

**Charakterisierung molekularer Veränderungen
in der Entstehung des kolorektalen Karzinoms aus
frühen präneoplastischen Läsionen**

Dissertation

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

vorgelegt von
Sandra Lechner
aus Niedererlbach
Regensburg, 2001

Diese Arbeit wurde von Prof. Dr. S. Schneuwly und PD Dr. F. Kullmann angeleitet.

Promotionsgesuch eingereicht am: 18. Dezember 2001

Tag der mündlichen Prüfung: 14. März 2002

Prüfungsausschuss: Vorsitzender: Prof. Dr. G. Hauska

1. Gutachter: Prof. Dr. S. Schneuwly

2. Gutachter: PD Dr. F. Kullmann

3. Prüfer: Prof. Dr. R. Wirth

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
daß die Dinge so sind wie sie sind.
(Aristoteles 384-322 v. Chr.)

INHALT

I. EINLEITUNG	1
1. Aufbau und Funktion des Darms	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Krypten	3
2. Kolonkarzinom	4
2.1 Tumorsuppressorgene	5
2.2 Onkogene	7
2.3 Phänotypen des Kolonkarzinoms	8
2.3.1 CIN-Phänotyp	8
2.3.2 MIN-Phänotyp	9
3. Aberrante Crypt Foci (ACF)	10
3.1 Morphologische, topologische und histologische Daten	11
3.2 Molekulare Daten	13
4. Fragestellung	15
II. MATERIAL UND METHODEN	17
1. Material	17
1.1 Bezugsquellen von Substanzen, Chemikalien, Enzymen und sonstigen Materialien	17
1.2 Organismen	19
1.3 Oligonukleotide	20
1.4 Vektoren und Plasmide	21
1.5 Antikörper	22
1.6 Kits und Standards	23
1.7 Geräte	24
2. Zellbiologische Methoden	24
2.1 Zellkultur	24
2.1.1 Zusammensetzung der Nährmedien und Kulturbedingungen	24
2.1.2 Passagierung von Zellen	25
2.1.3 Zellzahlbestimmung/Vitalitätstest	25
2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	26
2.1.5 Transfektion von Zellen	26
2.1.6 Selektion transfizierter Zellen	27
2.2 Gewebe	27
2.2.1 Asservierung des Gewebes	27
2.2.2 Kryogewebeschnitte	27
2.3 Lasergesteuerte Mikrodissektion (LGM)	28
2.3.1 Kryogewebeschnitte und Fixierung	28
2.3.2 Prinzip der LGM	28
2.4 <i>In situ</i> Hybridisierung	30
2.4.1 Puffer und Lösungen	30

2.4.2 Sondenherstellung	31
2.4.3 Hybridisierung	32
2.4.4 Immunologischer Nachweis	33
2.5 Immunhistochemie	33
2.5.1 Puffer und Lösungen	33
2.5.2 Gewebeschnitte	34
2.5.2.1 Vorbehandlung von Gefrierschnitten	34
2.5.2.2 Vorbehandlung von Paraffinschnitten	34
2.5.3 Phosphatase-Immunhistochemie	34
2.5.4 Immunogold-Silbertechnik	35
2.5.5 Immuncytochemie	36
3. Molekularbiologische Methoden	36
3.1 RNA-Isolierung	36
3.1.1 aus Zellmaterial	36
3.1.2 aus Gewebematerial nach LGM	36
3.1.3 RNA-Konzentrationsbestimmung	37
3.1.3.3 Ethidiumbromidplatten	37
3.1.3.4 RiboGreen™ RNA Quantitation Kit	37
3.2 PCR und RT-PCR	37
3.2.1 Reverse Transkription für RT-PCR	38
3.2.2 PCR	38
3.2.2.1 Reaktionsansatz für Routineuntersuchungen	39
3.2.2.2 Reaktionsansatz mit „Expand™ High Fidelity PCR System“	39
3.3 Realtime-PCR mit der LightCycler-Technologie	40
3.3.1 Allgemeines Prinzip und Reaktionsansatz	40
3.3.2 Auswertung	41
3.3.3 Primer-Effizienztest	42
3.4 RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR)	42
3.4.1 RAP-PCR aus Zellmaterial	43
3.4.2 RAP-PCR aus Gewebematerial nach LGM	44
3.5 cDNA-Expressionsarray	45
3.5.1 Puffer und Lösungen	46
3.5.2 Herstellung von Hybridisierungssonden	46
3.5.3 Aufreinigung von RAP-PCR-Reaktionen	46
3.5.4 Prähybridisierung	47
3.5.5 Denaturierung von Hybridisierungssonden	47
3.5.6 Hybridisierung	47
3.5.7 Waschen	47
3.5.8 Phosphorimaging	48
3.5.9 Atlas™ 2.0-Software	48
3.5.9.1 Array-Alignment	48

