaskarzinoms dienen.

Dass Patienten mit chronischer Pankreatitis und nachgewiesenen PanIN-3 Läsionen ein stark erhöhtes Risiko einer Progression zu einem invasiven Karzinom besitzen, wurde bisher in der Literatur mehrfach an Hand von Fallberichten dokumentiert (Takaori *et al.*, 1998; 2003; Brat *et al.*, 1998; Brockie *et al.*, 1998). Die dort untersuchten Patienten zeigten PanIN-3 Läsionen in den Pankreasteilresektaten ohne Nachweis eines invasiven Karzinoms. Dieses entwickelte sich allerdings dennoch in einem Zeitraum zwischen 17 bis 29 Monaten nach Pankreasteilresektion. Nur in einigen dieser Gewebe wurden *K-ras* Analysen durchgeführt, weiterführende immunhistochemische oder molekulargenetische Untersuchungen erfolgten nicht. Somit war der in vorliegender Arbeit präsentierte Fall des Studienpatienten CP10, der erste Fall mit ausgedehnten molekulargenetischen und zytogenetischen Analysen einzelner PanIN-Läsionen in Gewebe chronischer Pankreatitis.

Die molekulargenetischen Untersuchungen der PanINs des Studienpatienten CP10 belegten die Präsenz heterozygoter als auch homozygoter Mutationen sowohl im *p16^{INK4}* Gen als auch im *p53* Gen. Heterozygote Mutationen im *p16^{INK4}* Gen wurden nur in einer PanIN (PanIN-2) gefunden, allerdings war die doppelte Anzahl von in der Sequenzanalyse detektierten Mutationen im Vergleich zu LOH in DM, PanIN-1a und PanIN-1B nachgewiesen worden. Mutationen in heterozygoter Form wurden im *p53* Gen bereits in den frühesten PanIN Läsionen als auch in DM gefunden, wohingegen in höhergradigen PanINs die Mutationen zumeist in homozygoter Form vorlagen, begleitet von LOH und Proteinexpressionsverlust in der immunhistochemischen Untersuchung sowie einer Akkumulation von multiplen Mutationen in PanIN-2 und PanIN-3 Läsionen. Dies deutete auf eine klonale Expansion dieser Mutationen im Gangsystem des Pankreasgewebes hin, wobei zunächst in kleinen, peripher im Pankreasgewebe gelegenen Gängen erste zumindest häufig im *p53* Gen heterozygote Mutationen auftraten, welche im Anschluss eine klonale Expansion unter Entwicklung weiterer Mutationen erfahren und in größeren Gängen sowie dem Ductus wirsungianus eine Entwicklung bis zu PanIN-3 Läsionen durchmachten. Die molekulargenetischen Daten dieser Arbeit untermauerten die bereits histologisch gefundene Akkumulation von höhergradigen PanIN-Läsionen bevorzugt im Pankreaskopf (Kozuka *et al.*, 1979). Weiterhin wurden auch detaillierte computergestützte Mappingdaten von Furukawa *et al.* (1994) molekulargenetisch untermauert. Diese Arbeitsgruppe führte dreidimensionale Untersuchungen an 78 Pankreasgängen in 53 Pankreasresektaten durch und zeigte, dass Gangläsionen mit hochgradigen Dysplasien häufig von Gängen mit geringergradigen Dysplasien in zonaler Form umgeben waren, was an eine Progression von geringergradiger Dysplasie zu höhergradiger Dysplasie schließen ließ. Auch in den vorliegenden Untersuchungen am Gewebe des Studienpatienten CP10 fand sich analog zu den Daten von Lüttges *et al.*

(2001), sowie zu den in dieser Arbeit gezeigten Daten im Gewebe von Pankreaskarzinompatienten, ein LOH-Ereignis sowohl im $p16^{INK4}$ Gen als auch im $p53$ Gen bereits vor der immunhistochemisch detektieren vollständigen Geninaktivierung, welche im $p16^{INK4}$ Gen im Stadium PanIN-2 und im $p53$ Gen im Stadium PanIN-3 erfolgte. Während die heterozygoten Mutationen im $p53$ Gen in DM und PanIN-1A ohne Nachweis eines LOH in diesen Läsionen klar für die Hypothese sprach, dass es zuerst zu einer Basenmutation in einem Allel kam gefolgt von einer Geninaktivierung durch LOH des zweiten Allels, war die Situation am $p16^{INK4}$ Genlokus weniger klar. Hier wurden sowohl homozygote Genmutationen als auch LOHs in PanIN-1A, PanIN-1B und DM nachgewiesen, wobei die Sequenzänderungen in der Überzahl waren. Dies lag möglicherweise an der Sensitivität der einzelnen Analysetechniken. Während für die Detektion eines LOH mindestens 50% bis 70% der untersuchten Zellpopulation ein Allelverlust aufweisen mußten, sind in der Sequenzanalyse Mutationen ab einem mutierten Zellanteil von 10% der Zellpopulation detektierbar, wobei heterozygote und homozygote Mutationen dokumentiert wurden. Allerdings detektierte die Sequenzanalyse nicht den LOH eines der beiden Allele im Falle einer fehlenden Genmutation auf beiden Allelen. Somit überschritten sich beide Analysetechniken, supplementierten einander jedoch nicht vollständig. Es war nicht ausgeschlossen, dass im Falle der detektierten heterozygoten Mutationen im $p53$ Gen bereits in einem Teil der Zellen (z.B. weniger als 50%) ein LOH vorgelegen hat, welches durch die parallel durchgeführte Mikrosatellitenanalyse jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Dass heterogene Zellpopulationen in einzelnen PanINs vorlagen zeigte die immunhistochemische Expressionsanalyse der Gene $p53$ und $p16^{INK4}$ in dieser Arbeit. Allerdings hätte in den PanIN-1A, PanIN-1B und DM einen Proteinausfall in zumindest einem Teil der Gangepithelien detektieren werden müssen bei biallelischer Inaktivierung der Gene in der entsprechenden Zellpopulation, dies war aber nicht der Fall.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit eine Frage, welche sich aus der Arbeit von Lüttges *et al.* (2001) ergab, beantwortet werden: Basenmutationen konnten bereits in den frühesten Gangläsionen nachgewiesen werden und wurden klonal expandiert, zusammen oder häufig gefolgt von LOH mit nachfolgender Geninaktivierung. Weiterhin sprachen die vorliegenden Untersuchungen für das gleichzeitige Auftreten von Deletionen möglicherweise bislang nicht bekannter oder in dieser Arbeit nicht untersuchter Genen, was durch die Tatsache untermauert wurde, dass in der vorliegenden Arbeit auch z.B. drei LOH-Ereignisse in PanIN-2 Läsionen ohne Nachweis einer Basenmutation im $p16^{INK4}$ Gen gefunden wurden. Dies sprach für die Existenz des von Wilentz *et al.* (2001) postulierten oben ausgeführten Inaktivierungsmechanismus eines Tumor-Suppressor-Gens im Sinne der Abbildung 53, welcher vermutlich zusammen mit der hiervon unabhängig ablaufenden Basenmutation bei gleichzeitig erhaltenem Wild Typ Allel existiert. Dies würde erklären, warum die endgültige, mittels Immunhistochemie

bestimmte, Inaktivierung der Gene erst zu einem späteren Zeitpunkt im Verlauf der Karzinogenese erfolgt.

Ein weiteres auffälliges Resultat der molekulargenetischen Analysen in dieser Studie war die Anzahl der gefunden Mutationen. Während im *p53* Gen nur eine Mutation gefunden wurde, konnten im *p16^{INK4}* Gen fünf Sequenzänderungen nachgewiesen werden. Von diesen fünf Sequenzänderungen wurde ein klonales Spektrum in 2 Sequenzänderungen gefunden, beide in einem Exon an unterschiedlicher Position. Die anderen 3 Mutationen traten jeweils nur einmal auf, davon einmal in einem Exon und zweimal im Intron. Vermutlich hatte die Insertion TG im Exon 2 zur *p16^{INK4}* Geninaktivierung geführt, da nur diese Mutation in PanIN-3 Läsionen nachzuweisen war. Hierdurch ergaben sich mehrere Rückschlüsse:

1) Die Existenz multipler Mutationen mit einer klonalen Ausbreitung von nur wenigen Mutationen ließ an eine polytope mutagene Schädigung des Pankreasgewebes im Sinne eines Feldeffekts denken. Dieser war nicht auf das Pankreas beschränkt, sondern wurde bereits in anderen Organen wie z.B. im Respirationstrakt (Lydiatt *et al.*, 1998; vanRees *et al.*, 2000) und in der Prostata (Macintosh *et al.*, 1998) im Rahmen des Karzinogeneseprozess beschrieben. Die Daten dieser Arbeit bestätigten die bereits von anderen Arbeiten dokumentierte genetische Heterogenität in PanINs. So haben DiGiuseppe *et al.* (1994) zwei verschiedene K-ras Punktmutationen im Gewebe eines prophylaktisch entfernten Pankreas ohne Tumor gefunden. Moskaluk *et al.* (1997a) zeigten in einem Pankreasteilresektat eines Patienten zwei verschiedene *p16^{INK4}* Mutationen in unterschiedlichen Gängen. Die diffuse und variable Verteilung der Genmutationen in dieser Arbeit und in den Arbeiten anderer Autoren ließ einen mutagenen Feldeffekt vermuten, in welchem endogene (z.B. Pankreasenzyme, oxidativer Stress) und/oder exogene (z.B. Nikotin, Alkohol) Noxen auf verschiedene Gänge während einer langen Zeit einwirkten. Eine weitere Unterstützung dieser Hypothese erfolgte aus dem Spektrum der in dieser Arbeit und in anderen Arbeiten gefundenen Mutationen im Pankreasgewebe, insbesondere G>A Transitionen. Diese Mutationen traten besonders häufig unter dem Einfluss von Nitrosaminen oder alkylierenden Agenzien auf. Personen mit Defekten in der Reparatur von DNA-Alkylierungsprodukten besaßen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms (Li 2001; Li *et al.*, 2002).

2) Alterationen im *p16^{INK4}* Gen als auch im *p53* Gen ließen sich bereits in den ersten histomorphologisch fassbaren Gangveränderungen nachweisen, wobei dem *p16^{INK4}* Gen eine treibende Kraft im weiteren Prozess der Karzinogenese zugeschrieben werden konnte. *p53* Mutationen wurden erst zu einem späteren Zeitpunkt für die klonale Expansion einzelner Zellklone relevant, worauf die erst spätere biallelische Inaktivierung schließen ließ. Eine ähnliche Funktion schien dem *DPC4* Gen zuzukommen, die

Inaktivierung erfolgte hier erst spät im Karzinogeneseprozess im Stadium eines Carcinoma *in situ* (PanIN-3).

Wie ließen sich nun die immer wieder in der Literatur beschriebenen und auch in dieser Arbeit gefundenen *p53* Mutationen (LOH oder Basenmutation) in Geweben normaler Morphologie oder in sehr frühen präneoplastischen Läsionen verschiedener Gewebe in ihrer biologischen Konsequenz einordnen? *p53* reguliert die Aufrechterhaltung der Homöostase der Zelle, weshalb es im Rahmen der Evolution maligner Tumoren in den meisten Tumoren via Selektion zu einer Inaktivierung dieses Gens kam (Hainaut *et al.*, 2000). Häufig erfolgte die Inaktivierung von *p53* erst kurz vor der Transition vom präinvasiven zum invasiven Tumorwachstum. Nach Evan und Vousden (2001) könnte ein zu früher Verlust des *p53* Gens in den initialen Phasen der Tumorgenese einen gravierenden Selektionsnachteil für die betroffene Zelle zur Folge haben. Diese Hypothese wurde durch Untersuchungen in Mausmodellen mit inaktiviertem *p53* Gen (*p53*-Null Mäuse) untermauert, da diese Tiere weniger empfindlich gegenüber der Entwicklung von Karzinogen-induzierten Papillomen waren (Wang *et al.*, 2000). Ferner belegten *in vivo* Daten, dass eine Inaktivierung von *p53* nicht zu der Entstehung einer Aneuploidie führte, weder in Tumorzellen noch Zellen normaler Morphologie (Bunz *et al.*, 2002). Erst zum Zeitpunkt der fortgeschrittenen Erosion der Telomere nach multiplen Zellteilungen, welches ein potentes Signal zur Initiierung des u.a. durch *p53* induzierten Apoptoseprozesses darstellte, wurde eine Inaktivierung des *p53* Gens notwendig. Somit wäre die Existenz von *p53* Mutationen in Geweben normaler Morphologie, welche hier über Jahrzehnte im Sinne eines Mutation Load akkumulierten, für die einzelne Zelle bezüglich einer neoplastischen Transformation nicht von großem Risiko. Dieses Szenario würde sich allerdings in dem Moment ändern, wenn weitere Mutationen in dieser Zelle auftreten oder es zu Aneuploidien käm, ohne dass es zur *p53*-induzierten Apoptose kommt. Statistisch würde in dieser Zelle im Verlauf weiterer Zellteilungen, welche z.B. durch eine Mutation im *p16^{INK4}* Gen bei gleichzeitigem exogenen Regenerierungsstimulus auf dem Boden einer chronischen Entzündung erleichtert würden, nur noch ein zweite Mutation im verbleibenden Allel des *p53* Gens zur vollständigen Inaktivierung genügen. Damit würde ein hoher individueller *mutation load* mit einem erhöhten Risiko einhergehen, ein oder mehrere Malignome zu entwickeln. Die Daten aus dieser Arbeit unterstützten diese Hypothesen, da Mutationen im *p53* Gen bereits in frühesten PanIN und DM Läsionen detektiert wurden, es aber erst im späteren Verlauf der Karzinogenese zu einer vollständigen Inaktivierung des *p53* Gens kam.

4.2.2 Analysen chromosomaler Alterationen in PanINs in Geweben chronischer Pankreatitis

Welches Ereignis die Tumorgenese initiiert ist umstritten. Erfolgt die Initiation der Karzinogenese durch die Entstehung einer Aneuploidie, sind Mutationen in einzelnen hypermutablen Genen für die Krebsinitiierung mit später eintretender Aneuploidie verantwortlich oder liegt der Karzinogenese das simultane Ereignis einer Aneuploidie mit gleichzeitigem Verlust von relevanten *gatekeeper* Genen (z.B. der Zellzykluskontrolle) oder *caretaker* Genen (z.B. DNA-Reparatur) zugrunde (z.B. Duisberg *et al.*, 2004; Feldser *et al.*, 2003; Bielas und Loeb 2005; Breivik 2005; Teixeira und Heim, 2005; Michor *et al.*, 2005)? Als Ursache wurden neben DNA-Schädigung durch oxidativen Stress auch extreme Telomerverkürzungen in Betracht gezogen.

Das duktales Pankreaskarzinom zeichnete sich durch eine hohe Aneuploidierate als Ausdruck genetischer Instabilität aus. Gleichzeitig bestand eine hohe intratumorale Heterogenität sowohl auf zytogenetischem als auch auf dem Level einzelner Genmutationen (Ghadimi *et al.*, 1999a; Gorunova *et al.*, 1995; 1998; Heinmöller *et al.*, 2000). Die Entstehung dieser genomischen Instabilität wurde wahrscheinlich durch eine Störung der Telomerfunktion mit verursacht, welche über eine Telomerase Funktionsstörung zu chromosomalen Rearrangements durch ungeordnete Chromosomenbruch-Chromosomenfusionen führte. Die Telomerreduktion war die früheste nachweisbare genetische Anomalie. D.h. wiederkehrende Zyklen von Entzündung und Regeneration in den Epithelien führten zur Verkürzung der Telomere und trugen dadurch zum Entstehen der CIN bei. Dieser Zusammenhang von abnehmender Telomerlänge und der Akkumulation von chromosomalen Anomalien wurde an Pankreaskarzinomen eindeutig gezeigt (Gisselson *et al.* 2000 und 2001)

Diese Vorgänge wurden durch einen bestehenden p53 Funktionsverlust verstärkt (Maser *et al.*, 2002, Artandi *et al.*, 2000). Untersuchungen der Telomerlängen von PanINs von Präneoplasien des Pankreas zeigten bereits in 91 % der PanIN-1A Läsionen kritisch verkürzte Telomere. Normale Epithelzellen aus gesundem Gewebe zeigte dagegen keine Telomerverkürzungen (Moskovitz *et al.* 2003; van Heek *et al.* 2002).

Mutationen in Genen, welche den Mitose Spindelapparat überwachen (BUB1) oder in der DNA-Strangreparatur und Zell-Zyklus-Kontrolle involviert waren (BRAC1, BRACA2), könnten als Auslöser für die Entstehung einer Aneuploidie in Betracht kommen (Ghadimi *et al.*, 2000). Die Proteine koordinieren die geordnete Chromosomensegregation bei der Mitose. Bisher konnten solche Mutationen nur in einer sehr kleinen Anzahl von Karzinomen gezeigt werden (Venkitaraman 2002; Cahill *et al.*, 1998; Hempen *et al.*, 2003; Grigorova *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit bot sich an Hand des Gewebes des Studienpatienten CP10 die Gelegenheit an, molekulargenetische und zytogenetische Untersuchungen mittels

Interphase-FISH parallel über das gesamte Spektrum der vorhandenen PanIN-1A bis PanIN-3 Läsionen sowie der DM Läsionen in Gewebe chronischer Pankreatitis durchzuführen. Hierbei wurden zur Messung einer Aneuploidie drei Centromersonden (CEP 7, 8, 17) ausgewählt. Diese Chromosomen waren in duktalem Pankreaskarzinomen häufig in aneuploidem Status zu finden (Gorunova *et al.*, 1995; 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde nur eine verhältnismäßig geringe Anzahl von PanINs und DM zytogenetisch hinsichtlich des Vorliegens einer Aneuploidie untersucht. Die dabei gewonnenen Ergebnisse bildeten die Grundlage für die weitergehenden Untersuchungen. In der Literatur existieren Einzelberichte hinsichtlich des Vorliegens einer Aneuploidie in Geweben chronischer Pankreatitis. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten zeigten darüber hinaus neue wichtige Aspekte. In Gängen normaler Morphologie in dieser Studie konnten nur maximal 8% aneuploide Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war in sämtlichen DM und PanINs eine erhöhte Anzahl aneuploider Zellen in allen drei untersuchten chromosomalen Regionen zu finden. Ferner wurde ein gradueller Anstieg der Aneuploidierate bei einem gleichzeitigen Anstieg des PanIN Grades diagnostiziert. Moskovitz *et al.* (2003) hatten in Gängen normal erscheinender Morphologie bei Patienten mit chronischer Pankreatitis eine Aneuploidierate zwischen 7% (Monosomie Chromosom 18) und 39% (mehr als 2 Centromersignale Chromosom 11) der untersuchten Zellen gefunden. Diese Daten unterschieden sich von den in dieser Studie präsentierten Daten darin, dass diese Arbeit in Gängen normaler Morphologie keine wesentliche Aneuploidie nachwies und erst mit zunehmendem Dysplasiegrad eine steigende Aneuploidierate detektiert wurde. Ein wesentlicher Unterschied bestand darin, dass Moskovitz *et al.* (2003), im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, keine histologische Kontrolle in dem untersuchten Material durchgeführt hatten und die FISH-Analysen erst nach kurzzeitiger Zellkultur der untersuchten Gewebe erfolgten. In beiden Arbeiten wurden teilweise unterschiedliche Centromere untersucht, was möglicherweise zu der gesehenen Diskrepanz beitrug. In einer Studie von Soldini *et al.* (2003) wurde in der Analyse einer nicht näher angegebenen Anzahl von PanIN-1 Läsionen in FFPE-Geweben von elf Patienten mit chronischer Pankreatitis in den untersuchten Chromosomen 6, 17 und 18 eine Monosomie in 0% für Chromosom 18, in 27% für Chromosom 17 und 36% für Chromosom 6 gefunden. Angaben über Polysomien wurden nicht gemacht. Diese Ergebnisse ließen sich mit den hier vorliegenden Daten nur sehr eingeschränkt vergleichen, da in der vorliegenden Studie zum Teil andere Chromosomen untersucht wurden. Ferner wurde in der vorliegenden Arbeit das Gewebe von nur einem Patienten untersucht. Ein sehr wichtiges gemeinsames Ergebnis aller drei Studien aber war, dass aneuploide Zellpopulationen in Geweben chronischer Pankreatitis bereits in Gängen normaler Morphologie gefunden wurden, zum Teil in deutlich erhöhter Anzahl. In den oben genannten Arbeiten wurde als Ursache die Schädigung des Genoms durch oxidative Einflüsse zusammen mit einer erhöhten Fehlerrate der exakten chromosomalen

Weitergabe auf die Tochterzellen diskutiert. Der Grund einer hohen Zellteilungsrate ließ sich aus dem chronisch entzündlichen mit Epitheldestruktion einhergehenden Prozess bei chronischer Pankreatitis herleiten. Auch diese Daten reihten sich in das postulierte Konzept eines erhöhten Risikos für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms bei lange bestehender chronischer Pankreatitis ein.

Ein Vergleich der molekulargenetischen mit den zytogenetischen Daten zeigte keine Korrelation zwischen dem Auftreten einer Aneuploidie und einer (heterozygoten) Mutation im *p16^{INK4}* Gen und *p53* Gen. Beide Ereignisse traten unabhängig voneinander auf. So wurde z.B. keine verstärkte Aneuploidie in Gängen mit einer Mutation im Vergleich zu Gängen ohne Mutation nachgewiesen, d.h. die hier vorliegenden Daten erlaubten keine eindeutige Aussage ob die Aneuploidie der Genmutation vorausgeht. Sowohl Aneuploidie als auch Genmutation konnten in der vorliegenden Arbeit im Pankreasgewebe des Studienpatienten CP10 in den frühesten histomorphologisch fassbaren Läsionen nachgewiesen werden. Auf der Grundlage der geringen Anzahl an untersuchten Patienten konnte keine eindeutige Aussage gemacht werden, ob es im Verlauf der Karzinogenese beim Pankreaskarzinom gleichzeitig zum Auftreten einer Aneuploidie und einer Genmutation kommt. Nach Duesberg *et al.* (2005) war das alleinige Ereignis einer Aneuploidie ausreichend um den Karzinogeneseprozess zu initiieren. Dies war auch z.B. bei der Entstehung der akuten lymphoblastischen Leukämie der Fall, wo es vermutlich bereits *in utero* zu einer Aneuploidie einer Zelle mit nachfolgender klonaler Expansion kommt (Teixeira *et al.*, 2005). Die Wahrscheinlichkeit einer Initiierung des Karzinogeneseprozess durch eine Basenmutation war in diesem Fall allein auf Grund des kurzen Krankheits-Verlaufs des Patienten CP10 nicht sehr wahrscheinlich. Der Karzinogeneseprozess ließ sich auf die Entstehung maligner Tumoren im Erwachsenenalter nicht einfach übertragen (Breivik 2005). Eine Aneuploidie zieht als physiologische Reaktion der Zelle die Einleitung der DNA Reparatur oder der Apoptose nach sich. Tolerierbar wird eine Aneuploidie für die betroffene Zelle erst dann, wenn gleichzeitig relevante *gatekeeper* oder *caretaker* Gene durch den Aneuploidieprozess eliminiert werden, so dass die Apoptose oder Reparatur unterbleibt oder die Zelle einen selektiven Vorteil hat. Eine Aneuploidie zusammen mit einer bereits vorliegenden heterozygoten Genmutation würde zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine klonale Expansion dieser Zelle führen (Michor *et al.*, 2004). Die Initiierung des Karzinogeneseprozess ist ein komplexes Muster an Ereignissen und die Frage, welches der Ereignisse, nämlich Mutation oder Aneuploidie, zuerst auftritt, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Auf Grund der Existenz verschiedener hereditärer Krebsdispositionserkrankungen konnte jedoch sicher gesagt werden, dass das Vorliegen einer Mutation in einem einzigen Krebsprädispositionsgen eine manifeste Krebserkrankung mit unterschiedlich hoher Wahrscheinlichkeit entstehen lassen kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungstechniken erlaubten die Analyse sehr

kleiner Zellpopulationen (unter 50 Zellen). Trotzdem waren die bisher am Pankreasgewebe eingesetzten Methoden nicht präzise genug, um die allerersten Ereignisse im Karzinogeneseprozess molekulargenetisch und/oder zytogenetisch zu erfassen. Für die Analyse stand nur FFPE-Gewebe für histologisch genau kontrollierbare molekulargenetische Studien zur Verfügung. Da jedoch sowohl Aneuploidie als auch Genmutationen in den frühesten Läsionen im Pankreas bei chronischer Pankreatitis vorhanden waren, war von zeitlich sehr eng beieinander liegenden, möglicherweise gleichzeitigen Ereignissen einer Aneuploidie und Genmutation auszugehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen bislang keinen echten klinisch anwendbaren Biomarker für ein gesteigertes Risiko für das Pankreaskarzinom erkennen. Dies ist unter anderem darin begründet, dass Mutationen in resezierten Pankreasgeweben untersucht wurden. Die gegenwärtige Limitierung des PanIN Systems für die Anwendung in der klinischen Früherkennung des Pankreaskarzinoms lag darin, dass zur Beurteilung die Gewinnung einer Gewebeprobe zur histologischen Untersuchung erforderlich war. Diese Technik schied auf Grund der Unzugänglichkeit des Organs und des Komplikationsrisikos einer Gewebebiopsie aus.