3.5.9.2 Array-Vergleich	49
3.5.10 Strippen von Membranen	50
3.6 Gelelektrophorese	50
3.6.1 Puffer und Lösungen	50
3.6.2 Agarosegele	51
3.6.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	51
3.6.4 Polyacrylamidgele	51
3.7 Klonierung, Sequenzierung und Sequenzauswertung	52
3.7.1 Klonierung	52
3.7.1.1 Puffer und Lösungen	52
3.7.1.2 Ligation und Transformation	52
3.7.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	53
3.7.1.4 Glycerinkulturen	53
3.7.2 DNA-Sequenzierung	53
3.7.3 Sequenzdatenanalyse	54
4. Proteinchemische Methoden	54
4.1 Lösungen und Puffer	54
4.2 Zellaufschluss zur Proteingewinnung	55
4.3 Analyse von Proteinlösungen	55
4.3.1 Proteinmengen-Bestimmung	55
4.3.2 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
4.3.3 Western Blot	56
4.3.3.1 Transfer von Protein auf Membranen (Elektroblot)	56
4.3.3.2 Ponceau-S-Färbung	56
4.3.3.3 Immunologischer Nachweis	56
III. ERGEBNISSE	57
1. Die Rolle von <i>ptprg</i> für das Kolonkarzinom	57
1.1 <i>Ptprg</i> Expression im Gewebe	58
1.1.1 Fälle	58
1.1.2 Realtime-PCR	58
1.1.3 Lokalisierung von <i>ptprg</i> -mRNA im Gewebe	59
1.2 <i>Ptprg</i> -Überexpression in einer Zelllinie	60
1.2.1 <i>Ptprg</i> -Expression in Kolonkarzinom-Zelllinien	60
1.2.2 Optimierung von Transfektion und Selektion	61
1.2.2.1 Transfektion	61
1.2.2.2 Selektion	62
2. Entwicklung einer neuartigen methodischen Strategie	63
2.1 Vorarbeiten	63
2.1.1 Effektivität unterschiedlicher Fixierungsmethoden für Gefriergewebeschnitte	63
2.1.2 Optimierung der RNA-Isolierung aus Gefriergewebeschnitten	65
2.1.3 Grenzen der Standard-RAP-PCR	65

2.2 Ausarbeitung eines RAP-PCR Protokolls für kleine RNA-Mengen _____	65
2.2.1 „Nested“ Strategie _____	65
2.2.2 „Nested“ RAP-PCR in Kombination mit lasergesteuerter Mikrodisektion _____	67
2.3 cDNA-Expressionsarrays _____	68
2.3.1 RAP-PCR-Produkte als Hybridisierungssonden _____	68
2.3.2 Auswertung und Normalisierung von cDNA-Expressionsarrays _____	68
3. Genexpression in normalen Kolonkrypten _____	70
3.1 Mikrodisektion von normalen Kolonkrypten _____	71
3.2 RAP-PCR und cDNA-Expressionsarrays _____	71
3.3 Bestätigung der differentiellen Expression _____	74
3.3.1 Genspezifische RT-PCR _____	74
3.3.2 Immunhistochemie _____	75
4. Genexpression in aberranten Krypten und frühen Adenomen _____	76
4.1 Histologie und lasergesteuerte Mikrodisektion _____	76
4.2 Genexpressionsprofile von frühen Adenomen und aberranten Krypten _____	78
4.2.1 Frühe Adenome _____	78
4.2.2 Aberrante Krypten _____	80
4.3 Immunhistochemische Färbungen _____	83
IV. DISKUSSION _____	84
1. Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor-Typ g _____	84
1.1 Expression im Gewebe _____	84
1.2 Überexpression _____	85
2. Erstellen von Genexpressionsmustern _____	86
2.1 Methodische Überlegungen _____	87
2.1.1 Lasergesteuerte Mikrodisektion und RAP-PCR _____	87
2.1.2 cDNA-Expressionsarray _____	88
2.2 Anforderungen an Gewebeproben _____	89
2.3 Auswertung von Arraydaten _____	90
2.4 Anwendung der neu etablierten Methode zur Analyse von differenzieller Genexpression _____	92
2.4.1 Normale Kolonkrypten _____	92
2.4.2 Früh-adenomatöse Kolonkrypten _____	93
2.4.2.1 RAS-/MAPK-Weg _____	94
2.4.2.2 Thrombospondine _____	95
2.4.2.3 Interferon γ Rezeptor _____	96
2.4.3 Aberrante Krypten _____	96
V. ZUSAMMENFASSUNG _____	98
VI. ABKÜRZUNGEN _____	100
VII. LITERATUR _____	102
ANHANG _____	119

I. EINLEITUNG

1. Aufbau und Funktion des Darms

1.1 Allgemeines

Mit einer Länge von 7,5 bis 9 m und einer Oberfläche von 300 bis 400 m² bildet der Darm die größte Kontaktfläche des Körpers mit der Außenwelt und stellt eine primäre Barriere für eine Vielzahl von Krankheitserregern dar. Die Wand von Dünndarm und Dickdarm ist prinzipiell gleichartig aus vier konzentrisch angeordneten Schichten aufgebaut (vgl. Abbildung 1): *Mucosa*, *Tela submucosa* (Submucosa), *Muscularis propria* (*Stratum circulare* und *Stratum longitudinale*) und *Serosa*.