Bereits in den frühesten histomorphologisch erkennbaren Gangveränderungen konnten aneuploide Zellpopulationen mittels FISH nachgewiesen werden. Der wesentliche Vorteil dieser Untersuchungstechnik bestand darin, in einzelnen Zellen ohne Kenntnis der Histologie zytogenetische Veränderungen in Form einer Aneuploidie zu diagnostizieren. Pankreasbiopsien lieferten nur wenig Zellmaterial für eine Analyse und konnten zusätzlich, besonders im Rahmen der Risikobestimmung nur verhältnismäßig ungezielt durchgeführt werden. Die Wahrscheinlichkeit eine PanIN-Läsion dabei zu treffen war sehr gering. Zytologische Präparate aus ERCP-Material ließen gezielt Untersuchungen möglicherweise veränderter Zellpopulationen aus den größeren Pankreasgängen zu. Dieser Ansatz war für ein Screening von Risikopatienten sehr viel versprechend, da gerade in den größeren Pankreasgängen potentiell zytologisch alterierte Zellpopulationen aus höhergradigen PanIN-Läsionen nachgewiesen werden konnten. Zur Umsetzung in den klinischen Alltag waren jedoch noch weitere zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen am Gewebe von zahlreichen Patienten mit chronischer Pankreatitis erforderlich. Patientengewebe mit chronischer Pankreatitis und Vorliegen von PanIN-3-Läsionen ohne Präsenz eines invasiven Karzinoms gelten als Raritäten und waren in der Literatur nur als Einzelberichte zu finden. Die intensive molekulargenetische Analyse solcher Patientengewebe war somit von großer Bedeutung für die Aufklärung des Karzinogeneseprozess beim duktalem Pankreaskarzinom. Somit kam dem hier untersuchten Studienpatient CP10 die außerordentliche Funktion eines Indexpatienten zu, um als Maßstab für alle weiteren zu untersuchenden Patientengewebe zu dienen.

Aus der Literatur und den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten könnte ein in Zukunft weiter zu ergänzendes Progressionsmodell für die Entstehung des Pankreaskarzinoms abgeleitet werden. Hierbei lag der Beitrag dieser Arbeit in der Analyse der Inzidenz und zeitlichen Abfolge von Mutationen, der so genannten Signaturmutationen beim Pankreaskarzinom in PanINs und DM. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Charakterisierung der zeitlichen Abfolge der Mutationsereignisse im Karzinogeneseprozess. Darüber hinaus lieferte diese Arbeit einen Beitrag zur Generierung erster Daten zum Auftreten einer Aneuploidie in PanINs und DM in Geweben chronischer Pankreatitis, welche als eine prädisponierende Erkrankung für die Entstehung eines duktales Pankreaskarzinoms gilt.

Die in dieser Studie gezeigten Daten boten die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Entwicklung eines Früherkennungstests mit dem ultimativen Ziel, Patienten mit erhöhtem Risiko für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms zu definieren und die Entstehung dieses zu den malignen Tumoren zählenden neoplastischen Gewebeveränderungen frühzeitig zu diagnostizieren und damit das Leben der betreffenden Personen zu retten.

4.3 Gen-Expressionsanalysen mittels Mikroarray-Technik von Kolonkarzinomgewebe und Hyperplasie- und Karzinomgewebe der Prostata

4.3.1 RNA Qualität und Quantität von Formalin fixierten Paraffin Gewebeproben

Histologische Untersuchungen an eingebetteten Zell- und Gewebeproben gehören zu den grundlegenden Analysen in der medizinischen Diagnostik. In der Regel wurde das Probenmaterial hierfür zunächst mit Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Molekularbiologische Diagnostik und pathologische Untersuchungen erfolgten aus demselben Probenmaterial. In der klinischen Pathologie gewinnt der Bereich der Molekularpathologie zunehmend an Bedeutung. Dieses Teilgebiet baut größtenteils auf molekularbiologische Techniken auf und beschäftigt sich unter anderem mit der genotypischen Charakterisierung verschiedener Krankheiten wie Krebs oder Infektionserkrankungen. Der Ausgangspunkt für alle Analysen war die Aufarbeitung des Probenmaterials. Pathologische Institute überall auf der Welt bergen eine große Zahl an fixierten Gewebematerialien, die für solche Untersuchungen in Frage kämen. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob auch Expressionsanalysen auf RNA Ebene an Formalin fixiertem Gewebe möglich wäre. Die Analyse ergab, dass Gewebeproben, die nicht unter sterilen Bedingungen fixiert und weiter verarbeitet wurden keine gute RNA Qualität lieferten. Dabei spielte auch die Färbe- und Isolierungsmethode eine entscheidende Rolle. So zeigten steril fixierte, mit Tuloidin gefärbte und mittels Roche High-pure-RNA-preparation-kit isolierte Gewebeproben die

besten Ergebnisse. Allerdings eignete sich die Färbemethode nicht für die pathologische Diagnostik. Da HE gefärbte Präparate ausreichend gute Ergebnisse lieferten, ist dieser Färbemethode weiterhin der Vorzug zu geben. Ferner ist gezeigt worden, dass Proben die älter als drei Jahre waren weder quantitativ noch qualitativ gute RNA Ergebnisse lieferten. Es ist bekannt, dass nach Formalin Fixierung, häufig dreidimensionale Proteinkomplexe und DNA- und RNA Sequenzen irreversibel zerstört werden. Durch diese Art der Fixierung reduzierte sich die Empfindlichkeit vieler Analyse-Methoden. Eine neue Methode, die HOPE (*Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect*) Fixierung von DCS Innovative Diagnostik-Systeme ist ein neues patentiertes Verfahren zur Asevirung von Gewebeproben. Bei diesem Verfahren wurden Gewebestücke in einer speziellen Lösung inkubiert, anschließend mit Aceton entwässert und in Paraffin eingebettet. Diese Gewebprozessierung benötigt weder Alkohole noch organische Lösemittel oder Aldehyde (Formalin, Glutaraldehyd). Im Gegensatz zur herkömmlichen Fixierung in Formalin, bleiben bei dieser Methode die Morphologie und auch die Strukturen von DNA und RNA besser oder sogar unverändert erhalten. RNA- und DNA-*in-situ*-Hybridisierung und Northern Blots wurden für dieses Verfahren methodisch vereinfacht und im Ergebnis verbessert. Aus dem Gewebe ließen sich deutlich größere RNA-Moleküle isolieren als aus mit Formaldehyd fixiertem Material oder aus Präparaten, die mit alternativen Formalin-freien, meist auf Alkoholen basierenden Lösungen fixiert wurden. Auch von längerfristig archiviertem Hope-fixierten Material ließen sich entsprechende Analysen reproduzierbar durchführen.

Dieses Verfahren bot aber auch eine Reihe von Nachteilen. Da im Gegensatz zu anderen Fixierungstechniken beim HOPE-Verfahren Strukturproteine, Enzyme und Nukleinsäuren weitgehend in ihrem nativen Zustand erhalten bleiben, musste davon ausgegangen werden, dass HOPE-fixiertes Gewebe auch aktive Viren, Prionen, Mikroorganismen etc. enthalten konnte. HOPE-fixierte Gewebelöckchen, Paraffinschnitte usw. müssten folglich als potenziell infektiös eingestuft werden. Ferner müssten HOPE fixierte Gewebeproben bei 4°C gelagert werden.

4.3.2 Expressionsanalysen von Kolonkarzinom-Gewebeproben

Das Kolonkarzinom gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen in den westlichen Industrienationen. Die Zahl der Erkrankungen nimmt stetig zu. Darmkrebs macht insgesamt 12 - 15 Prozent aller Krebserkrankungen aus. Jedes Jahr werden pro 1000.000 Einwohner 20 - 24 Neuerkrankungen registriert.

Um Prognosemarker für die Diagnostik und Therapie zu bestimmen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit, Genexpressionsprofile von Tumorproben untersucht. DNA Mikroarrays erlaubten die simultane Analyse der Expression tausender Gene und lieferten

ein fast vollständiges Expressionsprofil der untersuchten Probe. Dieses Verfahren war dafür geeignet, die komplexen genetischen Veränderungen maligner Tumorzellen auf der Ebene der Expression zu charakterisieren.

Ein weiterer Schwerpunkt ist die Identifikation von *targets*, welche eine Rolle bei der Tumorentstehung und der Metastasierung spielen und sich als mögliche Angriffspunkte für die Therapie eignen.

Das Ziel war den Aufbau der Infrastruktur zur Gewinnung und pathologischen Beurteilung des klinischen Materials zu standardisieren und anschließend die Methodik für die Mikroarrays zu etablieren. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse sowohl innerhalb der durchgeführten Studie als auch zwischen einzelnen Kliniken wurden SOPs (*standard operating procedures*) für die RNA Präparation nach histologischer Kontrolle der Gewebe, die Mikrodissektion und die Hybridisierung sowie die Analyse der Arrays angefertigt.

Expressionsanalysen von Kolon-Tumor- und Kontroll-Gewebeproben aus Epithelien normaler Morphologie wurden für elf verschiedene Patienten durchgeführt. Das zu untersuchende Gewebematerial wurde direkt nach Entnahme in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend bei -80°C gelagert. In diesem Zustand war die RNA für lange Zeit stabil. Die Zeit zwischen Entnahme des Gewebes im OP, bis zur Überführung in flüssigen Stickstoff, war für die Stabilität der untersuchten Proben von besonderer Bedeutung und für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse essentiell. Kleine Unterschiede könnten zu einer Degradation der RNA führen und die Analyse der Daten erschweren. Die Güte und Quantität der RNA war ebenfalls abhängig von der Beschaffenheit des Präparates selbst; der Größe, der Solidität und vom Fettgehalt der Probe. Die Ergebnisse der vorgelegten Untersuchung zeigten keine Schwankung der ermittelten Messwerte, die auf einen wesentlichen Einfluss des Lagerzeitraums der Probe bei -80°C schließen ließen.

Weitere, die Stabilität von Nukleinsäuren beeinflussende Faktoren entstanden beim Schneiden, Färben und der Lasermikrodissektion. Um eine mögliche Degradation der RNA zu verhindern, wurden sämtliche Arbeitsabläufe zügig durchgeführt, RNA stabilisierende Zusätze verwendet und die Proben entweder getrocknet (nach dem Färben) bzw. in flüssigem Stickstoff aufbewahrt (nach Lasermikrodissektion). Die Dissektionsmethode erlaubte die Isolierung sehr reiner Zellpopulationen. Als Nachteil dieser Methode sei zu erwähnen, dass eine Hitze Entwicklung, welche durch den Laser erzeugt wird, der RNA schaden konnte. Des Weiteren war die Isolieren von 6000 Zellen, die als Minimum für die weiterführenden Untersuchungen ermittelt wurde, ein langwieriger Prozess. Beide Faktoren können eine verstärkte Degradation der RNA zur Folge haben. Anhand zahlreicher Testreihen erfolgte die Festlegung einer Zeitspanne von drei Minuten, nach der das Auffanggefäß mit den bis dahin isolierten Zellen wieder in flüssigem Stickstoff überführt werden musste. Die nach der Etablierung der SOPs gewonnenen Ergebnisse

zeigten deutliche molekulargenetische Unterschiede von morphologisch normalem Gewebe im Vergleich zum Tumorgewebe.

4.3.3 Microarray Untersuchungen von Kolonkarzinom Gewebeproben

Die durch DNA Mikroarray identifizierten differentiell exprimierten Gene wurde mittels Gen Ontologie klassifiziert. Einige der am stärksten induzierten Gene, in den hier untersuchten Kolonkarzinomen gehörten zu der Genfamilie der MCM-Gene (*Mini-Chromosome-Maintenance*). Die MCM-Proteine nahmen bei der Initiation der DNA-Replikation und somit auch in der Kontrolle des Zellzyklus eine Schlüsselposition ein.

Die Initiation der DNA-Replikation ist in Eukaryonten ein hochkonservierter Prozess. In der G1-Phase bindet der *origin recognition complex* (ORC), der aus sechs Proteinen (ORC1-6) besteht, an Replikationsstartpunkte chromosomaler DNA und stellt das Startsignal für die Anlagerung des präreplikativen Komplexes (pre-RC) in der späten G1-Phase dar. Der pre-RC entsteht durch Anlagerung von CDC6 und eines oder mehrerer Moleküle der MCM-Proteine zwei bis sieben. Die MCM-Proteine bilden ein Hexamer, das Helikase-Eigenschaften besitzt und bei fortschreitender DNA-Synthese mit der Replikationsgabel wandert. Die im pre-RC-Komplex enthaltenden MCM-Proteine wurden im Laufe der S-Phase phosphoryliert und anschließend aus dem Chromatin entfernt. Erst in der späten G1-Phase des folgenden Zellzyklus kommt es erneut zu einer Dephosphorylierung der MCM-Proteine, die die erneute Bildung des pre-RC gestatten, und damit eine neue Replikationsrunde starten (Henning, 2002)

Neuere Studien (Tachibana *et al.*, 2005; Johnsen *et al.*, 2003; Semple *et al.*, 2004) hatten gezeigt, dass eine differentielle Expression der MCM-Proteine charakteristisch für die Karzinogenese war und dass sich MCM-Proteine durchaus als Biomarker für die Krebsdiagnostik eigneten (Williams *et al.*, 2004)

Ein weiteres in dieser Arbeit als differenziert exprimiertes Gen, welches ebenfalls eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielt war *MYC*. Dieses Gen spielt im Zusammenhang mit dem *APC* Gen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Kolonkarzinomen. *APC* steht für Adenomatöse Polyposis Coli. Mitglieder von Familien mit dieser erblichen Erkrankung entwickeln hunderte Kolonpolypen, von denen einzelne nach Jahren schließlich in Malignität münden. Das Genotyp/Phänotyp-Muster ist eine Parallele zu erblichem Retinoblastom und Li-Fraumeni-Syndrom: betroffene Patienten erben ein defektes *APC* Allel. *APC* spielt jedoch nicht nur bei dieser relativ seltenen genetischen Erkrankung eine Rolle: in etwa 60% aller Fälle von Kolonkarzinom ist die *APC*-Funktion durch Mutation verloren gegangen. Der Ausfall von *APC* fördert die Entstehung einer malignen Neoplasie durch verschiedene Mechanismen, die auf mehrere getrennte biologische Funktionen des

Moleküls zurückzuführen sind. In seiner ersten Funktion wirkt APC antagonistisch auf das Molekül β -Catenin in einem Signaltransduktionsweg, der wesentlich für die Aufrechterhaltung der Population der Kolonepithelzellen ist und durch den Wachstumsfaktor Wnt aktiviert wird. β -Catenin "kettet" das Adhäsionsmolekül E-Cadherin, das Zell-Zellkontakte vermittelt, an das Zytoskelett. Überschüssiges β -Catenin, das für diese mechanische Aufgabe nicht gebraucht wird, wird in Abwesenheit von Wnt durch eine an APC gebundene Kinase (Glykogen Synthase Kinase 3- β ; GSK-3 β) phosphoryliert und damit zum Abbau über den Ubiquitin-Proteasomweg markiert. Bindet Wnt an seinen Rezeptor, führt das zur Inaktivierung des APC-Proteinkomplexes, und das überschüssige β -Catenin akkumuliert, wechselt in den Zellkern und entfernt dort einen Hemmer von Transkriptionsfaktor Tcf4 (*T-cell factor 4*). Das führt zur Expression mehrerer proliferationsfördernder Gene. Mittlerweile konnte eine Vielzahl von Wnt-Zielgenen identifiziert werden, die bereits die Entstehung von Adenomen begünstigen und zur Tumorprogression von kolorektalen Karzinomen beitragen.

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

MYC, Cyclin D1, uPAR, Matrix Metalloproteinase MMP-7, Axin-2, Nr-CAM, Gastrin, CD44, claudin-1 sowie Osteopontin hochreguliert (He *et al.*, 1998; Tetsu and McCormick 1999; Shtutman *et al.*, 1999; Mann *et al.*, 1999; Brabletz *et al.*, 1999; Crawford *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2001; Lustig *et al.*, 2002; Conacci-Sorrell *et al.*, 2002; Koh *et al.*, 2000; Wielenga *et al.*, 1999; Miwa *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2002; Coppola *et al.*, 2004).

Die Wnt-Zielgene CEA related 1, FABP 1, Kruppel-like factor 4, Carbonic Anhydrase II sowie Galectin 2, das auch in vorliegender Arbeit hoch signifikant in der Expression reprimiert vorlag, wurden als reprimiert beschrieben (Lawrie *et al.*, 2004; Stone *et al.*, 2002).

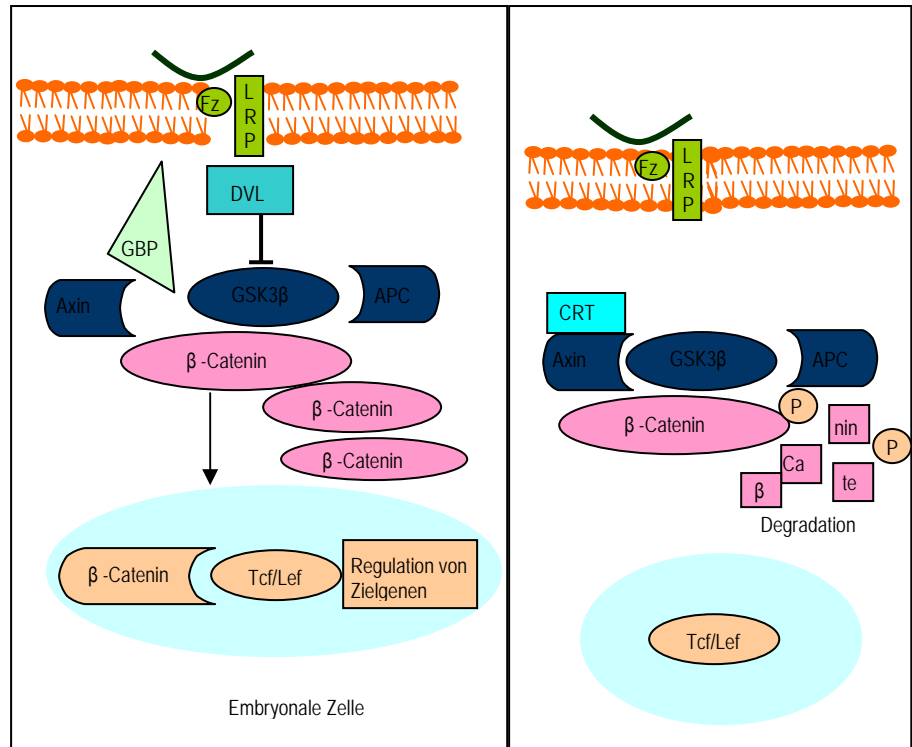


Abb. 59: Wnt-Signalweg in der Embryonalphase: Durch Bindung von Wnt-Liganden (*Wingless-type MMTV interaction site family member*) an den Fz/LRP-Rezeptor (*Frizzled/Low density lipoprotein receptor related protein*) wird Dvl (Dishevelled) aktiviert. Dadurch wird die Aktivierung des Multiprotein-Komplexes über Bindung von Dvl an GBP (GSK 3 β binding protein) gehemmt. Axin kann keinen Komplex mit GSK-3 β (Glykogen Synthase Kinase 3 β) eingehen, es findet keine Phosphorylierung von β -Catenin über GSK-3 β statt. Nicht phosphoryliertes β -Catenin akkumuliert im Zytosol und kann nicht über das Proteasom degradiert werden. β -Catenin wird in den Nukleus transloziert und bindet dort die Transkriptionsfaktoren Tcf (T-cell factor) und Lef (lymphoid enhancing factor). Im Weiteren erfolgt die Regulation von Wnt-Zielgenen.

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

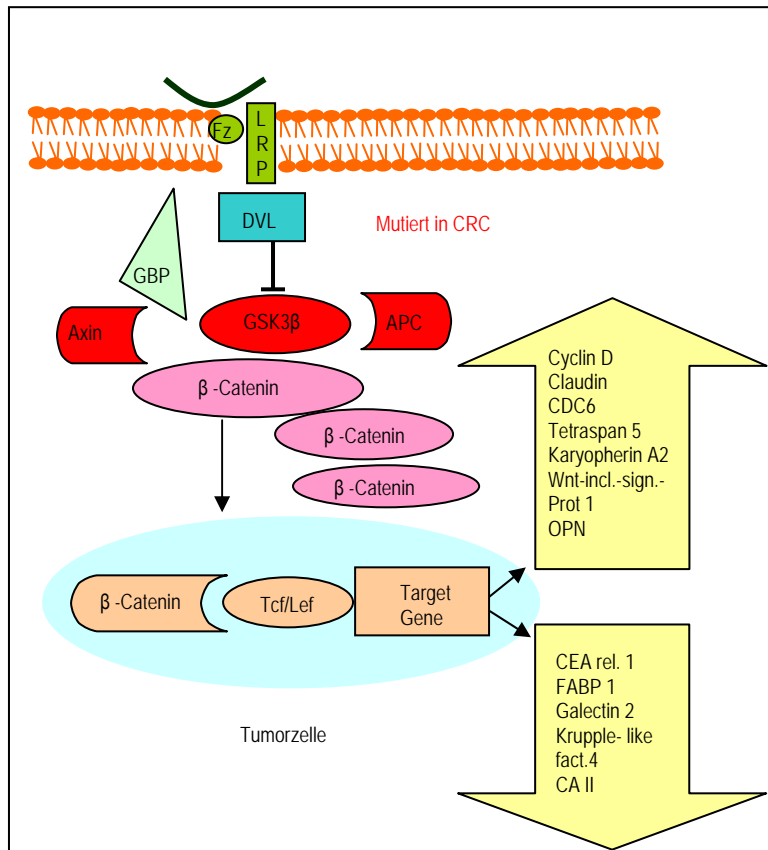


Abb. 60: Wnt-Signalweg in Tumorzellen: In Tumorzellen erfolgt die Aktivierung des Wnt-Signalweges in Abwesenheit eines Wnt-Liganden. Tumorzellen weisen Mutationen innerhalb des Multiproteinkomplexes auf (rot dargestellt). Durch das gestörte Zusammenspiel innerhalb des Multiproteinkomplexes kann β -Catenin nicht phosphoryliert werden. Nicht phosphoryliertes β -Catenin akkumuliert im Zytosol und kann nicht über das Proteasom degradiert werden. β -Catenin wird in den Nucleus transloziert und bindet dort die Transkriptionsfaktoren Tcf und Lef. Im Weiteren erfolgt die Regulation von Wnt-Zielgenen.

Die physiologische Bedeutung dieses Signaltransduktionsweges zeigte sich daran, dass Tcf4-*knockout*-Mäuse kurz nach der Geburt an einem Mangel an Darmepithelzellen starben (Helmborg *et al.*, 2006). Im Fall einer mutationsbedingten Inaktivierung beider APC-Allele führte der Wegfall der Möglichkeit, β -Catenin zu phosphorylieren auch in Abwesenheit des Wachstumsfaktors Wnt zu einer Dauerakkumulation von β -Catenin und damit zu einer Dauerexpression von CyclinD und MYC. Mit anderen Worten: der Verlust von APC führte zu einem vorgetäuschten Wnt-Wachstumssignal. Das Vortäuschen eines Wnt-Wachstumssignals wäre bei intaktem APC auch durch eine Überexpression oder mutations bedingte Stabilisierung von β -Catenin denkbar. Tatsächlich konnte diese nur in etwa 10% aller Kolonkarzinome gefunden werden. β -Catenin hat in diesen Fällen also Onkogen-Funktion. Dieses Beispiel zeigte, dass eine wesentliche Tumor-fördernde Veränderung in der Aktivierung eines für die Proliferation der spezifischen Zellart ausschlaggebenden Signalwegs lag. Dies war sowohl über den Verlust von bremsenden Elementen (Inaktivierung von Antionkogenen) als auch über die Aktivierung Signal-Fördernder Elemente (Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen) möglich. APC hat noch eine weitere zelluläre Funktion in der Metaphase der Zellteilung: es koppelt die

Enden der Microtubuli der entstehenden Spindel auf der einen Seite an die Kinetochoren der Chromosomen, auf der anderen Seite des Spindelpols an eine definierte Stelle der Zellmembran. Bei einem Ausfall von APC verringerte sich die Präzision des Auseinanderziehens und Verteilens der Chromosomen auf die entstehenden Tochterzellen. Die Folge war, wie beim Ausfall von *p53*, chromosomale Instabilität (CIN), die den Grundstein für einen raschen Verfall der Genomqualität bildete. Außerdem gab es Hinweise dafür, dass APC über die Anheftung der Spindel an der Zellmembran die Zellteilungssachse einstellt, die wesentlich für die asymmetrische ("heteromorphe") Charakteristik der Stammzellteilung war. Fehlte APC in einer Stammzelle, verlief die Teilung symmetrisch und resultierte in zwei Zellen mit uneingeschränktem Teilungspotential. Die Fehleinstellung der Zellachse konnte so eine Ursache für die Differenzierungsstörung des Zellklons sein. Diese Anheftungsfunktion von APC mochte der Grund sein, warum der Verlust von APC-Aktivität häufig der erste Schritt in der *multi-step*-Entwicklung eines Kolonkarzinoms war (Fodde *et al.*, 2001)

In ruhenden Zellen war die Expression von *MYC* kaum nachweisbar. Nach Stimulation mit Serum oder Mitogenen wurden die *MYC*-mRNA und das *MYC*-Protein sofort stark induziert und die Zellen traten in die G1-Phase des Zyklus ein. In proliferierenden Zellen verringerte sich die Menge von *MYC* dann auf ein niedrigeres, gleich bleibendes Niveau. Nach Entzug von Serum bzw. Wachstumsfaktoren waren die *MYC*-mRNA und das Protein nicht mehr detektierbar und die Zellen arretieren. Viele direkte und indirekte Zielgene von *MYC* sind an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Bis jetzt konnte noch kein Zielgen identifiziert werden, das die Fähigkeit von *MYC*, Zellproliferation zu induzieren, ersetzen kann (Berns *et al.*, 2000; Nikiforov *et al.*, 2000). Die Zielgene von *MYC* beeinflussen die Regulation der Zell-Matrix Interaktionen, die DNA-Synthese, besonders aber den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (Schuhmacher *et al.*, 2001; Fernandez *et al.*, 2003). Dieser Übergang wird durch den so genannten Restriktionspunkt (R) kontrolliert. Um diesen Checkpunkt zu überwinden, muss das Tumor-Suppressor-Protein Rb inaktiviert und zwei Cyclin/CDK-Komplexe CyclinD/CDK4 und Cyclin E/CDK2 aktiviert werden (Sherr *et al.*, 1999).

MYC induziert direkt die Zielgene *CDK4* und *CyclinD2* (Bouchard *et al.*, 1999, 2001) die einen aktiven Komplex bilden. Mit seiner Wirkung auf die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins ist D2/CDK4 entscheidend für den Start des Zellzyklus. Wenn das pRB nicht phosphoryliert ist, wirkt es gewissermaßen als Bremse. Eine reduzierte CDK4 Expression inhibiert eine durch *MYC* induzierte Tumorigenese (Marval *et al.*, 2004). Daraus folgt, dass CDK4 ein entscheidender Vermittler der *MYC*-induzierten Tumorigenese ist. Diese konnte in vorliegender Arbeit, in der eine Überexpression von CDK4 in Tumorgewebe festgestellt worden ist, bestätigt werden. Ferner korrelierte die *MYC*

Überexpression mit der von CDK4, dessen verstärkte Expression eine Tumorentstehung begünstigt (Marval *et al.*, 2004; Al-Ayanti *et al.*, 2004).

Cyclin D/CDK4 spaltet den Cyclin/Cdk-Inhibitor p27 ab, der an dem Cyclin E/CDK2-Komplex gebunden ist. Durch die Abspaltung des Inhibitors wird eine kleine Menge CyclinE/CDK2 aktiviert. Dieser aktive Kinase-Komplex phosphoryliert p27, das daraufhin von einem E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, der Cul1 enthält, erkannt und abgebaut wird (Bouchard *et al.*, 1999, 2001) Cul1 ist ein weiteres Zielgen von MYC (Coller *et al.*, 2000). Zusätzlich reprimiert MYC den Cyclin/Cdk-Inhibitor p15, der den CyclinD/CDK4-Komplex inaktiviert. Eines der Substrate des CyclinD/CDK4-Kinase-Komplexes ist Rb (Retinoblastoma Protein). Rb ist häufig in Tumoren mutiert und ist essentiell für die Regulation des G1-S-Checkpunktes. Rb reguliert in negativer Weise die Aktivität der E2F-Transkriptionsfaktoren, die wichtig für die Progression in die S-Phase sind (Bartlek *et al.*, 1997). MYC induziert außerdem die Expression des Id2-Gens, das die Funktion von Rb inhibiert (Blomberg *et al.*, 1999). MYC aktiviert auch den zweiten Cyclin/CDK-Komplex (CyclinE/CDK2), dessen Aktivität für den Eintritt in die S-Phase nötig ist. CyclinE wird neben der Phosphatase CDC25a als Zielgen von MYC beschrieben. Durch Induktion von MYC wird die Aktivität von CyclinE/CDK2 stimuliert (Blomberg *et al.*, 1999; Galaktionov *et al.*, 1996). Zusätzlich unterdrückt MYC die Expression von p21, welches CyclinE-CDK2 inaktiviert und durch den Tumor-Suppressor p53 als Teil eines antiproliferativen Programms hoch reguliert wurde (Sherr *et al.*, 1999).

Das Ergebnis dieser MYC-abhängigen Regulationsschritte waren die Aktivierung der CyclinD- und CyclinE-abhängigen Kinasen und die Inaktivierung des Rb-Proteins. Diese Schritte förderten den Eintritt in die S-Phase und erklärten die Effekte von MYC auf den Zellzyklus. Der Übergang von der G1- in die S-Phase bei der Zellzyklusprogression war ein kritischer Punkt in der Tumorentstehung (Reed *et al.*, 1997). Viele Tumorzellen trugen Mutationen, die den G1-S-Restriktionspunkt betrafen und DNA-Synthese auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren erlaubten. Hat eine Zelle den Restriktionspunkt überschritten, durchlief sie den Zellzyklus auch unter limitierenden Bedingungen. Eilers *et al.* konnten zeigen, dass MYC den Restriktionspunkt auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren überwindet und so die S-Phase des Zellzyklus induzieren konnte (Eilers *et al.*, 1991). Diese Zellzyklusprogression wurde durch MYC-abhängige Aktivierung des CyclinE/CDK2 Komplexes und der E2F abhängigen Transkription induziert.

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass signifikante Unterschiede in der Expression des *MYC* Gens zwischen krankem und gesundem Gewebe nachzuweisen waren, was auf ein unbegrenztes Zellwachstum hindeutete.

Ein weiteres, differenziert reguliert identifiziertes Gen, war *DKC1*. Das von *DKC1* codierte, hoch konservierte Protein Dyskerin ist mit seiner Funktion bei der rRNA-Biosynthese

essentiell. Ferner ist es an der Zellteilung sowie an Zellstoffwechsel-Mechanismen beteiligt. Es trägt zum Erhalt der Telomere, deren Integrität und Länge bei. Dyskerin übt als Bestandteil des Telomerase-RNP-(Ribonukleoprotein)-Komplexes einen Einfluss auf die Proliferationskapazität von Zellen aus (Smogorzewska *et al.*, 2004; Marrone *et al.*, 2004). Telomerase ist gewöhnlich nur in Keimlinienzellen aktiv: nur diese werden "unendlich" weiter gegeben. In somatischen Zellen ist Telomerase inaktiv. Das trägt zur eingeschränkten Teilungsfähigkeit und Seneszenz somatischer Zellen bei. In den meisten Tumorzellen ist jedoch Telomerase reaktiviert; diese trägt zur unbegrenzten Teilungsfähigkeit der Tumorzellen bei. Reaktivierte Telomerase wirkt daher als Onkogen. Die pharmazeutische Industrie arbeitet intensiv daran, Telomerasehemmer zu entwickeln: diese sind zur Zeit eines der Hoffungsgebiete der Krebstherapie. Die nachgewiesene hochregulierte Expression von *DKC1* könnte eine telomerstabilisierende Wirkung haben. Die Erhaltung der Telomere ist ein entscheidendes Merkmal der Karzinogenese, da ein Einleiten der Apoptose verhindert wird und unbegrenztes Wachstum gewährleistet.

Alle bisher beschriebenen Gene waren in Kolonkarzinomen exprimiert. Im Folgenden wird auf ein Gen eingegangen, welches im Kolonkarzinom signifikant in seiner Expressierung reduziert war. Bei diesem Gen handelte es sich um *DRA*. Die Expression dieses Membran-Proteins schien bei Kolonadenomen und Adenokarzinomen reduziert zu sein. Weitere Untersuchungen bestätigten die überwiegende Expression von *DRA* in hoch differenzierten Kolonepithelzellen und eine im Gegensatz dazu sehr niedrige Expression in undifferenzierten Epithelgeweben (Antalis *et al.*, 1998; Byeon *et al.*, 1998a). *DRA* befindet sich auf Chromosom 7 (7q22-q31.1). Dieses Gen wurde mit der kolorektalen Tumorgenese assoziiert (Taguchi *et al.*, 1996) und als Tumor-Suppressor klassifiziert (Byeon *et al.*, 1998a).

Das *DRA*-Genprodukt wurde als ein in Enterozyten apikal-lokalisierendes, transmembranäres Glykoprotein nachgewiesen, welches Sulfat, Oxalat und Chlorid transportiert und Einfluss auf den parallel angeordneten Na^+/H^+ - Austausch ausübt (Byeon *et al.*, 1998; Siberg *et al.*, 1995; Byeon *et al.*, 1998b). Da eine reduzierte Expression von *DRA* die Karzinogenese mit zu begünstigen schien, könnte ein Substanz die normalerweise durch das *DRA*-Protein in die Zelle oder aus der Zelle transportiert wird, dafür verantwortlich sein. Zur Identifikation dieser Substanz könnte mittels Zellkultur mit *DRA*-positiven und *DRA*-negativen Zellen eine Anreicherung bzw. Reduktion der bekannten, mittels *DRA* transportierten, Stoffe gemessen werden.

4.4 Gen-Expressionsanalysen zur Aufklärung der Hormonresistenz des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist eines der häufigsten Krebsleiden der männlichen Bevölkerung Westeuropas und der Vereinigten Staaten. In den letzten Jahren stieg die Inzidenz des Prostatakarzinoms kontinuierlich an (Landis *et al.*, 1998; Hsing *et al.*, 2000). In den Vereinigten Staaten erkrankten im Jahr 2002 189.000 Männer neu an Prostatakarzinom, 30.200 Patienten starben an den Folgen dieses Krebsleidens (Am. Cancer soc. 2002). Nach Schätzung des Robert-Koch-Instituts erkrankten in Deutschland jährlich etwa 32.000 Männer neu an Prostatakarzinom. Weltweit werden starke Schwankungen in der Prostatakarzinomhäufigkeit beobachtet. Die höchste Wahrscheinlichkeit, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, besteht bei der afrikanisch-stämmigen Bevölkerung der Vereinigten Staaten, dagegen wiesen asiatische Völker eine niedrigere Inzidenzrate auf (Pienta *et al.*, 1993; Sakr *et al.*, 1998). Auffällig war in diesem Zusammenhang auch, dass bei Männern der afrikanisch-stämmigen Bevölkerung der USA mit Prostatakarzinom zur Diagnosestellung ein durchschnittlich jüngeres Alter und meistens ein klinisch fortgeschritteneres Prostatakarzinom festgestellt wurden (Mebane *et al.*, 1990). Insbesondere die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) hatte zu einem Anstieg der diagnostizierten Prostatakarzinome geführt. Durch die Einführung der PSA-Messung war in höherem Maße ein organbegrenzttes Prostatakarzinom im kurablen Stadium frühzeitig erkannt worden. Die Sterblichkeit des Prostatakarzinoms liegt in der Statistik hinter der des Bronchialkarzinoms. Aus epidemiologischer Sicht konnte zwischen sporadisch und familiär auftretenden Prostatakarzinomen unterscheiden werden. In der Mehrzahl der Fälle geht man von einer polygen-multifaktoriellen Genese aus.

Die radikale Prostatektomie ist heute die am häufigsten durchgeführte Therapie des Prostatakarzinoms. Allerdings ist die radikale Entfernung der Prostata bei fortgeschrittenen Prostatakarzinomen oft nicht möglich. Hier bieten Hormontherapie, Orchiektomie, Strahlen- sowie Chemotherapie oder eine Kombination dieser Methoden eine Möglichkeit der palliativen Behandlung (Arcangeli *et al.*, 1998). Die Inhibierung der Androgenproduktion bzw. die Blockade des AR spielen dabei eine zentrale Rolle, da primäre Prostatakarzinome in ihrem Wachstum androgenabhängig sind. Durch die Antiandrogentherapie kommt es zur Apoptose der androgenabhängigen Prostatazellen (Isaacs *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1997). Die hormonelle Androgenentzugstherapie erfolgt mit Antagonisten des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH), die Blockierung der Funktion des AR entweder durch steroidale (Cyproteronacetat) oder nichtsteroidale (Hydroxyflutamid oder Bicalutamid) Verbindungen. Andere Therapieformen gehen von einer Hemmung der 5- α -Reduktase, die das Testosteron in Dihydrotestosteron (DHT) umwandelt, mit Finasterid aus. Nachsorgeuntersuchungen zeigten jedoch bei vielen Patienten (etwa 80 %) nach einigen Monaten bis Jahren der zunächst erfolgreichen Antiandrogentherapie einen erneuten Anstieg der PSA-Konzentration im Serum (Petrylac

et al., 1999). Bei diesen Patienten kam es im Laufe der Antiandrogentherapie zu einer erneuten Progression oder Metastasierung der Erkrankung. Etwa 25 % der Patienten zeigten bereits primär kein Ansprechen auf die Antiandrogentherapie (Koneti *et al.*, 1997). Bei diesen hormonrefraktären Prostatakarzinomen konnte eine zytostatische Chemotherapie angewandt werden. Die Effektivität dieser Behandlungsform ist jedoch gering und weist eine maximale Ansprechrate von 30 % auf (Wirth *et al.*, 1990).

In den letzten Jahren konnten molekularbiologische Untersuchungen eine Reihe von viel versprechenden prognostischen Biomarkern in Bezug auf die Therapieresistenz aufdecken. Dazu zählten z. B. die Hypermethylierung von GST-P1 (Goessl *et al.*, 2001) oder Überexpression von AMACR oder HEP5IN (Hessels *et al.*, 2004; Dhanasekaran *et al.*, 2001) mit einem hohen Potential sehr spezifisch und sensitiv Prostatakrebs in einem sehr frühen Stadium zu erkennen. Für die Entwicklung der Hormonresistenz ist bis heute weder ein Früherkennungs- noch Therapiekonzept zu erstellt worden. Der Forschungsschwerpunkt in diesem Zusammenhang lag bisher auf der Suche nach Biomarkern, die den Androgen Signalweg betreffen. So z. B. die Amplifikation, differenzielle Expression oder Mutation des Androgenrezeptors (AR), seiner Co-Aktivatoren oder die 5- α -Reduktase als mögliche Gründe für die Entwicklung eine Hypersensitivität des AR und deren abnormen Reaktion auf Androgene und Anti-Androgene (Visakorpi *et al.*, 1995; Makridakis *et al.*, 1997; Marcelli *et al.*, 2000; Gregory *et al.*, 2001). In *in vitro* Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine Liganden unabhängige AR Aktivierung über EGF- (epidermal growth factor) oder IGF1-(*insuline-like growth factor 1*) Rezeptor Tyrosin Kinase-Pathways bzw. eine Überexpression von HER2/neu erfolgen konnte (Culig *et al.*, 1994; Craft *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2005). Weitere Analysen in Modellsystemen zeigten, dass auch andere Signalwege, wie z. B. IL6 (*Interleukin6*) und TGF- β (*transforming growth factor β*) bei der Entwicklung eines Hormon unabhängigen Prostatakarzinoms beteiligt waren (Lee *et al.*, 2004; Hammacher *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Ein weiterer theoretischer Mechanismus zur Resistenzentwicklung war die Entstehung des Tumors aus einer Population ursprünglich hormonunabhängiger Zellen, wie z.B. epithelialer Stammzellen (Isaacs 1999; Collins *et al.*, 2005).

Die Mikroarray-Technik hat in den letzten Jahren als eine wertvolle Methode zur Aufklärung molekularer Mechanismen, im Bezug auf die Progression des Prostatakarzinoms, an Bedeutung gewonnen (Dhanasekaran *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2004; LaTulippe *et al.*, 2002). Sie diente der Identifikation von Genexpressions-Signaturen und der Aufklärung vor allem der Progression neoplastischer Strukturen (Rhodes *et al.*, 2004). Studien zur Entwicklung des Hormonresistenten Prostatakarzinoms (HRPC), die Mikroarray Untersuchungen einschließen, existieren erst sehr wenige (Best *et al.*, 2005; Holbeierlein *et al.*, 2004).

4.4.1 Untersuchungen zur transurethralen Resektionsmethode

Es wurde gezeigt, dass transurethral gewonnene Prostatagewebeprobe, für auf RNA basierende Forschungsmethoden, einschließlich Mikroarray-Untersuchungen, geeignet waren, wenn die Probengewinnung unter standardisierten Sammel- und Präparationsbedingungen erfolgte. Dieser Zusammenhang eröffnete die Möglichkeit in Zukunft Studien zur Identifikation therapeutischer Konzepte im Bezug auf die Entstehung der Hormonresistenz mit einer größeren Patientenzahl durchzuführen. Es war bisher fast unmöglich Prostatagewebe von Hormon resistenten Patienten zu erhalten, da die palliative transurethrale Resektion erst seit wenigen Jahren durchgeführt wird.

Die Korrelationskoeffizienten der biologischen und technischen Replikate bewiesen die Stabilität und Reproduzierbarkeit des gesamten Protokolls.

Innerhalb der vielen verschiedenen Möglichkeiten zur Bestimmung der RNA-Qualität, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die AUC und RIN die sensitivsten Filterkriterien sind zur Identifikation von RNA mit schlechter Qualität. Unter Berücksichtigung dieses Zusammenhangs wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der RNA-Qualität von transurethral (TUR) gewonnen Prostatagewebeprobe und Totalresektaten (TR) gefunden mit einer höheren AUC und RIN Präparaten von Totalresektaten. Durch Anwendung eines linearen Zweige Algorithmus (Mansmann *et al.*, 2005) wurde gezeigt, dass nach Eliminierung der TUR-spezifischen -Gene der biologische Effekt, im Gegensatz zum technische Effekt, signifikant blieb.

Es wurde nachgewiesen, dass die RNA Qualität aus TUR im Vergleich zu RNA aus Totalresektaten mit $AUC \geq 10\%$, eine $28S/18S/ \text{Ratio} \geq 0,8$ und eine $RIN \geq 6$ bei laut den Prozentzahlen der detektierbaren Transkripte, dem *scaling factor*, *noise*, *background* und der 3'/5' Ratio im Verhältnis zur internen Chipkontrolle geeignet waren (AUC und RIN $p < 0,05$). Daraus folgte, dass TUR-Gewebeprobe sich für Mikroarray Untersuchungen eigneten und zur Analyse biologischer Effekte. So war ein Vergleich unterschiedlich Gewonnener Prostata-Gewebeprobe möglich. Auch in der Clusteranalyse konnte gezeigt werden, dass Gewebeprobe unterschiedlicher Gewinnung von gleicher Krankheitsstufe in gleiche Gruppen fielen.

4.4.2 Evaluierung von Prostatakarzinom-Biomarkern in einer Zeitreihenanalyse

Des Weiteren wurde nach Genen gesucht, die im Krankheitsverlauf in ein bestimmtes Muster fielen. So z. B. Gene:

- a. die eine temporäre Revision in hsPCa zeigten
- b. die nur in HRPC differenziell exprimiert waren oder
- c. die einen Anstieg der Expression nach einsetzender Hormonresistenz zeigten
- d. die einen Abfall der Expression nach einsetzender Hormonresistenz zeigten.

Es wurde ein Gen identifiziert, das eine zeitweise Remission der Expression während der hsPCa Phase zeigte (bis auf BPH Niveau) und in der HRPC-Phase wieder anstieg. Dieses Gen –*SLC39A6*– (*LIV-1*) gehörte zur Familie der *solute carrier family*, ein durch Östrogen regulierter Zink Transporter. Zwei weitere Mitglieder aus dieser Familie *SLC7A11* und *SLC25A13* zeigten genau denselben Verlauf wie *SLC39A6*. Interessant war der Zusammenhang, dass in den Kolon-Expressionsanalysen Mitglieder dieser Familie (*SLC17A4*, *SLC26A3* und *SLC21A2*) signifikant in ihrer Expression reduziert waren. *SLC39A6* lag in Mamma-, Prostata-, Plazenta-, Nieren-, Hypophysen- und Corpus callosum-Gewebe hoch exprimiert vor; ebenso in Adenokarzinomen des Zervix uteri und in Lungenkarzinomen. Moderat exprimiert wurde es in Herz- und Kolon-Gewebe. *SLC39A6* ist ein androgenabhängiger Zinkionen-Transporter was in einer Studie an Mamma-Karzinom-Zelllinien gezeigt wurde. Hier war *SLC39A6* unter Östrogeneinfluss hochreguliert (Ross *et al.*, 2000). Vorliegende Arbeit bestätigte das Ergebnis, da hsPCA entweder durch LHRH (chemische Kastration) oder durch die Gabe eines Antiandrogens behandelt wurden. Beide Therapien bewirkten einen zirkulären Östrogenanstieg. Durch Antiandrogene wird Dihydrotestosteron (DHT) kompetitiv von den Rezeptoren verdrängt und die Bildung eines DHT-Rezeptorkomplexes verhindert. Es wird zwischen steroidal und nichtsteroidal Antiandrogenen unterschieden. Steroidale Antiandrogene wie z.B. Cyproteronazetat haben gestagene Wirkung, die den Testosteronspiegel senkt. Nicht steroidale bewirken hingegen nur eine reine Rezeptorblockade. Da sie aber auch Androgenrezeptoren im hypothalamisch-hypophysären System blockieren, unterbinden sie den Rückkopplungsmechanismus. Daraus resultiert ein Anstieg von zirkulärem Androgen, unter anderem auch Östrogen. Dieser Stimulus könnte eine Expression von *SLC49A6* bewirkt haben.

Zink ist ein essentieller Cofactor für ca. 300 verschiedene Enzyme. Es ist involviert in Protein-, Aminosäure-, Kohlenhydrat- und Fett-Stoffwechselprozesse. Es spielt eine Rolle bei der Gen-Transkriptions-Kontrolle, bei Zell-Wachstums- und Entwicklungsprozessen sowie bei der Differenzierung. Es wird unter anderem benötigt zur Membranstabilisierung und zur Speicherung von Insulin. An Studien mit Mamma-Karzinomzelllinien wurde nachgewiesen, dass *SLC39A6* vor allem den Zinkeinstrom in die Zelle bewirkte (Taylor *et al.*, 2003). Jüngste Forschungsergebnisse zeigten, dass Zink eine wichtige Rolle bei der Gesundheit der Prostata spielte und das Wachstum und die Verbreitung von Prostatakrebszellen verhinderte (Davis *et al.*, 2005). Huang *et al.* (2005) erforschten, welche Rolle dem Zink-Transporter-Proteinen zukommt. In einer Reihe von Experimenten wurde die Höhe des Zink-Levels und der Zink-Transporter-Proteine bei Karzinom- und gesunden Prostatazellen verglichen. Es wurde festgestellt, dass Karzinomzellen niedrigere Mengen Zink aufnehmen konnten als normale Zellen. Es stellte sich heraus, dass Karzinomzellen eine geringere Anzahl des Zink-Transporter-Proteins *SLC39A1*

(ZIP1) aufwiesen. Darüber hinaus konnte ein weiteres Transporter-Protein, SLC39A3 (ZIP3) an der falschen Stelle nachgewiesen werden.

Einen invertierten Verlauf der Expression wies *MYLK* (*myosine light chain kinase*) und eine weitere Anzahl von Genen auf, die in die Zytoskelett Organisation involviert sind, wie *GSN*, *ACTN1*, *DOC1* oder *TNS1* (Abb. 61B)

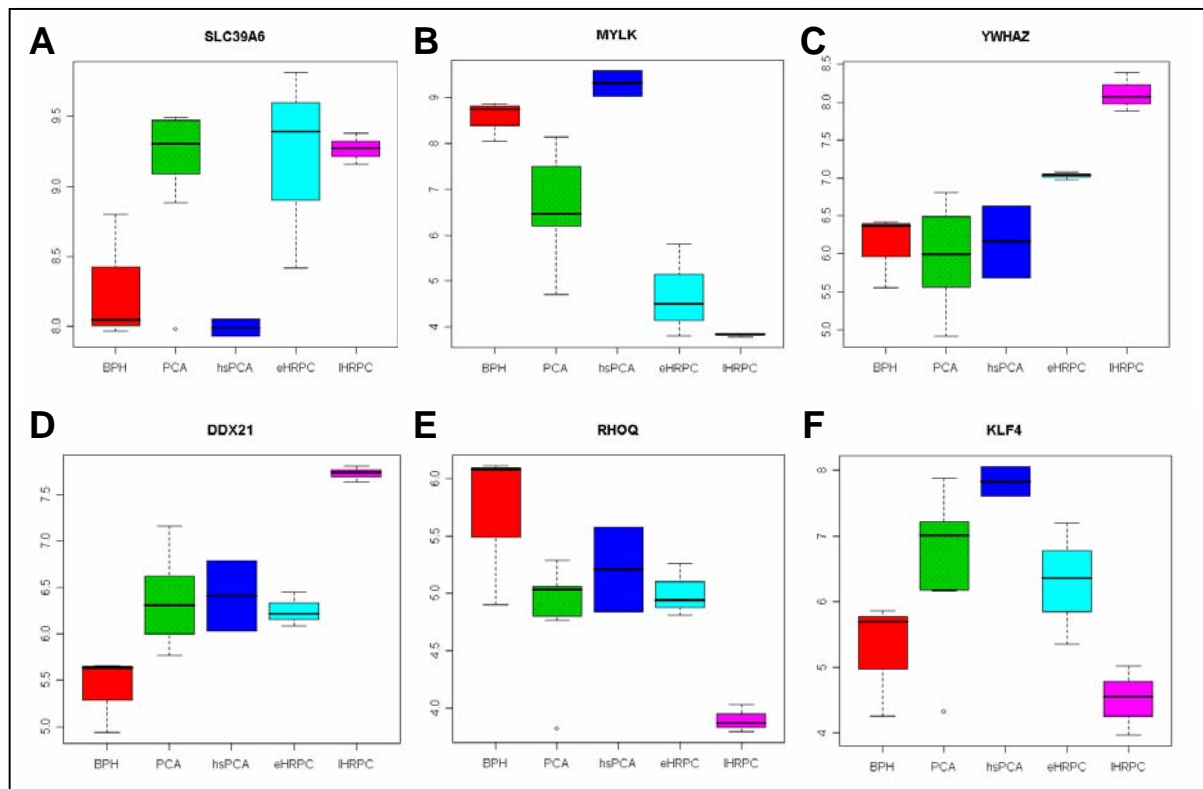


Abb. 61: Differenziell regulierte Gene der Zeitreihenanalyse. A: *SLC39A6* ist in BPH reprimiert, in PCA induziert, in hsPCA reprimiert und in eHRPC und HRPC induziert. B: *MYLK* ist in BPH induziert, in PCA leicht reprimiert, in hsPCA stark induziert, in eHRPC reprimiert und in HRPC noch stärker reprimiert. C: *YWHAZ* ist in BPH, PCA und hsPCA gleich bleibend exprimiert und steigt in der Induktion von eHRPC zu HRPC an. D: *DDX21* ist in BPH reprimiert, in PCA, hsPCA und eHRPC leicht induziert und in HRPC stark induziert. E: *RHOQ* ist in BPH induziert, fällt in der Induktion in PCA, hsPCA, eHRPC und ist in HRPC reprimiert. F: *KLF4* zeigt einen Anstieg der Induktion von BPH zu hsPCA und fällt wieder von eHRPC zu HRPC.
BPH rot- PCA grün – hsPCA blau- fHRPC türkis- sHRPC pink

Einen Abfall (Typ *MYLK*) der Expression zeigten *JAK1* (*janus kinase*) und *OAT* (*Ornithine Aminotransferase*) in PCa, einen temporären Anstieg in hsPCa und einen erneuten Abfall in HRPC. Des Weiteren wurden drei Gene ermittelt worden, die nur in HRPC eine Expression zeigten (Typ *YWHAZ*). In diesem Fall wurde ein korrigierte p-value bestimmt, der die BPH- und PCA-Proben von denen mit HRPC trennte. Diese Gene waren *YWHAZ* (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide*) ($p=0,02$) (Abb. 61c), *PSMA2* (*proteasome subunit, alpha type, 2*) ($p=0,04$) und *ABCE1* (*ATP-binding cassette, sub-family E, member 1*) ($p=0,04$). Es wurden noch

weitere Gene identifiziert, die nur in HRPC differenziell exprimiert gefunden wurden. Dazu gehörte das in der Expression reduzierte Gen *DDX21* (*DEAD box polypeptide 21*) (Abb. 61D) und *RHOQ* (*ras homolog gene family member Q*) (Abb. 61E).

Es wurden ferner Cluster untersucht, die ein Inversion der Genexpression während des Übergangs von hsPCa- zur HRPC-Phase zeigten. *KLF4* (*kuppel like factor 4*) (Abb. 61F) und *SGK* (*serum/glycocorticoid regulated kinase*) zeigten diesen Verlauf mit einem Anstieg der Genexpression im Verlauf zu hsPCa und einem Abfall beim Übergang in die HRPC-Phase.

Diese genannten Gene könnten potentielle *targets* zur Hormonresistenz Diagnostik beim Prostatakarzinom sein.

4.4.3 Differenziell exprimierte Pathways

Es wurden differenziell regulierte metabolische- und Signalwege im Vergleich zwischen PCa und HRPC gefunden. Dazu wurden neun PCa und sieben HRPC Patienten Gewebeproben miteinander verglichen. Innerhalb der betroffenen Pathways mit der höchsten Prozentzahl an Genen mit signifikantem Einfluss auf die Gruppenverteilung (Verhältnis aus der Gesamtanzahl an Genen auf dem Mikroarray zur Anzahl der differenziell exprimierten Gene die diesen Pathway betreffen), wurde unter anderem der Proteasom Metabolismus detektiert. Das Proteasom ist ein wichtiger Bestandteil der Zelle. Seine Hemmung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der lebenden Zelle. Als Konsequenz einer Inhibition wird der Proteinabbau in der Zelle erniedrigt, so dass kurzlebige und langlebige Proteine in der Zelle akkumulieren (Craiu *et al.*, 1996). Dies wiederum führte in der Zelle zu Veränderungen im Stoffwechsel und der Signaltransduktion.

Des Weiteren wurden Gene ausschließlich bei HRPC differenziell exprimiert, die in die oxidative Phosphorylierung und die ATP-Synthese involviert sind. Dazu gehörten *NDUFC2* (*NADH dehydrogenase 1 subcomplex unknown 2*), *COX6C* (*cytochrome c oxidase subunit VIc*) und *UQCRH* (*ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein*). Eine kritische Bedingung für die Tumorentwicklung ist die Versorgung der proliferierenden Zellen mit Energieträgern und Sauerstoff. Mit dem autonomen Wachstum der Tumorzellen wird bald der Punkt erreicht, an dem die Diffusionsstrecken zu lang sind, um zentral lokalisierte Zellen hinreichend zu versorgen. Der so entstehende Sauerstoffmangel setzt zwei für die weitere Entwicklung des Tumors bedeutsame Mechanismen in Gang. Die erste Folge der Hypoxie stellt die Induktion von p53 dar. Falls der betroffene Zellklon bezüglich p53 noch intakt ist, führt dieser normale Regulationsmechanismus zum G1-Arrest, bei längerem Einwirken zur Apoptose der Zellen im zentralen, unterversorgten Gebiet des Tumors. Das bedeutet, dass in diesem Gebiet ein starker Selektionsdruck gegen funktionelles p53 entsteht: eine Zelle, die p53 verliert, kann sich als einzige gegen die stillgelegten

Konkurrenten behaupten und einen neuen, nunmehr um den Verlust von p53 maligneren Zellklon bilden. Die entsprechenden Zellen haben damit den *DNA-damage-checkpoint* verloren, zeigen chromosomale Instabilität und Akkumulieren wesentlich rascher weitere kritische Mutationen. Dieser Mechanismus, durch den Hypoxie den Verlust von p53 begünstigt, könnte die Ursache dafür sein, dass p53 das am häufigsten mutierte Molekül in der Krebsentstehung ist.

Den zweiten Mechanismus stellt die bereits am Beginn dieses Kapitels besprochene sauerstoffabhängige Hydroxylierung, Ubiquitinierung und Degradation des Transkriptionsfaktors HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*) dar. HIF-1 kommt in praktisch allen Zellen vor. Während es nur in der Niere nennenswert Erythropoetin induziert, induziert es andere Gene uniform in vielen Geweben. Bei Sauerstoffmangel im zentralen Tumorgebiet führt die Akkumulation von HIF-1 zur Induktion des Signalmoleküls VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Sezerniertes VEGF diffundiert radial in alle Richtungen, erreicht das Endothel der nächstgelegenen Blutgefäße und regt dieses zur Sprossung an, so dass neue Gefäßabzweigungen in Richtung des VEGF-Konzentrationsgradienten und damit in Richtung des unterversorgten Gebiets entstehen. Die einwachsenden Gefäße erreichen so das zentrale Tumorareal und verbessern die Versorgung dieser Zellen, die inzwischen eventuell p53 verloren haben. Sie erfüllen damit eine notwendige Bedingung für den nächsten Schritt in der Entwicklung eines malignen Tumors: nur, wenn der Tumor mit Gefäßen versorgt ist, kann er auf dem Blutweg metastasieren.

Gene die eine Rolle bei Purin- und Pyrimidin-Biosynthese spielen, wie die Thymidylat Synthase waren ebenfalls nur bei HRPC induziert, dessen Überexpression bereits bei Kolonkarzinomen nachgewiesen wurde (Bruhn 1999). Des Weiteren wurde eine Erhöhung der Zellzyklus Progression bei PCa durch die Unterdrückung der Genexpression von CDK11A (*cyclin-depend kinase inhibitor 1A*) gefunden.

4.5 Theorien zur Entstehung der Hormonresistenz

Prostatakarzinomzellen werden durch Androgene stimuliert, wobei Testosteron das biologisch wichtigste Androgen ist. Über 95% werden im Hoden, der Rest durch die Nebennierenrinden und durch periphere Interkonversion gebildet. Die Nebennierenrinde produziert in erster Linie das weitaus weniger biologisch aktive Dehydroepiandrosteron, das nur einen schwachen androgenen Effekt auf die Prostata ausübt. In Prostatazellen wird das Testosteron durch das Enzym 5- α -Reduktase in den intrazellulären biologisch hochaktiven Metaboliten Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. DHT wird an den Androgenrezeptor gebunden und überträgt als DHT-Rezeptorkomplex die Information in die Zelle.

Als komplette oder maximale Androgenblockade (MAB) wird die Kombination einer chirurgischen (Orchiektomie) und chemischen (GnRH) Kastration, zusammen mit einem Antiandrogen, das die verbleibenden adrenalen Androgene blockiert, angewendet.

Es war ferner möglich Patienten anhand ihres Genexpressionsprofils in die ihrer Erkrankung spezifische Gruppe BPH, PCa und HRPC einzuteilen. Allerdings fielen nach Anwendung des Global-Test-Algorithmus einige PCa Patienten in die HRPC Gruppe. Dieser Zusammenhang könnte ein Hinweis auf eine schlechtere Prognose für den Krankheitsverlauf dieser Patienten sein. In diesem Fall sind davon insgesamt elf Patienten betroffen gewesen.

Ferner konnte bei einem Patienten, von dem sowohl BPH Gewebe als auch Karzinomgewebe untersucht wurde, gezeigt werden, dass die BPH Probe in das PCa Cluster fiel. Dies unterstützt die von Yu *et al.* 2004 aufgestellte *field cancerization* Theorie, die besagte, dass Zellen in unmittelbarer Nähe eines Tumors ein beträchtlich verändertes Genexpressionsprofil aufwiesen, ähnlich dem des Tumorgewebes. Aufgrund molekulargenetischer Untersuchungen von Primär- und Sekundärtumoren wurde geschlossen, dass einige Sekundärtumoren Folgen lokaler Metastasierung waren, wobei der Metastasierungsweg unbekannt war (Braakhuis *et al.* 2003). In anderen Fällen wurde eine tatsächliche genetische Diversität festgestellt. Studien zur Morphologie von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und systematische Charakterisierungen des kanzerösen Feldes zeigten, basierend auf der Akkumulation von p53, dass diese wahrscheinlich in frühen Stadien an multifokalen Regionen des Gewebes entstanden waren, zu Gruppen transformierter Zellen fusionierten und nicht durch Streuung ausgelöst wurden (Tian *et al.*, 1998). Die hohe Frequenz p53-positiver, dem Tumor benachbarten Epithelien bei p53-negativen Karzinomen, sowie das Vorkommen unterschiedlicher p53 Mutationen unterstützten diese Theorie der *field cancerization* der Karzinogenese. Dieses Phänomen könnte ein Grund für das Entstehen von Rezidiven nach Entfernung des Primärtumors sein (Yang *et al.*, 1997). Für die Entstehung von Zweitkarzinomen sind demzufolge drei Modelle denkbar: echte Sekundärtumoren, sekundäre Feldtumoren und Rezidive bzw. lokale Metastasen (Califano *et al.*, 1996, Braakhuis *et al.*, 2002, 2003).

Durch Verwendung des immunhistochemischen PCa Marker AMACR wurde gezeigt, dass das AMACR Protein in PCa überexprimiert war und sich zwar zur Identifikation des PCa eignete (Tomlins *et al.*, 2006), aber für die Detektion von HRPC ungeeignet war (Abb. 55)

Die Clusteranalyse ergab, dass über die fünf verschiedenen Krankheitsphasen Gene auffielen, die nur in der Phase der hsPCa eine Remission zeigten wie *SLC39A6*. *SLC39A6* ist ein Östrogen regulierter Zink Transporter, der bei Östrogenrezeptor positiven Mammakarzinomen mit Lymphknotenbefall beschrieben wurde (Taylor *et al.*, 2003).

Eine große Gruppe von Genen, die bei der Zytoskelett Organisation beteiligt sind, wie MYLK waren ebenfalls bei hsPCa differenziell reguliert.

Eine Repression von Genen die nur die Phase der HRPC betrafen, die bei der Zytoskelett, *tight junction* und *adherens junction* Regulation beteiligt sind. In einer Metaanalyse von vier verschiedenen Genexpressionsuntersuchungen unter Vergleich von BPH mit PCa hatten Rhodes *et al.* (2004) 40 Gene die bei PCa reprimiert waren gefunden. Sechs der 40 Gene fielen in vorliegendes MYLK Cluster, es handelte sich hierbei um: *MEIS1*, *VCL*, *GSN*, *PRKCB1*, *TACC1* und *PLP2*. Die Metaanalyse hatte weiterhin die Relevanz der Polyamin Biosynthese in der Entstehung eines Prostatakarzinoms aufgedeckt, da die Unterdrückung der Expression von *OAT* (*Ornithine Aminotransferase*) bei Übergang in die HRPC-Phase beibehalten wurde (Abb. 61). Die Zeitreihenanalyse hatte Gene aufgedeckt, die nur in der HRPC-Phase differenziell exprimiert waren. Es wurde gezeigt, dass *YWAHZ*, *PSMA2* und *ABCE1* geeignete Marker zur Detektion von HRPC waren. Des Weiteren konnte *DDX21* gefunden werden, das zur Detektion der Hormonresistenz nach Androgenentzug dienen kann, da es nur in sHRPC eine starke Expression aufwies. *DDX21* ist eine RNA Helikase, die für die rRNA Synthese erforderlich ist. Dies wies darauf hin, dass die Proteinbiosynthese nach Androgenentzug erhöht wird.

Die Untersuchung signifikant differenziell Regulierten metabolischer- und Signal-Pathways bei Vergleich von PCa zu HRPC hatte eine Reihe von Genen aufgedeckt, die bei der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind und nur bei HRPC gefunden wurden. Dieser Befund war von Bedeutung, da von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurde, dass Krebs im Allgemeinen die ATP-Synthese nicht über die oxidative Phosphorylierung, sondern fast ausschließlich über die Glycolyse regelt (Rossignol *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2004). Für einige dieser Gene wie *COX6* ist eine anfängliche Unterdrückung in frühen Prostatakarzinomen im Vergleich zum BPH gefunden worden, gefolgt von starker Induktion beim Übergang in die HRPC-Phase.

Es wurden verschiedene Zellzyklus Kontrollgene gefunden, deren unterdrückte Genexpression nur bei frühen Prostatakarzinomen und HRPC zu beobachten waren. Zu diesen Genen gehörten *CDK11* (*p21*) und *TACC1*. *TACC1* ist für eine korrekte Zytokinese erforderlich. Daraus folgte, dass die Zellzyklus Kontrolle, die bei hsPCa wieder zu funktionieren schien, bei HRPC erneut außer Kontrolle geriet. Ferner wurde ein Hinweis auf gesteigerte DNA Synthese bei HRPC gefunden, mit der Induktion multipler Gene die bei der Purin- und Pyrimidin Biosynthese beteiligt sind, wie z. B. *ORC6*, das bei der Replikationsinitiation eine Rolle spielt.

Seit der Klonierung des AR durch Lubahn *et al.* (1988) und Trapman *et al.* (1988) wurde in einer Vielzahl von Studien die zentrale Rolle des AR bei der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms nachgewiesen. Der AR stellt als intrazellulärer Rezeptor die Verbindung zu den Androgenen her, die für die Entwicklung, Differenzierung und das Wachstum der Prostata verantwortlich sind. Über den AR entfalten die

Androgene ihre regulierende Wirkung. Es wurde gezeigt, dass in vielen Fällen das androgenunabhängige Wachstum des Prostatakarzinoms mit genetischen Veränderungen im AR assoziiert war. Der AR gehört zur Gruppe der intrazellulären Steroidrezeptoren. Er beeinflusst als nukleärer Transkriptionsfaktor die Transkription spezifischer Zielgene über eine direkte Interaktion mit regulatorischen Sequenzen in der DNA (Culig *et al.*, 1998). Zur Familie der Steroidrezeptoren gehören unter anderem die Östrogen-, Glukokortikoid-, Mineralkortikoid- und die Progesteronrezeptoren. In der Prostata wurde der AR überwiegend in den sekretorischen Zellen nachgewiesen, während die Basalzellen ihn nur schwach exprimierten. Im Stromagewebe der Prostata war der AR immunhistochemisch nicht oder nur sehr schwach nachweisbar (Sar *et al.*, 1990). Das AR-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und erstreckt sich über mehr als 90 kb in der chromosomalen Region Xq12 (Wieacker *et al.*, 1987). Es besteht aus 8 Exons und exprimiert in der menschlichen Prostata zwei verschieden große mRNAs von 7 kb und 10 kb (Lubahn *et al.*, 1988). Das AR-Protein besteht aus ca. 917 Aminosäuren mit einer kalkulierten molekularen Masse von 98,845 kD (Brinkmann *et al.*, 1989). Es enthält vier funktionelle Domänen (Cude *et al.*, 1999):

1. die aminoternale Transaktivierungsdomäne,
2. die DNA-Bindungsdomäne,
3. die *hinge*-Region und
4. die karboxyterminale Liganden-Bindungsdomäne (Androgenbindungsdomäne).

Die DNA-Bindungsdomäne und die Liganden-Bindungsdomäne sind beide evolutionär hoch konserviert (Quigley *et al.*, 1995). Das freie Testosteron diffundiert passiv durch die Zellmembran der Prostatazellen. Im Zytoplasma wird das Testosteron durch die 5- α -Reduktase in das Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt, das die eigentlich wirksame Substanz darstellt. Nach Bindung des DHT an den AR bildet der AR Homodimere aus (Veldscholte *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1994; Beato *et al.*, 1996). Die DNA-Bindungsdomäne des AR besitzt zwei Zinkfingerregionen, die eine Bindung an palindrome DNA-Sequenzen, die so genannten Androgen-responsiven Elemente (ARE), ermöglichen. Durch den DNA-Proteinkomplex aus ARE und AR wird zusammen mit weiteren Proteinen ein Transkriptionskomplex aufgebaut, der die Transkription des regulierten Zielgens ermöglicht.

Die vorliegende Arbeit unterstützte die Theorie zur Erlangung einer Hormonresistenz über den Weg der Reaktivierung der Androgen Signal Kaskade, da erhöhte AR Level bei HRPC mittels IHC nachgewiesen wurden. Des Weiteren wurde die Induktion von Genen identifiziert, die bei der Hormonbiosynthese beteiligt waren. Dazu gehören z. B. *SRD5A1* (steroid-5- α -reductase) und *HSD17B12* (*hydroxy steroid-17 β -dehydrogenase 12*). Dieser Zusammenhang wurde bereits bei metastasiertem HRPC nachgewiesen (Stanbrough *et al.*, 2006, Holzbeierlein *et al.*, 2004). Daraus war abzuleiten, dass Dihydrotestosteron über alternative Pathways produziert wird bzw. ähnliche Hormone wie Androstendiol den

AR aktivieren können und dadurch die substituierte Hormonblockade keine Wirkung zeigte (Mizokami *et al.*, 2004)

MYC ist ein Transkriptionsfaktor, der immer aktiviert wird, wenn eine Zelle in die S-Phase eintreten soll. Durch Mutation kann *MYC* auf zwei klassische Arten aktiviert werden:

1. Amplifikation: Amplifikation bedeutet die Vervielfältigung eines Gens. Die Auslöser und Mechanismen, die zu diesem eigenartigen Zustand führen, sind nicht geklärt. Amplifikation tritt in zwei Formen auf, die durch FISH-Analysen dargestellt werden können:

a. *Homogeneous staining regions*: In einem Chromosom tritt ein Genabschnitt auf, der ausschließlich aus aneinander gereihten Kopien des fraglichen Gens, in unserem Beispiel des *c-MYC*-Gens, besteht.

b. *Double minute chromosome* (doppelte winzige Chromosomen): Viele neue, unabhängig von den normalen Chromosomen weitergegebene genetische Einheiten treten auf, die neben den regulatorischen Abschnitten, die notwendig sind, um diese Einheit aufrecht zu erhalten, zusätzlich viele Kopien des fraglichen Gens enthalten. Die in einer dieser Formen amplifizierten *c-MYC*-Gene sind an sich normal aufgebaut; doch gibt es so viele davon, dass, wenn jedes normal funktioniert, insgesamt viel zu viel normales MYC-Protein entsteht, das die Zelle in die S-Phase treibt.

2. Translokation: Bei der klinischen Form des Burkitt-Lymphoms, eines B-Zelltumors, finden sich häufig Translokationen, die einerseits das *MYC*-Gen auf Chromosom 8, andererseits einen der drei Immunglobulinloci (Schwere Ketten auf Chromosom 14, leichte Ketten auf Chromosom 2 oder 22) betreffen. Diese Form der Translokation wird in B-Zellen dadurch erleichtert, dass die DNA an den entsprechenden Stellen im Rahmen des *rearrangements* geschnitten wird. Das normale *MYC*-Gen gerät dadurch unter den Einfluss eines *enhancers*, der eigentlich dazu da ist, eine sehr starke Expression der Immunglobulinketten zu bewirken. Resultat: normales MYC-Protein wird in viel zu großen Mengen produziert. Was für MYC gilt, gilt auch für viele andere Transkriptionsfaktoren: deren Aktivierung bedeutet meist, dass ein mehr oder weniger normal funktionierendes Protein in viel zu großen Mengen exprimiert wird.

Eine weitere mögliche Theorie zur Entstehung der Hormonresistenz gründet auf der Tatsache dass *TRAX* und *Translin* nur bei HRPC überexprimiert wird. *TRAX* Protein ist involviert in chromosomale Translokationsprozesse, Zellteilung und mRNA Transport und Lagerung. Es wird vorwiegend in Hoden und Gehirn exprimiert (Morales *et al.*, 2002). *TRAX* ist ferner ein Protein, das an Konsensussequenzen von *breakpoint junctions* bindet, das bei chromosomalen Translokationen verschiedenen lymphoiden Malignomen beschrieben wurde (Aoki *et al.*, 1995). Es wurde in der Vergangenheit ein direkter Zusammenhang zwischen *TRAX* Protein Level und Proliferationsstatus der Zelle nachgewiesen (Ishida *et al.*, 2002). Hier wurde gezeigt, dass ein hoher Proteinlevel mit einer erhöhten Proliferation einherging.

Es besteht die Möglichkeit, dass es durch Translokationen, gefördert durch einen in dieser Arbeit nachgewiesenen Hochregulierung von *TRAX*, zu quantitativen Veränderungen der Genexpression kommt, bei der Fusionsgene gebildet werden, die ein chimäres Fusionsprotein exprimieren. Es legte die Vermutung nahe, dass dieses Fusionsprotein mit gesteigerter Kinase Aktivität entsteht, da in den 101 signifikant differenziell exprimierten Gene Signalmediatoren wie *MYC*, *CDKN1A*, *HSPD1*, *TBPL1* zu finden waren und *PKA* ebenfalls, wenn auch nicht signifikant, erhöht war. Das chimäre Protein könnte durch Interaktion mit diesen Mediatoren zu einer gesteigerten AR Aktivität beitragen. Dieser Zusammenhang könnte in Zukunft mittels Chromosompainting und FISH Analysen weiter untersucht werden.

In vorliegender Arbeit war *TBP* signifikant exprimiert und bot einen möglichen Erklärungsansatz für die hormonunabhängige Transkriptionsaktivierung. Es war bekannt, dass TBP an die TATA-Box in der kleinen Furche des DNA-Doppelstrangs bindet. Diese Arbeit unterstützte die Hypothese dass TBP in Abwesenheit von weiteren Transkriptionsfaktoren Sequenz-unspezifisch an DNA bindet (Coleman *et al.*, 1995).

II. ZUSAMMENFASSUNG

Die Erforschung der Biologie maligner Tumoren beschränkte sich über lange Zeit auf die Suche nach genetischen Veränderungen. Dies hat sich in den letzten Jahren grundlegend geändert, da sich aus dem Wissen um die molekularen Veränderungen in den frühesten histomorphologisch erkennbaren Vorläuferläsionen neue Möglichkeiten zur Früherkennung und Prävention maligner Tumoren ergeben. Darüber hinaus gewinnen Aspekte zur Aufklärung des Krebs- und Progressionsrisikos zunehmend an Bedeutung. Voraussetzung für die Beantwortung dieser medizinischen und tumorbiologischen Fragestellungen war die Etablierung zielgerichteter molekularbiologischer und zytogenetischer Untersuchungsverfahren, die sich auch an Gewebeproben mit geringer Zellzahl, vor allem aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Geweben durchführen lassen. Dabei sollten, wenn möglich zeitgleich, multiple Gene in ein und derselben Zellprobe analysierbar sein. Da die individuelle Mutationsbelastung (*mutation load*) einzelner morphologisch gesunder Gewebe, als Ausdruck eines möglicherweise erhöhten Krebsrisikos, zumeist nur an Einzelzellen bestimmt werden kann, waren hier zur Untersuchung einzelner Gene weitergehend optimierte molekulargenetische Untersuchungstechniken erforderlich.

Teilprojekt – Pankreas

Das stark optimierte Untersuchungsverfahren der I-PEP-PCR wurde für die Untersuchung frühester genetischer Veränderungen, so genannter Signaturmutationen für das duktales Pankreaskarzinom, in den Genen *p16^{INK4}*, *p53*, *DPC4* an Vorläuferläsionen des duktales Pankreaskarzinoms (PanINs) aus Geweben mit duktales Metaplasien (DM) und chronischer Pankreatitis eingesetzt. Auf diese Weise sollten u.a. die ersten molekularen Stadien der Krebsentstehung bei chronischer Pankreatitis aufgeklärt werden. Diese Daten wurden durch immunhistochemische Untersuchungen der Proteinexpression oben genannter Gene und durch zytogenetische Aneuploidieanalysen in PanINs ergänzt und korreliert. Die Aneuploidie wird als ein wesentlicher Faktor bei der Initiierung eines malignen Tumors angesehen.

Die Anwendung einer optimierten PCR-Technik erfolgte an lasermikrodissezierten PanINs und DM aus 21 Geweben chronischer Pankreatitis. Es wurden Mikrosatellitenanalysen der Genloci *p16^{INK4}*, *DPC4* und *p53* durchgeführt sowie immunhistochemische Expressionsanalysen der Proteine p16, DPC4 und p53. Im Rahmen dieser wurde eine Gensequenzanalyse von *p16^{INK4}* und *p53* durchgeführt. Ergänzend wurden zytogenetische Interphase-FISH Analysen der Chromosomen 7, 8 und 17 mittels Centromerproben durchgeführt.

In Geweben chronischer Pankreatitis wurde ein Expressionsverlust des p16 Proteins in 20% der PanIN-2 und 100% der PanIN-3 nachgewiesen. Das p53 Protein zeigte eine

Überexpression in 12% der PanIN-2 und in 100% der PanIN-3, während DPC4 Protein Expressionsverlust nur in PanIN-3 Läsionen nachweisbar war.

In vorliegender Arbeit wurde mittels Mikrosatellitenanalyse in der Mehrzahl der PanINs ein LOH an nur einem Genlokus nachgewiesen. Hierbei war ein LOH des $p16^{INK4}$ Gens signifikant häufiger sowohl in PanIN-1 als auch in DM Läsionen zu finden, im Vergleich zu LOHs der $p53$ und $DPC4$ Genloci. Ein signifikanter Unterschied für das zeitliche Auftreten von $p53$ LOH und $DPC4$ LOH in PanINs wurde nicht nachgewiesen. Es konnte hingegen ein Trend einer Akkumulation multipler LOH bei steigendem Dysplasiegrad in PanINs gezeigt werden. Die Anzahl der LOH Ereignisse aller drei Tumor-Suppressor-Gene war in Geweben chronischer Pankreatitis sehr viel geringer, als in Geweben mit Pankreaskarzinom. Eine Ausnahme bildete ein Fall mit Nachweis von PanIN-3 in chronischer Pankreatitis, dort entsprach die LOH-Häufigkeit aller drei Genloci der Häufigkeit in Geweben mit duktalem Pankreaskarzinom. Im Gewebe dieses Patienten wurden mittels Gensequenzanalysen fünf Mutationen im $p16^{INK4}$ Gen nachgewiesen, davon zwei in klonaler Form und das bereits in DM und PanIN-1A. Ferner konnten Mutationen im $p53$ Gen klonal nachgewiesen werden, welche in heterozygoter Form in PanIN-1 und DM ohne gleichzeitiges LOH am $p53$ Genlokus vorlagen. Mit steigendem PanIN-Grad zeigte sich eine Akkumulation multipler Mutationen (LOH und Gensequenzänderungen), welche dann vermehrt in homozygoter Form zu finden waren. Die zytogenetischen Untersuchungen zeigten aneuploide Zellpopulationen bereits in PanIN-1 und DM, wobei die Anzahl aneuploider Zellen mit dem Grad der PanINs anstieg. Der Grad der Aneuploidie war unabhängig vom Vorliegen von Mutationen.

In vorliegender Arbeit wurde das PCR-basierte Verfahren der *whole genome amplification* (I-PEP-PCR) angewendet. Diese Prozedur ermöglichte eine molekulargenetische Analyse multipler beliebiger Gene aus mikrodisszierten Einzelzellen nach immunhistochemischer Anfärbung mit einer hohen Amplifikationseffizienz. Dies erlaubte z.B. die Erfassung eines individuellen *mutation load* über ein beliebiges Mutations-Reportergen, hier $p53$.

Eine weitere Anwendung der optimierten I-PEP-PCR Technik lag in der molekularen Analyse multipler Gene in präneoplastischen Läsionen des Pankreaskarzinoms, den PanINs. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass Mutationen in homozygoter oder heterozygoter Form in Signaturgenen für das Pankreaskarzinom wie $p53$ und $p16^{INK4}$ bereits in Geweben mit chronischer Pankreatitis nachweisbar waren, häufig vor dem Nachweis eines LOH am jeweiligen Genlokus. Ferner waren diese Mutationen auch in bisher nicht berücksichtigten Gangläsionen in chronischer Pankreatitis, den DM, nachweisbar. Im Verlauf der Karzinogenese wurden multiple Mutationen in klonaler Form in den frühesten histomorphologisch fassbaren Vorstufen des Pankreaskarzinoms gezeigt. Des Weiteren wurde in diesen frühesten Vorstufen eine bereits messbare Aneuploidie als Ausdruck einer genetischen Instabilität sichtbar, welche jedoch nicht mit dem Vorliegen von Genmutationen korrelierte.

Teilprojekt – Kolon

Das Ziel dieses Teilprojektes war, mit Hilfe der Lasermikrodissektion und der Mikroarray-Technik, aus gut charakterisiertem Tumorfrischgewebe Genexpressionsprofile zu erstellen, um so in Zukunft prädikative und prognostische Markerprofile für die untersuchten Gewebetypen zu identifizieren. Dazu wurden Expressionsprofile kolorektaler Tumorzellen von sechs Patienten mit Expressionsprofilen gesunder epithelialer Zellen des Kolon von fünf Patienten verglichen. Der Vergleich erfolgte mit Hilfe von HG-Focus-Arrays, die über 8000 humane Gene enthalten. Die Zellpopulationen wurden durch Lasermikrodissektion homogen isoliert. Es konnten signifikante Expressionsänderungen zwischen gesundem Kolongewebe und Tumorgewebe identifiziert werden. Diese unterschiedlich exprimierten Gene beinhalteten u.a. solche, die mit dem Zellzyklus, dem Metabolismus, der Signaltransduktion oder regulatorischen Prozessen assoziiert waren. Signifikant differenziell regulierte Gene wurden mittels RT-PCR Analysen bestätigt. Diese Experimente lieferten Informationen über die Karzinogenese im Kolon. Auf Basis dieser Informationen könnten zukünftige Untersuchungen aufgebaut werden, die mit höherer Proben- bzw. Patientenzahl Aufschlüsse zur Krebsentstehung in diesem Organ liefern könnten.

Es wurden RNA Gewinnungs- und Analyse-Protokolle aus unterschiedlich fixierten bzw. unfixierten Gewebeproben erstellt, die sich in der Klinikroutine anwenden lassen. Es wurde gezeigt, dass steriles Arbeiten, Lasermikrodissektion zur RNA-Gewinnung und spezielle Fixierungs- und Färbe-Methoden für Qualität und Quantität der RNA von großer Bedeutung waren.

Teilprojekt – Prostata

Durch vorangehende Etablierung von RNA Gewinnungs- und Analyse-Methoden war es in diesem Teilprojekt möglich Frischgewebeproben unterschiedlicher Entnahmeart zu vergleichen. Es wurden Gewebeproben von 20 verschiedenen Patienten aus unterschiedlichen Krankheitsstadien der Prostata mittels Mikroarray Technik untersucht: Gewebe benigner Prostatahyperplasie, hormonsensitiven Prostatakarzinomen, Prostatakarzinomen die erstmalig Hormonresistenz zeigen und Gewebe aus länger hormonresistenten Karzinomen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, a) dass die ribosomale Biosynthese bereits in PCa Tumorgewebeproben aktiviert und in hormonresistenten Prostatakarzinom Proben diese im Vergleich stark erhöht waren. Im Vergleich zu anderen terminaldifferenzierten Zellen zeigten diese erhöhte Proteinexpression. Bisher wurde in der Literatur die Regulation der Energieversorgung bei Krebszellen überwiegend über die Glykolyse beschrieben. (Rossingnol *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005). In dieser Arbeit konnte b) gezeigt werden, dass hormonresistente Prostatakarzinome ihre Energie aber vorwiegend über die oxidative Phosphorylierung regeln.

Des Weiteren wurde c) der MAPK Signalweg differenziell reguliert gefunden. In diesem Pathway steht *DUSP1*, das in HRPC als reprimiert detektiert wurde, in Wechselwirkung mit *ERK*. Ferner *STK24*, ebenfalls in HRPC reprimiert, bewirkt eine Aktivierung des p38 Signalwegs, wodurch es zu starken Entzündungsreaktionen und fortschreitender Zellproliferation kommt (Zuo et al., 2000; Brondello et al. 1999).

In vorliegender Arbeit wurde RNA aus transurethral resezierten Prostata Gewebeproben in hoher Qualität gewonnen, so war es möglich diese mit chirurgisch gewonnenen Geweben direkt zu vergleichen. Nach statistischer Untersuchung wurden d) eventuelle Markergene identifiziert, die verschiedene Signalwege betrafen. Der größte Teil der darin differenziell regulierten Gene betrafen den Zellmetabolismus, ferner die Signalwege Notch, Wnt, Phosphatidylinositol, Zellzyklus, TGF beta, MAPK, Calcium, Apoptose. Des Weiteren konnten Gene gefunden werden, die Veränderungen in Pathways der Zell-Zell Interaktionen und das Actin Zytoskelett nach sich führen könnten, was ein Hinweis auf die Metastasierungsbereitschaft, des Karzinomgewebes geben kann.

Aus dieser Arbeit ergaben sich Hinweise, e) dass es durch Chromosomen Translokationen gefördert, durch einer hier nachgewiesenen Expressierung von *TRAX*, zu quantitativen Veränderungen der Genexpression kommt, bei der Fusionsgene gebildet werden könnten, die ein chimäres Fusionsprotein bilden. Hier wurde gezeigt, dass *TBP* signifikant exprimiert war, was einen möglichen Erklärungsansatz für die hormonunabhängige Transkriptionsaktivierung bietet. Das chimäre Protein könnte durch Interaktion mit diesen Mediatoren zu einer gesteigerten AR Aktivität beitragen.

III. DANKSAGUNG

Ein besonderer Dank gilt all denen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben und somit zu deren Gelingen beigetragen haben, vor allem:

Prof. Dr. med. Josef Rüschoff für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. rer. nat. Fritz Herberg für die freundliche Übernahme dieser Arbeit gegenüber der Universität Kassel.

Im Besonderen danke ich PD Dr. med. Ernst Heinmöller für die wissenschaftliche Unterstützung bei der Bearbeitung.

Mario Baumgart für die gute Zusammenarbeit bei den FISH-Analysen.

PD Dr. med. Peter Middel und Dr. med. Nico Jost für die klinische Unterstützung des Prostata-Projektes.

Dr. rer. nat. Petra Heinmöller, Dr. rer. nat. Harald Seitz, Dr. rer. nat. Thomas Brodegger, PD Dr. Hellmuth Zöltzer und Prof. Dr. Rüdiger Grotha danke ich für viele hilfreiche Gespräche und deren stets offenes Ohr.

Allen übrigen Mitarbeitern des Institut für Pathologie des Klinikum Kassel für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, im Einzelnen: Dr. rer. nat. Dirk Zielinski, Maria Scheurer, Katja Bräutigam, Katja Wagner, Christina Karp, Ursula Hein, Sabrina Arnd, Elke Hede, Katja Pieper, Bernadett Kulcser-Obach, Marc Thiele und Max Schreiber.

Ich danke Dr. rer. nat. Anke Prinz und Mandy Diskar für Korrektur und eine Menge guter Laune.

Meinen Freundinnen Nina und Martina die immer an mich geglaubt haben.

Vor allem aber danke ich meinem Sohn Nico, der in dieser Zeit viel entbehren musste.

Ich danke Frank und meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben.

And last but not least der Liebe meines Lebens Rudi.

IV. LITERATURVERZEICHNIS

Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Jarvinen HJ: Lifetime risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer*. 64:430-433, 1995

Abel U. Bewertung diagnostischer Tests. Hippokrates Verlag, Stuttgart, 216 S., 1993

Abraham SC, Wilentz RE, Yeo CJ, Sohn TA, Cameron JL, Boitnott JK, Hruban RH: Pancreaticoduodenectomy (Whipple resections) in patients without malignancy: are they all 'chronic pancreatitis'? *Am J Surg Pathol*. 27:110-120, 2003

Abruzzo MA, Hassold TJ. Etiology of nondisjunction in humans. *Environ Mol Mutagen*, 25(Suppl 26), 38-47, 1995

Affymetrix, Mikroarray Suite, Users Guide, Version 5

Aguilar F, Hussain SP, Cerutti P: Aflatoxin B1 induces the transversion of G-->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:8586-8590, 1993

Al-Aynati MM, Overexpression of G1-S cyclins and cyclin-dependent kinases during multistage human pancreatic duct cell carcinogenesis" *Cancer Res*. 10: 6598-6605, 2004

Albertsen PC, Hanley JA, Gleason DF, Barry MJ. Competing risk analysis of men aged 55 to 74 years at diagnosis managed conservatively for clinically localized prostate cancer. *JAMA*; 280:975-80. 1998

Albertini RJ: HPRT mutations in humans: biomarkers for mechanistic studies. *Mutat Res*. 489:1-16, 2001

Albrecht W. Aktuelle Aspekte der Hormontherapie des Prostatakarzinoms. *J Urol. und Urogynäkol*. 11(2), 5-7. 2004

Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmuller L, Deppert W: Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*. 18:7706-7717, 1999

Albright SR, Tjian R. TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas *Gene*. 242, 11-13 2000

Almoguera C, Siddata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant-K-*ras* genes. *Cell*. 53:549-559, 1988

Amati B, Integrating Myc and TGF-beta signalling in cell-cycle control" *Nat Cell Biol*. 3: E112-113, 2001

Andea A, Sarkar F, Adsay VN: Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 16:996-1006, 2003

Antalis TM, Reeder JA, Down-regulation of the down-regulated in adenoma (DRA) gene correlates with colon tumor progression" *Cancer Res*. 4: 1857-1863, 1998

Apple SK, Hecht JR, Lewin DN, Jahromi SA, Grody WW, Nieberg RK: Immunohistochemical evaluation of K-ras, p53, and HER-2/*neu* expression in hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions of the pancreas: Evidence for multistep carcinogenesis. *Hum Pathol*. 30:123-129, 1999

Arents G, Burlingame RW, Wang, BC, Love, WE and Moudrianakis, EN The nucleosomal core histone octamer at 31 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 10148-10152. 1991

Arents G, Moudrianakis EN. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 11170-11174. 1995

- Arents G, Moudrianakis EN. Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 10489-10493. 1993
- Arnold MM, Srivastava S, Fredenburgh J, Stockard CR, Myers RB, Grizzle WE: Effects of fixation and tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens. *Biotech Histochem*. 71:224-230, 1996
- Arrault X, Michel V, Quillardet P, Hofnung M, Touati E. Comparison of kinetics of induction of DNA adducts and gene mutations by a nitrofuran compound, 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-b]furan (R7000), in the caecum and small intestine of Big Blue mice. *Mutagenesis*;17(4):353-9. 2002
- Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, DePinho RA: Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*. 406:641-645, 2000
- Ashcroft M, Kubbutat MH, Vousden KH: Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 19:1751-1758, 1999
- Ashida S, Nakagawa H, Katagiri T *et al*. Molecular features of the transition from prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) to prostate cancer: genome-wide gene-expression profiles of prostate cancers and PINs. *Cancer Res*; 64:5963-5972. 2004
- Attardi LD, Jacks T. The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. *Cell Mol Life Sci*. 55:48-63, 1999
- Auer H, Lyianarachchi S, Newsome D, Klisovic M, Marcucci G, Kornacker K, Marcucci U. Chipping away at the chip bias: RNA degradation in Mikroarray analysis. *Nature Genetics*.35:292–293. doi: 10.1038/ng1203-292. 2003
- Baas IO, Mulder JWR, Offerhaus GJA, Vogelstein B, Hamilton SR: An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol*. 172:5-12, 1994
- Barbera VM, Martin M, Marinoso L, Munne A, Carrato A, Real FX, Fabre M: The 18q21 region in colorectal and pancreatic cancer: independent loss of DC and DPC4 expression. *Biochim Biophys Acta*. 1502:283-296, 2000
- Bardeesy N, DePinho RA: Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer*. 2:897-909, 2002
- Barrett MT, Sanchez CA, Galipeau PC, Neshat K, Emond M, Reid BJ: Allelic loss of 9p21 and mutation of the CDKN2/p16 gene develop as early lesions during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Oncogene*. 13:1867-1873, 1996
- Bartsch D, Shevlin DW, Tung WS, Kisker O, Wells SA, Goodfellow PJ: Frequent mutations of *CDKN1* in primary pancreatic adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 14:189-195, 1995
- Bartek J, Bartkova J. The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer Exp. *Cell Res*. 237: 1-6, 1997
- Bauer KH: Mutationstheorie der Geschwulst-Entstehung. Berlin, pp 1928
- Bauer WR, Hayes JJ, White JH, Wolffe AP. Nucleosome structural changes due to acetylation *J Mol Biol*, 236, 685-690. 1994
- Bauman DR, Steckelbroeck S, Williams MV, Peehl DM, Penning TM Identification of the Major Oxidative 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Human Prostate That Converts 5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol to 5 α -Dihydrotestosterone: A Potential Therapeutic Target for Androgen-Dependent Disease. *Mol. Endocrinology* 20(2):444–458. 2006
- Bassarova AV, Popov AA: Immunohistochemical detection of p53--effect of fixation and methods of antigen retrieval. *Folia Histochem Cytobiol*. 36:127-132, 1998

- Beck JC, Kim CH, Hoover ML, Mulivor RA: Whole genome amplification of genomic DNA: Implications for multiple analyses of tumour samples. *Proc Am Asso Cancer Res.* 37:570, 1996
- Beger C, Ramadani M, Meyer S, Leder G, Kruger M, Welte K, Gansauge F, Beger HG: Down-regulation of BRCA1 in chronic pancreatitis and sporadic pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 10:3780-3787, 2004
- Becker I, Becker KF, Röhl M, Minkus G, Schütze K, Höfler H: Single-cell mutation analysis of tumors from stained histologic slides. *Lab Invest.* 75:801-807, 1996
- Beltinger CP, Klimek F, Debatin KM: Whole genome amplification of single cells from clinical peripheral blood smears. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 50:272-275, 1997
- Bender P, Hoover M, Byar J, Leonhard J, Beck JC: Representative whole genome amplification. *Am J Hum Genet.* 60 (suppl) A231, 1997
- Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A: Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem.* 39:351-354, 1991
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B*;57:289-300. 1995
- Berger DH, Chang H, Wood M, Huang L, Heath CW, Lehmann T, Ruggeri BA: Mutational activation of K-ras in nonneoplastic exocrine pancreatic lesions in relation to cigarette smoking status. *Cancer.* 85:326-332, 1999
- Berns K., Hijmans E. M., "A genetic screen to identify genes that rescue the slow growth phenotype of c-myc null fibroblasts" *Oncogene* 19: 3330-3334, 2000
- Bernsen MR, Dijkman HB, de Vries E, Figdor CG, Ruiters DJ, Adema GJ, Muijen GN: Identification of mRNA and DNA sequences from small tissue samples isolated by laser-assisted microdissection. *Lab Invest.* 78:1267-1273, 1998
- Best CJM, Gillespie JW, Yi Y *et al.* Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy. *Clin Cancer Res.* 11:6823-6834. 2005
- Bialy, H.,. Aneuploidy and cancer>=the vintage wine revisited. *Nat Biotechnol*, 19(1), 22-23. 2001
- Biankin AV, Kench JG, Morey AL, Lee CS, Biankin SA, Head DR, Hugh TB, Henshall SM, Sutherland RL: Overexpression of p21(WAF1/CIP1) is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res.* 61:8830-8837, 2001
- Biankin AV, Kench JG, Biankin SA, Lee CS, Morey AL, Dijkman FP, Coleman MJ, Sutherland RL, Henshall SM: Pancreatic intraepithelial neoplasia in association with intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: implications for disease progression and recurrence. *Am J Surg Pathol.* 28:1184-1192, 2004
- Bielas JH, Loeb LA. Mutator phenotype in cancer: Timing and perspectives. *Environ Mol Mutagen.* 2005 Jan 25 (online)
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW: Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 91, 25-34. 1997
- Blomberg I, Hoffmann I, Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A dependent kinases" *Mol. Cell Biol.* 19: 6183-6194, 1999
- Bocsi J, Zalutnai A: Establishment and long-term xenografting of human pancreatic carcinomas in immunosuppressed mice: changes and stability in morphology, DNA ploidy and proliferation activity. *J Cancer Res Clin Oncol.* 125:9-19, 1999
- Bohmig M, Wiedenmann B., Rosewicz S. [Therapy of pancreatic adenocarcinoma] *Therapie des Pankreasadenokarzinoms.* *Med Klin* 94, 614-625 1999

- Bolstad BM, Irizarry RA, A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias" *Bioinformatics* 19: 185-93, 2003
- Bouchard C, Thieke K., Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27" *Embo J.* 18: 5321-5333, 1999
- Bouchard C, Dittrich O, Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter *Genes*: 2042-2047, 2001
- Boveri T: Zur Frage der Entstehung maligner Tumore. Gustav Fischer Jena. 1914
- Brat DJ, Lillemoe KD, Yeo CJ, Warfield PB, Hruban RH: Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Surg Pathol.* 22:163-169, 1998
- Bratt O, Damber JE, Emanuelsson M, Kristoffersson U, Lundgren R, Olsson H, Gronberg H. Risk perception, screening practice and interest in genetic testing among unaffected men in families with hereditary prostate cancer. *Eur J Cancer.* (2):235-41. 2000
- Breivik J: The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. *Semin Cancer Biol.* 15:51-60, 2005
- Brentnall TA, Chen R, Lee JG, Kimmey MB, Bronner MP, Haggitt RC, Kowdley KV, Hecker LM, Byrd DR: Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. *Cancer Res.* 55:4246-4267, 1995
- Brockie E, Anand A, Albores-Saavedra J: Progression of atypical ductal hyperplasia/carcinoma *in situ* of the pancreas to invasive adenocarcinoma. *Ann Diagn Pathol.* 2:286-292, 1998
- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, *et al.* Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature.* 368(6468):258-61. 1994
- Brown PO, Botstein D, Exploring the new world of the genome with DNA Mikroarrays" *Nature* 21: 33-37, 1999
- Bunz F, Fauth C, Speicher MR, Dutriaux A, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C: Targeted inactivation of p53 in human cells does not result in aneuploidy. *Cancer Res.* 62:1129-11, 2002
- Burley SK, Roeder RG. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem,* 65, 769-799. 1996
- Byeon MK, Westerman MA, The down-regulated in adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane glycoprotein" *Oncogene* 12: 387-396 1996
- Byeon MK, Frankel A, Human DRA functions as a sulfate transporter in Sf9 insect cells" *Protein Expr. Purif.* 12: 67-74, 1998
- Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. The Breast Cancer Linkage Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 91:1310-1316, 1999
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B: Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature.* 392:300-303, 1998
- Caldas C, Hahn SA, da Costa LT: Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic carcinoma. *Nat Genet,* 8:27-32. 1994
- Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W, Rutter JL, Buckler A, Gabrielson E, Tockman M, Cho KR, Hedrick L, Bova GS, Isaacs W, Koch W, Schwab D, Sidranski D: Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genetics.* 11:210-212, 1995
- Carstensen JM, Bygren LO, Hatschek T. Cancer incidence among Swedish brewery workers. *Int J Cancer.* 45(3):393-6. Review. 1990

- Castro MA, Onsten TT, de Almeida RM, Moreira JC: Profiling cytogenetic diversity with entropy-based karyotypic analysis. *J Theor Biol*;234:487-495. 2005
- Chen RH, Su YH, Chuang RL, Chang TY. Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene*. 17(15):1959-68 1998
- Chisoe SL; Bodenteich A; Wang YF; Wang YP; Burian D; Clifton SW; Crabtree J; Freeman A; Iyer K; Jian L. Sequence and analysis of the human ABL gene the BCR gene and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics*, 1, 27, 67-82. 1995
- Chodak GW, Thisted RA, Gerber GS *et al.* Results of conservative management of clinically localized prostate cancer. *N Engl. J Med.*;330:242-8. 1994
- Choi JK, Yu U, Yoo OJ, Kim S. Differential coexpression analysis using Mikroarray data and its application to human cancer. *Bioinformatics*; 21:4348-4355. 2005
- Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS: Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med*. 339:65-658, 1998
- Cole J, Skopek TR : International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Working paper no. 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population *in vivo*. *Mutat Res*. 304, 33-105, 1994
- Coleman RA, Pugh BF Evidence for functional binding and stable sliding of the TATA binding protein on nonspecific DNA. *J Biol Chem*, 270, 13850-13859. 1995
- Coleman RA, Pugh BF. Slow dimer dissociation of the TATA binding protein dictates the kinetics of DNA binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 7221-7226. 1997
- Coleman RA, Taggart AK, Benjamin LR, Pugh BF. Dimerization of the TATA binding protein. *J Biol Chem*, 270, 13842-13849. 1995
- Coleman RA, Taggart AK, Burma S, Chicca J, Pugh BF. TFIIA regulates TBP and TFIID dimmers. *Mol Cell*, 4, 451-457. 1999
- Coller H., Grandori C, Expression analysis with oligonucleotide Mikroarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion" *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3260-3265, 2000
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*;65:10946-10951. 2005
- Collins K, Mitchell JR:Telomerase in the human organism. *Oncogene*, 21, 564-579. 2002
- Comfort MW, Steinberg AG: Pedigree of a family with hereditary chronic relapsing pancreatitis. *Gastroenterology*. 21:54-63, 1952
- Cooper JP, Roth SY, Simpson RT. The global transcriptional regulators, SSN6 and TUP1, play distinct roles in the establishment of a repressive chromatin structure. *Genes Dev*, 8, 1400-1410. 1994
- Coppola D, Szabo M, Boulware D, Muraca P, Alsarraj M, Chambers AF and Yeatman TJ. Correlation of Osteopontin Proteinexpression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clin Cancer Res*, 10(1):184-19. 2004
- Contentin L, Pages P, Bouisson M, Berthelemy P, Buscail L, Escourrou J, Pradayrol L, Vaysse N: Frequent deletions of tumor suppressor genes in pure pancreatic juice from patients with tumoral or nontumoral pancreatic diseases. *Pancreatology*. 2:17-25, 2002
- Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL A mechanism for hormone-independent prostate cancer through odulation of androgen receptor signalling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nature Med*;5:280-285. 1999

- Cramer P, Bushnell DA, Fu J, Gnatt AL, Maier DB, Thompson NE, Burgess RR, Edwards AM, David PR, Kornberg RD. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*, 288, 640-649. 2000
- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P and Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*, 18:2883-2891. 1999
- Cress RD, Yin D, Clarke L, Bold R, Holly EA. Survival Among Patients with Adenocarcinoma of the Pancreas: A Population-based Study *Cancer Causes and Control*. 17:4, 403-409. 2006
- Cubilla AL, Fitzgerald PJ. Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. *Cancer Res*. 36:2690:2698, 1976
- Cubilla AL, Fitzgerald PJ. Tumors of the exocrine pancreas. Armed Forces Institute of Pathologie, Washington DC, 1984
- Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV *et al.* Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-1, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res*;54:5474-5478. 1994
- Dahmus ME. Phosphorylation of mammalian RNA polymerase II. *Methods Enzymol*. 273, 185-193. 1996a
- Dahmus ME. Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem*, 271, 19009-19012. 1996b
- Darnton SJ, Jenner K: Microwave irradiation lowers immunohistological detection thresholds for p53 protein in squamous epithelium from non-neoplastic oesophagus. *J Pathol*. 185:334-335, 1998
- Davidoff AM, Humphrey PA, Iglehart JD, Marks JR: Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:5006-5010, 1991
- Dai JL, Turnacioglu KK, Schutte M, Sugar AY, Kern SE: Dpc4 transcriptional activation and dysfunction in cancer cells. *Cancer Res*. 58:4592-4597, 1998
- Dang CV, c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and Metabolism *Mol Cell Biol*. 19: 1-11, 1999
- Day JD, Diguseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN, Kern SE, Hruban RH: Immunohistochemical evaluation of Her-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol*. 27:119-124, 1996
- Deb S, Jackson CT, Subler MA, Martin DW: Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. *J Virol*. 66:6164-6170, 1992
- Delaval B, Ferrand A, Conte N *et al.* Aurora B-TACC1 protein complex in cytokinesis. *Oncogene*; 23:4516 – 4522. 2004
- Dellarco, V. L., Mavournin, K. H. und Tice, R. R.,. Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions. *Environ Mutagen*, 7(3), 405-424. 1985
- Derynck R, Zhang Y, Feng X-H: Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell*, 95:737-740. 1998
- Dhanasekaran SM, Barette TR, Ghosh D *et al.* Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*; 412:822-826. 2001
- DiGiuseppe JA, Hruban RH, Offerhaus GJ, Clement MJ, van den Berg FM, Cameron JL, van Mansfeld AD: Detection of K-ras mutations in mucinous pancreatic duct hyperplasia from a patient with a family history of pancreatic carcinoma. *Am J Pathol*. 144:889-895, 1994

- Dietmaier W, Hartmann A, Wallinger S, Heinmöller E, Kerner T, Endl E, Jauch KW, Hofstädter F, Rüschoff J. Multiple mutation analyses in single tumor cells enabled by improved whole genome amplification. *Am J Pathol.* 154: 83-95, 1999
- Dietrich C., *Zellzyklus und Krebs Medizinische Monatschrift* 3: 69-75, 1998
- Ding L, Zheng S and Cao J. Expression of Osteopontin mRNA and its protein in colorectal cancer and liver metastatic tissues. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (China)* 2002, 82(14):970-973). 2002
- Dowell SP, Ogden GR: The use of antigen retrieval for immunohistochemical detection of p53 over-expression in malignant and benign oral mucosa: a cautionary note. *J Oral Pathol Med.* 25:60-64, 1996
- Draws J. Quo vadis, biotech? (Part 1). *Drug Discov Today.* 5(12):547-553. 2000
- Duddy SK, Gorospe S, Bleavins MR: Genetic analysis of multiple loci in microsamples of fixed paraffin-embedded tissue. *Toxicol Sci.* 46:317-323, 1998
- Duesberg P, Fabarius A, Hehlmann R. Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life.* 56:65-81, 2004
- Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R. The chromosomal basis of cancer. *Cell Oncol.;*27(5-6):293-318. 2005
- Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R. Orders of magnitude change in phenotype rate caused by mutation. *Cell Oncol.;*29(1):71-2. 2007
- Dynlacht BD, Hoey T, Tjian R. Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell,* 66, 563-576. 1991
- Eick D, Wedel A, Heumann H. From initiation to elongation: comparison of transcription by prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases. *Trends Genet,* 10, 292-296. 1994
- Eilers M, Schirm S, "The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene" *Embo J.* 10: 133-141, 1991
- El-Hashemite N; Delhanty JDA; A technique for eliminating allele specific amplification failure during DNA amplification of heterozygous cells for preimplantation diagnosis. *Mol Hum Reprod.* 3:975-978, 1997
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA: Laser capture microdissection. *Science* 274:998-1001, 1996
- Erard MS, Belenguer PA, "Major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1" *Eur. J. Biochem.* 175: 525-530, 1988.
- Etemad B, Whitcomb DC: Chronic pancreatitis: Diagnosis, classification and new genetic developments. *Gastroenterology.* 120:682-707, 2001
- Evan GI, Vousden KH: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 411:342-348, 2001
- Fabarius A., Hehlmann R., Duesberg P. Instability of chromosome structure increases exponentially with degrees of aneuploidy. *Cancer Genet. Cytogenet.* 143, 59-72, 2003.
- Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell.* 61:759-767, 1990
- Feldser DM, Hackett JA Greider CW, Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. *Nat Rev Cancer.* 3:623-627, 2003
- Feldman M, Boland CR, *The Comprehensive Visual Reference, Colon, Rectum and Anus Gastroenterology and Hepatology, Volume 2,* 1992
- Feldman BJ, Feldman D, "The Development of androgen-independent Prostate cancer" *Nature* 1: 34-45, 2001

- Fernandez PC, Frank SR, Amati B., Genomic targets of the human c-Myc protein *Genes Dev.* 17: 1115-1129, 2003
- Findlay I, Ray P, Quirke P, Rutherford A, Lilford R: Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis. *Mol Hum Reprod.* 10:1609-1618, 1995.
- Findlay I, Matthews P, Quirke P: Multiple genetic diagnoses from single cells using multiplex PCR: reliability and allele dropout. *Prenat Diagn.* 18:1413-1421, 1998
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell.* 75(5):1027-38. 1993 Erratum in: *Cell.* 77(1):167. 1994
- Fishel R. Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes Dev.* 12(14):2096-101. Review. 1998
- Fishel R. The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. *Cancer Res.* 61(20):7369-74. Review. 2001
- Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* (1):55-67. Review. 2001
- Forrester K, Lupold SE, Ott VL, Chay CH, Band V, Wang XW, Harris CC: Effects of p53 mutants on wild-type p53-mediated transactivation are cell type dependent. *Oncogene.* 10:2103-2111, 1995
- Fromont G, Chene L, Differential expression of 37 selected genes in hormone-refractory prostate cancer using quantitative taqman real-time RT-PCR" *Int. J. Cancer* 114:174-81, 2005
- Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M: Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 160:1573-1581, 2002
- Furukawa T, Chiba R, Kobari M, Matsuno S, Nagura H, Takahashi T: Varying grades of epithelial atypia in the pancreatic ducts of humans. Classification based on morphometry and multivariate analysis and correlated with positive reactions of carcinoembryonic antigen. *Arch Pathol Lab Med.* 118:227-234, 1994
- Furuya N, Kawa S, Akamatsu T, Furihata K: Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis and K-ras gene mutation detected in pancreatic juice. *Gastroenterology.* 113:593-598, 1997
- Galaktionov K, Chen X, Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc" *Nature* 382: 511-517, 1996
- Gansauge S, Schmid RM, Muller J, Adler G, Mattfeldt T, Beger HG: Genetic alterations in chronic pancreatitis: evidence for early occurrence of p53 but not K-ras mutations. *Brit J Surg.* 85:337-340, 1998
- Garvin AM, Holzgreve W, Hahn S: Highly accurate analysis of heterozygous loci by single cell PCR. *Nucleic Acids Res.* 26:3468-3472, 1998
- Geiger JH, Hahn S, Lee S, Sigler PB. Crystal structure of the yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Science,* 272, 830-836. 1996
- Gentleman RC, Carey VJ, Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics" *Genome Biol.* 5: R80, 2004
- Gerdes B, Ramaswamy A, Kersting M, Ernst M, Lang S, Schuermann M, Wild A, Bartsch, DK: P16INK4a alterations in chronic pancreatitis – indicator for high-risk lesions for pancreatic cancer. *Surgery.* 129:490-497, 2001

- Ghadimi BM, Schröck E, Walker RL, Wangsa D, Jauho A, Meltzer P, Ried T: Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator in pancreatic carcinomas. *Am J Pathol.* 154:525-536, 1999a
- Ghadimi BM, Heselmeyer-Haddad K, Auer G, Ried T: Interphase cytogenetics: at the interface of genetics and morphology. *Anal Cell Pathol* 19:3-6, 1999b
- Ghadimi BM, Sackett D, Schröck E, Jauho A, Neumann T, Difilippantonio M, Spector DL, Auer G, Ried T: Centrosome instability occurs in aneuploid, but not in diploid colorectal carcinomas and induces numerical chromosomal aberrations. *Gen Chrom Cancer* 27:183-190, 2000
- Ghadimi BM, Uhr J, Tucker T, Heselmeyer-Haddad K, Auer G, Ried T, Becker H: Interphase cytogenetics with DNA-probes for chromosome 8 to detect circulating tumor cells in breast cancer patients. *Zentralbl Chir.* 126:922-5, 2001
- Giovannucci 1993
- Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol.* (1):58-64. 1974
- Globocan 2000, Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide" www-depdb.iarc.fr/globocan2002
- Goeman JJ, Oosting J, Cleton-Jansen AM, Anninga, JK, van Houwelingen HC. A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics*;201:93-99. 2004
- Goessl C, Muller M, Heicappell R *et al.* DNA-based detection of prostate cancer in urine after prostatic massage. *Urology*; 58:335-338. 2001
- Goggins M Hruban RH, Kern SE: BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol.* 156:1767-1771, 2000
- Goike HM, Asplund AC, Pettersson EH, Liu L, Sanoudou D, Collins VP: Acquired rearrangement of an amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in a human glioblastoma xenograft. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58:697-701, 1999
- Goldstein DB. Pharmacogenetics in the laboratory and the clinic. *N Engl J Med.* 348(6):553-6. 2003
- Gorunova L, Johansson B, Dawiskiba S, Andren-Sandberg A, Yin Y, Mandahl N, Heim S, Mitelman F: Massive cytogenetic heterogeneity in a pancreatic carcinoma: Fifty-four karyotypically unrelated clones. *Genes Chromosomes Cancer.* 14:259-266, 1995
- Gorunova L, Höglund M, Andren-Sandberg A, Dawiskiba S, Jin Y, Mitelman F, Johansson B: Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: Intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations. *Genes Chromosomes Cancer.* 23:81-99, 1998
- Goss Tusher V, Tibshirani R, Significance analysis of Mikroarrays applied to the ionizing radiation response" *PNAS* 98: 5116-121, 2001
- Graff JR, Konicek BW, McNulty AM, Wang Z, Houck K, Allen S, Paul JD, Hbaliu A, Goode RG, Sandusky GE, Vessella RL, Neubauer BL. Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem.* ;275(32):24500-5. 2000
- Grant PA, Duggan L, Cote J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, Ohba R, Owen HT, Allis CD, Winston F, Berger SL, Workman JL. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev,* 11, 1640-1650. 1997
- Grant PA, Eberharter A, John S, Cook RG, Turner BM, Workman JL. Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem,* 274, 5895-5900. 1999

- Grant PA, Schieltz D, Pray GM, Steger DJ, Reese JC, Yates Jr, Workman JL. A subset of TAF (II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell*, 94, 45-53. 1998a
- Grant PA, Sterner DE, Duggan LJ, Workman JL, Berger SL. The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin-modifying complexes. *Trends Cell Biol*, 8, 193-197. 1998b
- Grasl-Kraupp B, Bursch W, Ruttkay-Nedecky B, Wagner A, Lauer B, Schulte-Hermann R: Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Carcinogenesis*, 21:1411-1421 2000
- Greenblatt MS, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*. 54:4855-4878, 1994
- Gregori A, Vieweg J, Dahm P, Paulson DF. Comparison of ultrasound-guided biopsies and prostatectomy specimens: predictive accuracy of Gleason score and tumor site. *Urol Int.*;66(2):66-71 2001
- Grigorova M, Staines JM, Ozdag H, Caldas C, Edwards PA: Possible causes of chromosome instability: comparison of chromosomal abnormalities in cancer cell lines with mutations in BRCA1, BRCA2, CHK2 and BUB1. *Cytogenet Genome Res*. 104:333-340, 2004
- Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet*; 361:859-864. 2003
- Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389, 349-352. 1997
- Gregory CW, He B, Johnson RT *et al.* A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res*; 61:4315-4319. 2001
- Gupta PK; Sahota A; Boyadjiev SA; Bye S; Shao C; O'Neill JP; Hunter TC; Albertini RJ; Stambrook PJ; Tischfield JA. High frequency *in vivo* loss of heterozygosity is primarily a consequence of mitotic recombination. *Cancer Res*, 6, 57, 1188-93. 1997
- Hachiya M, Chumakov A, Miller CW, Akashi M, Said J, Koeffler HP: Mutant p53 proteins behave in a dominant, negative fashion *in vivo*. *Anticancer Res*. 14:1853-1859, 1994.
- Hah WC, Meyerson M., Telomerase activation, cellular immortalization and cancer *Ann. Med.* 33: 123-9, 2001
- Hahn S, Garvin AM, Di Naro E, Holzgreve W: Allele drop-out can occur in alleles differing by a single nucleotide and is not alleviated by preamplification or minor template increments. *Genetic testing*. 2:351-355, 1998
- Hahn S, Zhong XY, Troeger C, Burgemeister R, Gloning K, Holzgreve W: Current applications of single-cell PCR. *Cell Mol Life Sci*. 57:96-105, 2000
- Hahn SA, Seymour AB, Shamsul Hoque ATM, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, Caldas C, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE: Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. *Cancer Res*. 55:4670-4675, 1995
- Hahn SA, Shamsul Hoque ATM, Moskaluk CA, Da Costa LT, Schutte M, Rozenblum E, Seymour AB, Weinstein CL, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE: Homozygous deletions map at 18q21.1 in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 56:490-494, 1996a
- Hahn SA, Schutte M, Shamsul Hoque ATM, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE: DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*. 271:350-353, 1996b
- Hahn SA, Kern SE, Schmiegel WH. Neue molekularbiologische Erkenntnisse aus: der Pankreaskarzinom- Forschung Diagnostische und therapeutische Perspektiven. *Dt Arztebl*; 94: A-3342-3350. 1997

- Hahn SA, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B, Gerdes B, Kress R, Ziegler A, Raeburn JA, Campra D, Grutzmann R, Rehder H, Rothmund M, Schmiegel W, Neoptolemos JP, Bartsch DK: BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 95:214-221, 2003
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA.. Creation of human tumour cells with deoned genetic elements. *Nature*, 400(6743), 464-468. 1999
- Hainaut P, Hollstein M: p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res.* 77:81-137, 2000
- Hamiche A, Sandaltzopoulos R, Gdula DA, Wu C. ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. *Cell*, 97, 833-842. 1999
- Hammacher A, Thompson EW, Williams, ED. Interleukin-6 is a potent inducer of S100P, which is up-regulated in androgen-refractory and metastatic prostate cancer. *Int J Biochem Cell Biol*;37:442-450. 2005
- Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y: Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res.* 53:5087-5089, 1993
- Hanahan D, Folkman J., Patterns and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis" *Cell* 86: 353-64, 1996
- Hanna RW, Hansen U. Active repression mechanisms of eukaryotic transcription repressors *Trends. Genet*, 12, 229-234. 1996
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW. Identification of c-Myc as a target of the APC pathway. *Science* (1998), 281:1509-1512. 1998
- Heddle JA, Dean S, Nohmi T, Boerrigter M, Casciano D, Douglas GR, Glickman BW, Gorelick NJ, Mirsalis JC, Martus HJ Skopek TR, Thybaud V, Tindall KR, Yajima N: In vivo transgenic mutation assays. *Environ Mol Mutagen.* 35:253-259, 2000
- Heddle JA, Dean S, Nohmi T, Boerrigter M, Casciano D, Douglas GR, Glickman BW, Gorelick NJ, Mirsalis JC, Martus HJ, Skopek TR, Thybaud V, Tindall KR, Yajima N. In vivo transgenic mutation assays. *Environ Mol Mutagen.* 35(3):253-92000
- Heinmöller E, Dietmaier W, Zirngibl H, Heinmöller P, Scaringe W, Jauch KW, Hofstädter F, Rüschoff J: Molecular analysis of microdissected tumors and preneoplastic intraductal lesions in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol.* 157:83-92, 2000
- Heinmöller E, Qiang L, Sun Y, Schlake G, Hill KA, Weiss LM and Sommer SS: Toward efficient analysis of mutations in single cells from ethanol-fixed, paraffin-embedded, and immunohistochemically-stained tissues, *Lab Invest.* 82: 443-453, 2002a.
- Heinmöller E, Schlake G, Renke B, Liu Q, Hill KA, Sommer SS, Rüschoff J. Microdissection and molecular analysis of single cells or small cell clusters in pathology and diagnosis – significance and challenges. *Anal Cell Pathol.* 24:125-134, 2002b
- Heldin CH, Miyazono P, ten Dijke P: TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 390:465-471, 1997
- Hempfen PM, Kurpad H, Calhoun ES, Abraham S, Kern SE: A double missense variation of the BUB1 gene and a defective mitotic spindle checkpoint in the pancreatic cancer cell line Hs766T. *Hum Mutat.* 21445-450, 2003
- Hengartner CJ, Myer VE, Liao SM, Wilson CJ, Koh SS, Young RA. Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell*, 2, 43-53. 1998
- Hengartner CJ, Thompson CM, Zhang J, Chao DM, Liao SM, Koleske AJ, Okamura S, Young RA. Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev*, 9, 897-910. 1995

- Hennig, Genetik" Springer Verlag, 3.Auflage, Berlin 2002
- Herris CC, Hollstein M: Clinical implications of the p53 tumor-suppressor-gene. *New Engl J Med*, 329:1318-1327. 1993
- Hermanek P. 1992 tumor classification/developments. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 40-5. German. 1992
- Hessels D, Verhaegh GW, Schalken JA, Witjes JA. Applicability of biomarkers in the early diagnosis of prostate cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.*; 4:513-526. 2004
- Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, DePinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma *Genes & Dev.* 20: 1218-1249. 2006
- Hilgers W, Song JJ, Haye M, Hruban RH, Kern SE, Fearon ER: Homozygous deletions inactivate DCC, but not MADH4/DPC4/SMAD4, in a subset of pancreatic and biliary cancers. *Genes Chromosomes Cancer.* 27:353-357, 2000
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B. p53 mutations in human cancers. *Science*, 253:49-53. 1991
- Holzbeierlein J, Lal P, LaTulippe E *et al.* Gene Expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance. *Am J Pathol*; 164:217-227. 2004
- Hoopes BC, LeBlanc JF, Hawley DK. Kinetic analysis of yeast TFIID-TATA box complex formation suggests a multi-step pathway. *J Biol Chem*, 267, 11539-11547. 1992
- Hosseini R, Sauer-Eppel H, Jonas D, Oremek GM c-PSA in der Routinediagnostik der Prostataerkrankung *Aktuel Urol*; 37. 2006
- Howe JR, Mitros FA, Summers RW. The risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis. *Ann Surg Oncol.*; 5(8):751-6. Review. 1998
- Howes N, Greenhalf W, Neoptolemos J: Screening for early pancreatic ductal adenocarcinoma in hereditary pancreatitis. *Med Clin North Am.* 84: 719-738, 2000
- Hruban H, AdsayV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJA. Pancreatic intraepithelial neoplasia. A new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol.* 25:579-586, 2001
- Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T, Goggins M, Kato Y, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Maitra A, Offerhaus GJ, Shimizu M, Yonezawa S: An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 28:977-987, 2004
- Huang L, Goodrow TL, Zhang SY, Klein-Szanto AJP, Chang H, Ruggeri BA: Deletion and mutation analyses of the *p16/MTS-1* tumor suppressor gene in human ductal pancreatic cancer reveals a higher frequency of abnormalities in tumor-derived cell lines than in primary ductal adenocarcinomas. *Cancer Res.* 56:1137-1141, 1996
- Hulst SPL: Zur Kenntnis der Genese des Adenokarzinoms und Karzinoms des Pankreas. *Virchows Arch.* 180:288-316, 1905
- Hussain SP, Amstad P, Raja K, Ambs S, Nagashima M, Bennett WP, Shields PG, Ham AJ, Swenberg JA, Marrogi AJ, Harris CC: Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res.* 60:3333-3337, 2000.
- Hussain SP, Amstad P, Raja K, Sawyer M, Hofseth L, Shields PG, Hewer A, Phillips DH, Ryberg D, Haugen A, Harris CC: Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer Res.* 61:6350-6355, 2001

- Huusko P, Castren K, Launonen V, Soini Y, Pääkkönen K, Leisti J, Vähäkangas K, Winqvist R: Germline *TP53* Mutations in finnish cancer families exhibiting features of the Li-Fraumeni syndrome and negative for *BRCA1* and *BRCA2*. *Cancer Genet Cytogenet.* 112:9-14, 1999
- Ikeda M, Orimo H, Moriyama H, Nakajima E, Matsubara N, Mibu R, Tanaka N, Shimada T, Kimura A, Shimizu K. Close correlation between mutations of *E2F4* and *hMSH3* genes in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res*, 58(4):594-8. 1998
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Research.* 33:e56. doi: 10.1093/nar/gni054. 2005
- Inostroza JA, Mermelstein FH, Ha I, Lane WS Reinberg D. Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell*, 70, 477-489. 1992
- Irizarry RA, Hobbs B, Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data" *Biostatistics* 4: 249-64, 2003
- Irizarry RA, Bolstad BM, Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data" *Nucleic Acids Res.* 31: e15, 2003
- Isaacs JT. The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop? *Urol Clin North Am*; 26:263-273. 1999
- Isabel S., Zielgene des Proto-Onkogens *c-myc*: Von der genomweiten Analyse zur ribosomalen RNA-Prozessierung Dissertation Universität München, 2003
- Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S, Nakaizumi A, Uehara H, Kitamura T, Kuroda C. Minute carcinoma of the pancreas measuring 1 cm or less in diameter--collective review of Japanese case reports. *Hepatogastroenterology.* 46:8-15, 1999
- Jackman RJ, Mayo CW. The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg Gynecol Obstet.* 93(3):327-30. 1951
- Jaeger U; Karth GD; Knapp S; Friedl J; Laczika K; Kusec R. Molecular mechanism of the t(14;18)--a model for lymphoid-specific chromosomal translocations. *Leuk Lymphoma*, 3-4, 14, 197-202. 1994
- Jass JR. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am.*; 82(5):891-904. Review. 2002
- Jatzko G, Herbst F, Koloraktales Karzinom www.aco.at
- Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin.* 53:5-26, 2003
- Johnson EM, A new member of the MCM protein family encoded by the human *MCM8* gene, located contrapodal to *GCD10* at chromosome band 20p12.3-13" *Nucleic Acids Res.* 31: 2915-25, 2003
- Johnson AD. The price of repression. *Cell*, 81, 655-658. 1995
- Kalthoff H, Schmiegel W, Roeder C: p53 and K-RAS alterations in pancreatic epithelial cell lesions. *Oncogene*, 8:289-298. 1993
- Kern S, Hruban R, Hollingsworth MA; Brand R, Adrian TE, Jaffee E, Tempero MA. A white paper: The product of a pancreas cancer think tank. *Cancer Res.* 61:4923-4932, 2001
- Kim JL, Nikolov DB, Burley SK. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature*, 365, 520-527. 1993
- Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature.* 386(6627):761, 763. 1997

- Kitahara O, Alterations of Gene Expression during Colorectal Carcinogenesis Revealed by cDNA Mikroarrays after Laser-Capture Microdissection of Tumor Tissues and Normal Epithelia" *Cancer Res.* 61:3544-9, 2001
- Klein C, Struhl K. Increased recruitment of TATA-binding protein to the promoter by transcriptional activation domains *in vivo*. *Science*, 266, 280-282. 1994
- Klöpffel G, Solcia E, Longnecker DS, Capela C, Sobin LH: Histological typing of tumours of the exocrine pancreas. WHO International Histological Classification of Tumours. Second Edition 1996. Springer: Berlin, Heidelberg, New York
- Klöpffel G, Sipos B, Lüttges J: Das Spektrum der chronischen Pankreatitis. Auf dem Weg zur ätiologischen Klassifikation. *Pathologie*. 26(1):59-66, 2005
- Kobayashi N, Boyer TG, Berk AJ. A class of activation domains interacts directly with TFIIA and stimulates TFIIA-TFIID-promoter complex assembly. *Mol Cell Biol*, 15, 6465-6473. 1995
- Königsmann E. Die Krebszellen aushungern. LivingBridges 2004
- Koh TJ, Bulita CJ, Fleming JV, Dockray GJ, Varro A and Wang TC. Gastrin is a target gene of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *J Clin Invest*, 106:533-9. 2000
- Kozuka S, Sassa R, Taki T, Masamoto K, Nagasawa S, Saga S, Hasegawa K, Takeuchi M: Relation of pancreatic duct hyperplasia to carcinoma. *Cancer*. 43:1418-1428, 1979
- Kuska B: Pancreatic cancer research: Putting all their ducts in a row. *J Natl Cancer Inst.* 91:1532-1534, 1999
- Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D, Ebricht RH. New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev*, 12, 34-44. 1998
- Lagrange T, Kim TK, Orphanides G, Ebricht YW, Ebricht RH Reinberg D. High-resolution mapping of nucleoprotein complexes by site-specific protein-DNA photocrosslinking: organization of the human TBP-TFIIA-TFIIB-DNA quaternary complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 10620-10625. 1996
- Längst G, Bonte EJ, Corona DF, Becker PB. Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer *Cell*, 97, 843-852. 1999
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, *CA Cancer J Clin.* 49:8-31, 1999
- Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16. 1992
- Langbein S, Zerilli M, zur Hausen A, Staiger W, Rensch-Boschert K, Lukan N, Popa J, Ternullo MP, Steidler A, Weiss C, Grobholz R, Willeke F, Alken P, Stassi G, Schubert P and Coy JF. Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *British Journal of Cancer*, 1 –8. 2006
- Lasorella A., Nosedà M., Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins" *Nature* 407: 592-598, 2000
- LaTulippe, E, Satagopan J, Smith A *et al.* Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Res*;62:4499-4506. 2002
- Lawrie LC, Dundas SR, Curran S and Murray GI. Liver fatty binding protein expression in colorectal neoplasia. *Br J Cancer* (2004), 90(10):1955-1960. 2004
- Lee D, Lis JT. Transcriptional activation independent of TFIIH kinase and the RNA polymerase II mediator *in vivo* *Nature*, 393, 389-392. 1998
- Lee S, Elenbaas B, Levine A, Griffith J: p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell*. 81:1013-1020, 1995

- Lee SO, Lou W, Johnson CS, Trump DL, Gao AO. Interleukin-6 protects LNCaP cells from apoptosis induced by androgen deprivation through the Stat3 pathway. *Prostate*;60:178-186. 2004
- Lewis PD, Harvey JS, Waters EM, Skibinski DO, Parry JM: Spontaneous mutation spectra in supF: comparative analysis of mammalian cell line base substitution spectra. *Mutagenesis* 16:503-515, 2001
- Li D, Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *Cancer J.* 7:259-265, 2001
- Li D, Firozi PF, Zhang W, Shen J, DiGiovanni J, Lau S, Evans D, Friess H, Hassan M, Abbruzzese JL: DNA adducts, genetic polymorphisms, and K-ras mutation in human pancreatic cancer. *Mutat Res.* 513:37-48, 2002
- Liao SM, Zhang J, Jeffery DA, Koleske AJ, Thompson CM, Chao DM, Viljoen M, Young RA. A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature*, 374, 193-196. 1995
- Licht JD, Hanna RW, Reddy JC, English MA, Ro M, Grossel M, Shaknovich R Hansen U. Mapping and mutagenesis of the amino-terminal transcriptional repression domain of the *Drosophila* Kruppel protein. *Mol Cell Biol*, 14, 4057-4066. 1994
- Ling G, Persson A, Berne B, Uhlen M, Lundeborg J, Ponten F: Persistent p53 mutations in single cells from normal human skin. *Am J Pathol.* 159:1247-1253, 2001
- Lipshutz RJ, Fodor SPA, High density synthetic oligonucleotide arrays" *Nature* 21: 20-24, 1999
- Liu Y, Majumder S, McCall W *et al.* Inhibition of HER-2/neu kinase impairs androgen receptor recruitment to the androgen responsive enhancer. *Cancer Res*;65:3404-3409. 2005
- Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC: Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet.* 19:225-232, 1998
- Löhr M, Kloppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Luttges J: Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia.* 7:17-23, 2005
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg A, Domellöf L. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 328:1433-1437, 1993
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK Jr., Perrault J, Whitcomb D. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst.* 89:442-446, 1997
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251-260. 1997
- Luger K, Richmond TJ. DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol*, 8, 33-40. 1998
- Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ: High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene.* 108:1-6, 1991
- Lüttges J, Reinecke-Lüthge A, Möllmann B, Menke MAOH, Clemens A, Klimpfing M, Sipos B, Klöppel G: Duct changes and K-ras mutations in the disease-free pancreas: analysis of type, age relation and spatial distribution. *Virchows Arch.* 435:461-468, 1999
- Lüttges J, Diederichs A, Menke MAOH, Vogel I, Kremer B, Klöppel G: Ductal lesions in patients with chronic pancreatitis show K-ras mutations in a frequency similar to that in the normal pancreas and lack nuclear immunoreactivity for p53. *Cancer.* 88:2495-2504, 2000

- Lüttges J, Galehdari H, Bröcker V, Schwarte-Waldhoff I, Henne-Bruns D, Klöppel G, Schmiegel W, Hahn SA: Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the *p53* and *DPC4* genes during pancreatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 158:1677-1683, 2001
- Luo J, Duggan DJ, Chen Y *et al.* Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res*;61:4683-4688. 2001
- Luo J, Yu YP, Ciepły K *et al.* Gene Expression analysis of prostate cancers *Mol Carcinog*;33:25-35. 2002
- Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag M, Birchmeier W and Behrens J. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol*, 22:1184-93. 2002
- Lydiatt WM, Anderson PE, Bazzana T, Casale M, Hughes CJ, Huvos AG, Lydiatt DD, Schantz SP: Molecular support for field cancerization in the head and neck. *Cancer.* 82:1376-80, 1998
- Maacke H, Kessler A, Schmiegel W, Roeder C, Vogel I, Deppert W, Kalthoff H: Overexpression of p53 protein during pancreatitis. *Br J Cancer.* 75:1501-1504, 1997
- Macintosh CA, Stower M, Reid N, Maitland NJ: Precise microdissection of human prostate cancers reveals genotypic heterogeneity. *Cancer Res.* 58:23-28, 1998
- Madden SL, Cook DM, Rauscher F. A structure-function analysis of transcriptional repression mediated by the WT1, Wilms' tumor suppressor protein. *Oncogene*, 8, 1713-1720. 1993
- Maehama T, Dixon JE. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* (4):125-8. Review. 1999
- Maitra A, Fukushima N, Takaori K, Hruban RH: Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol.* 12:81-91, 2005
- Maldonado E, Hampsey M, Reinberg D. Repression: targeting the heart of the matter. *Cell*, 99, 455-458. 1999
- Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ and Hanski C. Target genes of beta-catenin-T-cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:1603-1608. 1999
- Mansmann U, Meister R. Testing differential gene expression in functional groups. Goeman's global test versus an ANCOVA approach. *Methods Inf Med*;44:449-453. 2005
- Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, Ro JY, Broxson A, Yu R, Morice RC, Kemp BL, Khuri FR, Walsh GL, Hittelman WN, Hong WK: Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst.* 89:857-862, 1997
- Makridakis N, Ross RK, Pike MC. A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 α -reductase. *Cancer Res*, 57:1020-1022. 1997
- Marcelli M, Ittmann M, Mariani S. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res.*;60:944-949. 2000
- Martin RH, Genetics of human sperm. *J Assist Reprod Genet*, 15(5), 240-245, 1998
- Marrone A, Dokal I. Dyskeratosis congenita: molecular insights into telomerase function, ageing and cancer. *Expert Rev. Mol. Med.* 6:1-23, 2004
- Martinez E, Chiang CM, Ge H, Roeder RG. TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter. *EMBO J*, 13, 3115-3126. 1994
- Marshall NF, Peng J, Xie Z, Price DH. Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem*, 271, 27176-27183. 1996

- Marx, J., How p53 suppresses cell growth *Science* 262: 1644-5, 1993
- Maser RS, DePinho RA: Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science*. 297:565-569, 2002
- May P and May E: Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 18:7621-7636, 1999
- Mazurek S, Grimm H, Boschek CB, Vaupel P, Eigenbrodt E: Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *Brit. J. Nutr.* 87: 23-29. 2002
- Mazurek S, Eigenbrodt E: The tumor metabolome. *Anticancer Res.* 23: 1149-1154. 2003
- McCarthy DM, Brat DJ, Wilentz RE, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH: Pancreatic intraepithelial neoplasia and infiltrating adenocarcinoma: analysis of progression and recurrence by DPC4 immunohistochemical labeling. *Hum Pathol.* 32:638-642, 2001
- McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, Tu SM, Campbell ML. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* Dec 15;52(24):6940-4. 1992
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* ;404(6779):714. 2000
- Meisterernst M, Horikoshi M, Roeder RG. transcription factor, mediates activation by the gene-specific factor USF in a chromatin assembly assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 9153-9157. 1990
- Meisterernst M, Roeder RG. Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity. *Cell*, 67, 557-567. 1991
- Meisterernst M, Roy AL, Lieu HM, Roeder RG. Activation of class II gene transcription by regulatory factors is potentiated by a novel activity. *Cell*, 66, 981-993. 1991
- Messing EM, Manola J, Yao J, Kiernan M, Crawford D, Wilding G, di'SantAgnese PA, Trump D. Immediate versus deferred androgen deprivation treatment in patients with node-positive prostate cancer after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy. *Lancet Oncol*: 7; 472-79. 2006
- Metzler M, Pfeiffer E. Genotoxic potential of xenobiotic growth promoters and their metabolites. *APMIS*. 109(2):89-95. 2001
- Michor F, Iwasa Y, Nowak MA: Dynamics of cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 4:197-205. 2004
- Michor F, Iwasa Y, Vogelstein B, Lengauer C, Nowak MA. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? *Semin Cancer Biol.* 15:43-49, 2005
- Miliani, de Marval PL, Lack of cyclin-dependent kinase 4 inhibits c-myc tumorigenic activities in epithelial tissues" *Mol. Cell Biol.* 24: 7538-47, 2004
- Miller AB, Nutritional aspects of human carcinogenesis. *IARC Sci Publ.*;(39):177-92. Review. 1982
- Miller DC, Hafez KS, Stewart A, MA, Montie JE, Wei JT. Prostate carcinoma presentation, diagnosis, and staging: an update form the National Cancer Data Base . *Cancer* 98: 1169. 2003
- Milner J, Medcalf EA: Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell*. 65:765-774, 1991
- Mishra RK, Chatterji D. Mechanism of initiation of transcription by Escherichia coli RNA polymerase on supercoiled template. *Mol Microbiol*, 8, 507-515. 1993
- Mitchell JR, Wood E, Collins K: A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, 402, 551-555. 1999

- Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y and Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* (2000), 12:469-474. 2000
- Mizokami A, Koh E, Fujita H et al. The adrenal androgen androstenediol is present in prostate cancer tissue after androgen deprivation therapy and activates mutated androgen receptor. *Cancer Res*; 64:765-771. 2004
- Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen HT, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y, Allis CD The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*, 87, 1261-1270. 1996
- Morson BC. Evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*; 34:845-849 1974
- Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE: p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 57:2140-2143, 1997a
- Moskaluk, CA, Hruban RH, Schutte M, Lietman AS, Smyrk T, Fusaro L, Fusaro R, Lynch J, Yeo CJ, Jackson CE, Lynch T, Kern SE: Genomic sequencing of DPC4 in the analysis of familial pancreatic carcinoma. *Diagn Mol Pathol*. 6:85-90, 1997b
- Moskovitz AH, Linford NJ, Brentnall TA, Bronner MP, Storer BE, Potter JD, Bell RH Jr, Rabinovitch PS: Chromosomal instability in pancreatic ductal cells from patients with chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 37:201-206, 2003
- Muller A and Fishel R. Mismatch repair and the hereditary non-polyposis cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Invest*; 20(1): 102-109. 2002
- Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, Hruban RH, Kern SE: Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res*. 62:3789-3793, 2002
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymology*. 155:335-350, 1987
- Nakata B, Wang YQ, Yashiro M, Nishioka N, Tanaka H, Ohira M, Ishikawa T, Nishino H, Hirakawa K: Prognostic value of microsatellite instability in resectable pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 8:2536-2540, 2002
- Naumann M, Savitkaia N, Eilert C, Schramm A, Kalthoff H, Schmiegel W: Frequent codeletions of p16/MTS1 and p15/TS2 and genetic alterations in p16/MTS1 in pancreatic tumors. *Gastroenterology*; 110: 1215-1224. 1996
- Newton MA, Wu SQ, and Reznikoff CA, Assessing the significance of chromosome-loss data: Where are the suppressor genes for bladder cancer? *Statistics in Medicine*, 13, 839-858 1994
- Nielsen SJ, West RB, Linn SC: Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet*, 359:1301-1307. 2002
- Nikiforov MA, p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis *Oncogene* 13:1709-19, 1996
- Nikiforov MA, Kotenko, "Complementation of Myc-dependent cell proliferation by cDNA expression library screening" *Oncogene* 19: 4828-4831, 2000
- Nikolov DB, Burley SK. 21 A resolution refined structure of a TATA box-binding protein (TBP). *Nat Struct Biol*, 1, 621-637. 1994
- Nikolov DB, Chen H, Halay ED, Usheva AA, Hisatake K, Lee DK, Roeder RG, Burley SK. Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature*, 377, 119- 128. 1995

- Nishino H, Buettner VL, Sommer SS. Towards validation of the Big Blue transgenic mouse mutagenesis assay: the mutational spectrum of ex vivo pinpoint mutant plaques. *Mutat Res.* 11;372(1):97-105. 1996
- Nohmi T, Suzuki T, Masumura K: Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays. *Mutat Res.* 455:191-215, 2000
- Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, Overvad K, Olsen A, Tjonneland A, Clavel F, Boutron-Ruault MC, Kesse E, Boeing H, Bergmann MM, Nieters A, Linseisen J, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Tountas Y, Berrino F, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Engeset D, Lund E, Skeie G, Ardanaz E, Gonzalez C, Navarro C, Quiros JR, Sanchez MJ, Berglund G, Mattisson I, Hallmans G, Palmqvist R, Day NE, Khaw KT, Key TJ, San Joaquin M, Hemon B, Saracci R, Kaaks R, Riboli E. Meat, Fish, and Colorectal Cancer Risk: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 97:906–916. 2005
- Ogryzko VV, Kotani T, Zhang X, Schlitz RL, Howard T, Yang XJ, Howard BH, Qin J, Nakatani Y. Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell*, 94, 35-44. 1998
- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87, 953-959. 1996
- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87, 953-959. 1996
- Orphanides G, LeRoy G, Chang CH, Luse DS, Reinberg D. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell*, 92, 105-116. 1998
- Orphanides G, Wu WH, Lane WS, Hampsey M, Reinberg D. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature*, 400, 284-288. 1999
- Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*, 10, 2657-2683. 1996
- Overholser JP, Prewett MC, Hooper AT, Waksal HW, Hicklin DJ: Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice. *Cancer*. 89:74-82, 2000
- Palmer A: A link between MAP kinase and p34 (cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1 *Embo J*. 17: 5037-47, 1998
- Paquet K-J: Vergleich der partiellen Duodenopankreatektomie (Whipple-Operation) mit der pyloruserhaltenden Zephaloduodenopankreatektomie - eine prospektiv kontrollierte, randomisierte Langzeitstudie. *Chir Gastroenterologie*;14:54-58. 1998
- Pardee AB: G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246: 603-608. 1989
- Philimonenko VV, Zhao J, Iben S, Dingova H, Kysela K, Kahle M, Zentgraf H, Hofmann WA, de Lanerolle P, Hozak P, Grummt I. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol.* Dec;6(12):1165-72. 2004
- Persson AE, Ling G, Williams C, Backvall H, Ponten J, Ponten F, Lundeberg J: Analysis of p53 mutations in single cells obtained from histological tissue sections. *Anal Biochem.* 287:25-31, 2000
- Peters M, Herskowitz I: Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell*, 79:181-184. 1994
- Pitot HC: Altered hepatic foci – their role in murine hepatocarcinogenesis. *Ann Rev Pharmacol*, 30:465-500. 1990
- Player A, Barrett JC, Kawasaki ES. Laser capture microdissection, Mikroarrays and the precise definition of a cancer cell. *Expert Rev Mol Diagn.* 4:831-840, 2004

- Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE: Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* 50:7415-7421, 1990
- Pugh BF, Tjian R. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell*, 61, 1187-1197. 1990
- Ray P, Handyside AH: Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod.* 2:213-218, 1996
- Rechitsky S, Freidine M, Verlinsky Y, Strom CM: Allele dropout in sequential PCR and FISH analysis of single cells (cell recycling). *J Assist Reprod Genet.* 13:115-124, 1996
- Recio L, Cochrane J, Simpson D, Skopek TR, O'Neill JP, Nicklas JA, Albertini RJ: DNA sequence analysis of *in vivo* hprt mutation in human T lymphocytes. *Mutagenesis* 5:505-510, 1990
- Redston MS, Caldas C, Seymor AB: p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res*, 54:3925-3033. 1994
- Reed SI, Control of the G1/S transition" *Cancer Surv.* 29: 7-23, 1997
- Reyes G, Villanueva A, Garcia C, Sancho FJ, Piulats J, Lluís F, Capella G: Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice. *Cancer Res.* 56:5713-5719, 1996
- Rhodes DR, Yu J, Shanker K *et al.* Large-scale meta-analysis of cancer Mikroarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *PNAS*; 101:9309-9314. 2004
- Ring HZ, Kroetz DL. Candidate gene approach for pharmacogenetic studies. *Pharmacogenomics.* (1):47-56. Review. 2002
- Rivera JA, Rall CJN, Graeme-Cook F, Fernandez-del Castillo C, Shu P, Lakey N, Tepper R, Rattner DW, Warshaw AL, Rustgi AK: Analysis of *K-ras* oncogene mutations in chronic pancreatitis with ductal hyperplasia. *Surgery.* 121:42-49, 1997
- Rodin SN, Rrodin AS: Strand asymmetry of CpG transitions as indicator of G₁ phase-dependent origin of multiple tumorigenic p53 mutations in stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* 95:11927-11932, 1998
- Roeder RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *TrendsBiochem Sci*, 21, 327-335. 1996
- Roehrl MH, Becker KF, Becker I, Höfler H: Efficiency of single-cell polymerase chain reaction from stained histologic slides and integrity of DNA in archival tissue. *Diagn Mol Pathol.* 6:292-297, 1997
- Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 24(3):227-35 2000
- Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res*; 64:985-993. 2004
- Rosty C, Geradts J, Sato N, Wilentz RE, Roberts H, Sohn T, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M: p16 Inactivation in pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs) arising in patients with chronic pancreatitis. *Am J Surg Pathol.* 27:1495-1501, 2003
- Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE: Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 57:1731-1734, 1997

- Rüschoff J, Dietmaier W, Bocker T, Molekulare Krebsdispositionsdiagnostik am Beispiel des kolorektalen Karzinoms: Welchen Beitrag kann die Pathologie leisten? *Der Pathologe* 19: 269- 278, 1998
- Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C, DePinho RA: Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell*, 96, 701-712. 1999
- Safran H, Steinhoff M, Mangray S, Rathore R, King TC; Chai L, Berzein K, Moore T, Iannitti D, Reiss P, Pasquariello T, Akerman P, Quirk, D, Mass R, Goldstein L, Tantravahi U: Overexpression of the Her-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol*. 24:496-499, 2001
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230:1350-1354, 1985
- Scher HI, Steineck G, Kelly WK. Hormone-refractory (D3) prostate cancer: refining the concept. *Urology*;46:142-148. 1995
- Schlegel J, Bocker T, Zirngibl H, Hofstädter F, Rüschoff J: Detection of microsatellite instability in human colorectal carcinomas using a non-radioactive PCR-based screening method. *Virchows Arch*. 426:223-227, 1995
- Schmidt EE, Ichimura K, Goike HM, Moshref A, Liu L, Collins VP: Mutational profile of the PTEN gene in primary human astrocytic tumors and cultivated xenografts. *J Neuropathol Exp Neurol*. 58:1170-1183, 1999
- Schuhmacher M., Kohlhuber, The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc" *Nucleic Acids Res*. 29: 397-406, 2001
- Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG: Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res*. 57:3126-3130, 1997
- Schütze K, Lahr G: Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat Biotechnol*. 16:737-742, 1998
- Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Lüttges J, Klöppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A, Schmiegel W: Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:9624-9629, 2000
- Semple JW, ORC-associated replication factors as biomarkers for cancer" *Biotechnol Adv*. 22: 621-31, 2004
- Sengstag C. The role of mitotic recombination in carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol*, 4, 24, S. 323-53. 1994
- Sermon K, Lissens W, Joris H, Van Steirteghem A, Liebaers I: Adaptation of the primer extension preamplification (PEP) reaction for preimplantation diagnosis: single blastomere analysis using short PEP protocols. *Mol Hum Reprod*. 2:209-212, 1996
- Serra R, Moses HL: Tumor suppressor genes in TGF- β signalling pathways? *Nat Med*, 2:390-391. 1996
- Seymour AB, Hruban RH, Redston M, Caldas C, Powell SM, Kinzler KW, Yeo C, Kern SE: Allelotype of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 54:2761-2764, 1994
- Sherr CJ: Mammalian G1 cyclins. *Cell*; 73: 1059-1065. 1993
- Sherr, CJ, Cancer cell cycles *Science* 274:1672-7, 1996
- Sherr CJ, and Roberts JM, CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression" *Genes Dev*. 13: 1501-1512, 1999
- Sherr CJ: The INK4A/ARF network in tumour suppression. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2:731-737, 2001

- Shuber AP, Grondin VJ, Klinger KW: A simplified procedure for developing multiplex PCRs. *Genome Research*. 5:488-493, 1995
- Sibilia M, Fleischmann A, Behrens A, Stingl L, Carroll J, Watt FM, Schlessinger J, Wagner EF: The EGF-receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell*. 102:211-220, 2000
- Silberg DG, Wang W, The Down Regulated in Adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane sulfate transport protein" *J. Biol. Chem*. 270: 11897-11902, 1995
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, Mc Guire WL: Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of Her-2/neu proto-oncogene in human breast cancer. *Science*, 235:177-182, 1987
- Smogorzewska A, de Lange T, Regulation of telomerase by telomeric proteins, *Annu. Rev. Biochem*. 73: 177-208, 2004
- Smogorzewska A, Karlseder J, Holtgreve-Grez H, Jauch, A & de Lange, T: DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr Biol*, 12, 1635-1644. 2002
- Snabes MC, Chong SS, Subramanian SB, Kristjansson K, DiSepio D, Hughes MR: Preimplantation single-cell analysis of multiple genetic loci by whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:6181-6185, 1994
- Sommers SC, Murphy SA, Warren S. Pancreatic duct hyperplasia and cancer. *Gastroenterology*. 27:629-640, 1954
- Southern E, Mir K, Molecular interactions on Mikroarrays *Nature* 21: 5-9, 1999
- Sowerby SJ; Kennedy MA; Fitzgerald PH; Morris CM. DNA sequence analysis of the major breakpoint cluster region of the BCR gene rearranged in Philadelphia-positive human leukemias. *Oncogene*, 6, 8, 1679-83. 1993
- Speicher MR, du Manoir S, Schrock E, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T, Ried T: Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet*. 2:1907-1914, 1993
- Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S: Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*. 161:1961-1971, 2002
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 95(1):29-39. 1998
- Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, *et al*. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res*; 66:2815-2825. 2006
- Stone CD, Chen ZY and Tseng CC. Gut-enriched Kruppel-like factor regulates colonic cell growth through APC/beta-catenin pathway. *FEBS Lett* (202), 530(1-3):147-152. 2002
- Su GH, Hilgers W, Shekher MC, Tang GJ, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE: Alterations in pancreatic, biliary and breast carcinomas support MKK4 as a genetically targeted tumor suppressor gene. *Cancer Res*. 58:2339-2342, 1998
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D`Amico M, Pestell R and Ben-Ze`ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:5522-5527. 1999
- Suarez-Quian CA, Goldstein SR, Pohida T, Smith PD, Peterson JI, Wellner E, Ghany M, Bonner RF: Laser capture microdissection of single cells from complex tissues. *Biotechniques*. 26:328-335, 1999
- Sudbo J, Lippman SM, Lee JJ, Mao L, Kildal W, Sudbo A, Sagen S, Bryne M, El-Naggar A, Risberg B, Evensen JF, Reith A: The influence of resection and aneuploidy on mortality in oral leukoplakia. *N Engl J Med*. 350:1405-1413, 2004

- Sun F, Arnheim N, Waterman MS: Whole genome amplification of single cells: Mathematical analysis of PEP and tagged PCR. *Nucleic Acids Res.* 23:3034-3040, 1995
- Tachibana KE, Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology" *J. Pathol.* 205: 123-9, 2005
- Tada M, Ohashi M, Shiratori Y, Okudaira T, Komatsu Y, Kawabe T, Yoshida H, Machinami R, Kishi K, Omata M: Analysis of K-*ras* gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. *Gastroenterology.* 110:227-231, 1996
- Taguchi T, Testa JR, Localization of a candidate1 colon tumor-suppressor gene (DRA) to 7q22-q31.1 by fluorescence *in situ* hybridization" *Genomics* 20: 146-147, 1996
- Takaori K, Matsusue S, Fujikawa T, Kobashi Y, Ito T, Matsuo Y, Oishi H, Takeda H: Carcinoma *in situ* of the pancreas associated with localized fibrosis: a clue to early detection of neoplastic lesions arising from pancreatic ducts. *Pancreas.* 17:102-105, 1998
- Takaori K, Kobashi Y, Matsusue S, Matsui K, Yamamoto T: Clinicopathological features of pancreatic intraepithelial neoplasias and their relationship to intraductal papillary-mucinous tumors. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 10:125-136, 2003
- Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N. Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas.* 28:257-262, 2004
- Tan S, Hunziker Y, Sargent DF Richmond TJ Crystal structure of a yeast TFIIA/TBP/DNA complex *Nature*, 381, 127-151. 1996
- Tang ZH, Zou SQ, Hao YH, Wang BJ, Yang XP, Chen QQ, Qiu FZ: The relationship between loss expression of DPC4/Smad4 gene and carcinogenesis of pancreatobiliary carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 1:624-629, 2002
- Taylor TB, Nambiar PR, Raja R, Cheung E, Rosenberg DW, Anderegg B. Microgenomics: Identification of new expression profiles via small and single-cell sample analyses. *Cytometry A.* 59:254-261, 2004
- Taylor M, Morgan, HE, Johnson, A, Hadley, LJ, Nicholson, R. Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. *Biochem J;* 375:51-59. 2003
- Teixeira MR, Heim S: Multiple numerical chromosome aberrations in cancer: what are their causes and what are their consequences? *Semin Cancer Biol.* 15:3-12, 2005
- Tetsu O and McCormick F, 1999. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature;* 398:422-426. 1999
- Thompson C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1456-1462. 1995
- Thompson D, Easton DF; Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 94:1358-1365, 2002
- Tindall KR and Kunkel TA: Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry.* 27:6008-6013, 1988
- Tjarda van Heek N, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, Offerhaus GJA, Hicks JL, Wilents RE, Goggins MG, De Marzo AM, Hruban RH, Maitra A: Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol.* 161:1541-1547, 2002
- Toma M, Murders M, Friedrich K, Meyer W, Baretton G. Aneusomie der Chromosomenregion 20q13.2 in Prostatakarzinom-Korrelation zu DNA-Ploidie. Posterpräsentation 89. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V. 2005
- Tomlins SA, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Integrative Biology of Prostate Cancer Progression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.;* 1:143-171. 2006

- Tsai FT, Sigler PB. Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. *EMBO J*, 19, 25-36. 2000
- Tsuchiya R, Tajima Y, Matsuzaki S, Onizuka S, Kanematsu T. Early pancreatic cancer. *Pancreatology*. 1:597-603, 2001
- Tsukiyama T, Wu C. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor *Cell*, 83, 1011-1020. 1995
- Turnay J, Olmo N, Gavilanes JG, Fibroblastlike primary cells from human colon adenocarcinoma explants: collagen biosynthesis" *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27A:447-52, 1991
- Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH Goggins M: Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 60:1835-1839, 2000
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of Mikroarrays applied to the ionising radiation response. *PNAS*;98:5116-5121. 2001
- Ueki T, Toyota M, Skinner H, Walter KM, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH Goggins M: Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 61:8540-8546, 2001
- Van DM, Roeder RG, Sawadogo M. Physical analysis of transcription preinitiation complex assembly on a class II gene promoter. *Science*, 241, 1335-1338. 1988
- Van der Laan M, Pollard K. A new algorithm for hybrid hierarchical clustering with visualization and the bootstrap. *Journal of Statistical Planning and Interference*;117:275-303. 2003
- Varley J, McGown G, Thorncroft M, James JA, Margison GP, Forster G, Evans GR, Harris M, Kelsey AM, Birch JM: Are there low-penetrance *TP53* Alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet.* 65:995-1000, 1999
- Venkitaraman AR: Cancer susceptibiliy and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108:171-182, 2002
- Verrijzer CP, Tjian R. TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem Sci*, 21, 338-342. 1996
- Villadsen R, Nielsen KV, Bolund L, Briand P: Complete loss of wild-type TP53 in a nontransformed human epithelial cell line is preceded by a phase during which a heterozygous TP53 mutant effectively outgrows the homozygous wild-type cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 116:28-34, 2000
- Viraphong L., DNA Mikroarrays and Expression Bioinformatics Faculty of Medicine" Khon Kaen University, Thailand
- Virchow R: Die krankhaften Geschwülste. Vols I-III, Berlin, August Hirschwald 1836-67
- Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P *et al.* In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nature Genet.*;9:401-406. 1995
- Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* (4):138-41. Review. 1993
- Wagner M, Cao T, Lopez ME, Hope C, van Nostrand K, Kobrin MS, Fan HU, Büchler MW, Korc M: Expression of a truncated EGF receptor is associated with inhibition of pancreatic cancer cell growth and enhanced sensitivity to cisplatin. *Int J Cancer.* 68:782-787, 1996
- Walsh PC, Worthington JF, Deutsche Bearbeitung: Wolff JM, Marx FJ, Weißbach L. Die Prostata. *Prostatakrebs* 8:25-26. 2000
- Wang, Q. M., Luo, X. Retinoblastoma protein-overexpressing HL60 cells resistant to 1,25-dihydroxyvitamin D3 display increased CDK2 and CDK6 activity and shortened G1 phase" *Oncogene* 16: 2729-37, 1998

- Wang XJ, Greenhalgh DA, Donehower LA, Roop DR: Cooperation between Ha-ras and fos or transforming growth factor alpha overcomes a paradoxical tumor-inhibitory effect of p53 loss in transgenic mouse epidermis. *Mol Carcinog.* 29:67-75, 2000
- Warburg O, Posener K, Negelein E. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem Z* 152: 309–344. 1924
- Warburg O. Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin: Springer 1926.
- Warshaw AL, Castillo CFD: Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med*, 326:455-465 1992
- Watanabe M, Nobuta A, Tanaka J, Asaka M. An effect of K-ras gene mutation on epidermal growth factor receptor signal transduction in PANC-1 pancreatic carcinoma cells: *Int J Cancer* 67:264-268, 1996
- Weingärtner K, Gerharz EW, Prostatakarzinom Dtsch. *Med.Wochenschrift* 119: 235-243, 1994
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JDA: Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res.* 27:1214-1218, 1999
- Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI *et al.* Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res*;61:5974-5978. 2001
- Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK jr, Amann ST, Toskes SP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Prost JC, Ehrlich GD: Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet.* 14:141-145, 1996
- Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR, Burch JD, Hankin J, Dreon DM, West DW, *et al.* Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst.* 87(9):652-61. 1995
- Wiegand P, Domhöver J, Brinkmann B: DNA-Degradation in formalinfixierten Geweben. *Pathologe.* 17:451-454, 1996
- Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H and Pals ST. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* (1999), 154:515-523. 1999
- Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJA, Kang M, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH: Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: Loss of intranuclear expression. *Cancer Res.* 58:4740-4744, 1998
- Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH: Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: Evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res.* 60:2002-2006, 2000
- Wilentz RE, Su GH, Dai JL, Sparks AB, Argani P, Sohn TA, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH: Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas : a new marker of DPC4 inactivation. *Am J Pathol.* 156:37-43, 2000b
- Wilentz RE, Argani P, Hruban RH: Loss of heterozygosity or intragenic mutation, which comes first? *Am J Pathol.* 2001, 158:1561-1563, 2001
- Wilkens L, Flemming P, Gebel M, Bleck J, Terkamp C, Wingen L, Kreipe H, Schlegelberger B. Induction of aneuploidy by increasing chromosomal instability during dedifferentiation of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*;101:1309-1314. 2004
- Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med.* 323(24):1664-72. 1990

- Williams C, Ponten F, Moberg C, Soderkvist P, Uhlen M, Ponten J, Sitbon G, Lundeberg J: A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol.* 155:1467-71, 1999
- Williams GH, "Diagnosis of oesophageal cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in gastric aspirates" *British Journal of Cancer*, 91: 714-9, 2004
- William B. Coleman, Gregory J. Tsongalis, "The Molecular Basis of Human Cancer" Humana Press, 1 Auflage, New Jersey 1998
- Wilson VL, Wie Q, Wade KR, Chisa M, Bailey D, Canstrup CM, Yin X, Jackson CA, Thompson B, Lee WR: Needle-in-a-haystack detection and identification of base substitution mutations in human tissues. *Mutat Res.* 406: 79-100, 1999
- Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, Landt O, Becker. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 25(2):213-6. 2000
- Wyatt RT; Rudders RA; Zelenetz A; Delellis RA; Krontiris TG. BCL2 oncogene translocation is mediated by a chi-like consensus. *J Exp Med*, 6, 175, S 1575-88. 1992
- Wolffe AP, Guschin D. Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol*, 129, 102-122. 2000
- Xiong, Y., p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases *Nature* 366: 701-4, 1993
- Yagi N, Satonaka K, Horio M, Shimogaki H, Tokuda Y, Maeda S: The role of DNase and EDTA on DNA degradation in formaldehyde fixed tissues. *Biotech Histochem.* 71:123-129, 1996
- Yamamoto H, Itoh F, Makamura H, Fukushima, Sasaki S, Perucho M, Imai K: Genetic and clinical features of human pancreatic ductal adenocarcinomas with widespread microsatellite instability. *Cancer Res.* 61:3139-3144, 2001
- Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, Büchler M, Kunz J, Beger HG, Korc M: Overexpression of HER-2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma. *Hum Pathol.* 24:1127-1134, 1993
- Yamano M, Fujii H, Takagaki T, Kadowaki N, Watanabe H, Shirai T: Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol.* 156:2123-2133, 2000
- Yan D, Wiesmann M, Rohan M, Can V, Jefferson AB, Guo L, Sakamoto D, Caothien RH, Fuller JH, Reinhard C, Garca PD, Randazzo FM, Escobedo J, Fantl WJ and Williams LT. Elevated expression of axin2 and hnk2 mRNA provides evidence that Wnt/beta-catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:1473-1478. 2001
- Yanagisawa A, Ohtrake K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H, Kato Y: Frequent K-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasia of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res.* 53:953-956, 1993
- Ye XS, Fincher RR, Tang A, Osmani SA, "The G2/M DNA damage checkpoint inhibits mitosis through Tyr15 phosphorylation of p34cdc2 in *Aspergillus nidulans*" *EMBO J.* 16:182-92, 1997
- Yu YP, Landsittel D, Jing L et al. Gene Expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J Clin Oncol*;22:2790-2799, 2004
- Youden W. Index rating for Diagnostic Test. *Cancer* 3:32-35, 1950
- Young RA: Biomedical discovery with DNA arrays. *Cell*, 102:9-15. 2000
- Zalatnai A: Epidermal growth factor receptor, somatostatin and bcl-2 in human pancreatic tumor xenografts. An immunohistochemical study. *Pathol Oncol Res.* 5:146-151, 1999

Zambrowicz BP, Sands AT. Knockouts model the 100 best-selling drugs--will they model the next 100? *Nat Rev Drug Discov.* (1):38-51. Review 2003.

Zawel L, Reinberg D. Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu Rev Biochem*, 64, 533-561. 1995

Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG. What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 7(6): 835-42. 1995

Zhang F, Lee J, Lu S, Pettaway CA, Dong Z. Blockade of transforming growth factor-beta signalling suppresses progression of androgen-independent human prostate cancer in nude mice. *Clin Cancer Res*; 11: 4512-4520. 2005

Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:5847-5851, 1992

Zielinski D, Quantifizierung der Expression der humanen DNA-Reparatur-Gene hMLH1 und hMSH2 mittels RT-PCR zur Diagnostik des hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinoms Diplomarbeit Universität Kassel, 2002