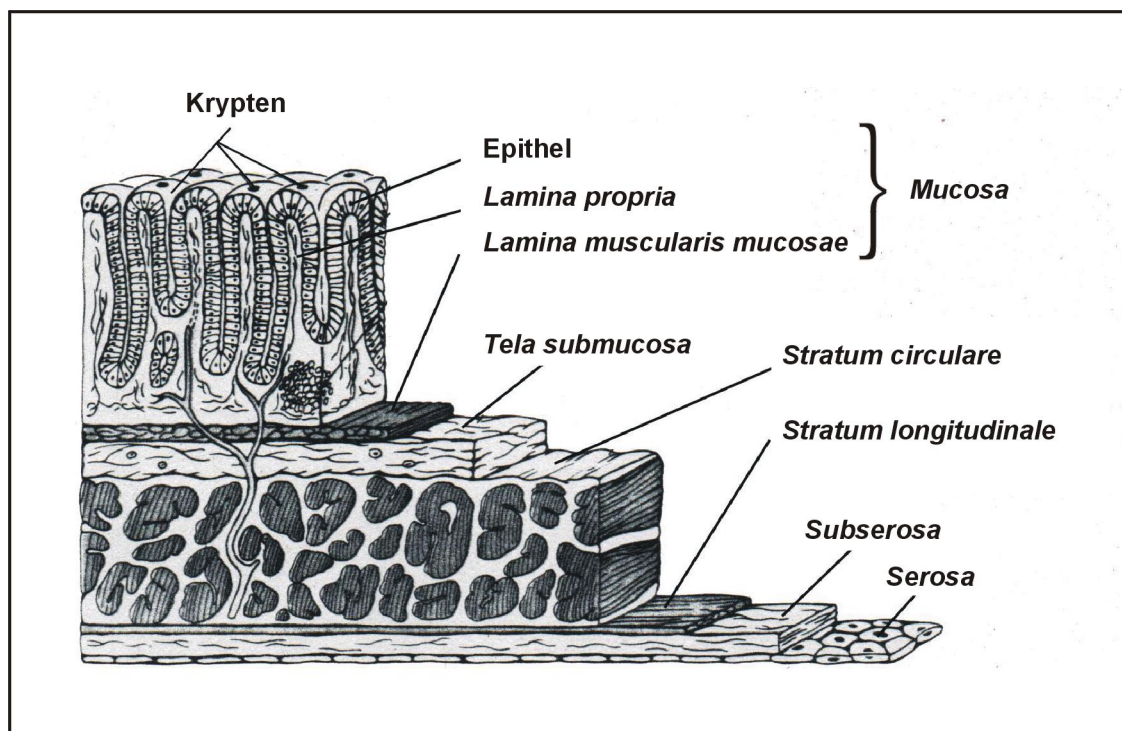


Abbildung 1: Aufbau der Darmwand nach Feldmann und Boland, 2000

Das Lumen des Darms wird von einer spezialisierten Schleimhaut, der *Mucosa*, ausgekleidet. Dieser *Mucosa* sind die meisten physiologischen Aufgaben des Darms zuzuordnen. Sie ist von einer Epithelzellschicht bedeckt (vgl. Abbildung 1). Die Epithelzellen sind auf einer, das Oberflächenepithel vom Stroma abgrenzenden, Basalmembran fixiert und bilden unregelmäßige Gewebserhebungen, sogenannte Zotten (Dünndarm), und Gewebseinsenkungen, sogenannte Krypten (Dünndarm und Dickdarm), aus.

Das Gewebe unter der Epithelzellschicht, die *Lamina propria*, wird von Lymphgefäßen, Blutgefäßen und Nervenbahnen durchzogen. Im Bindegewebe der *Lamina propria* finden sich hauptsächlich Myofibroblasten, Mastzellen, Lymphozyten und Makrophagen. Das vorherrschende Gewebeprotein im Darm ist Kollagen, das von Myofibroblasten und glatten Muskelzellen produziert wird.

Die *Lamina propria* wird durch die *Lamina muscularis mucosae* von der *Tela submucosa* getrennt. Die *Lamina muscularis mucosae* ist eine etwa fünf Zellen dicke Schicht von glatten Muskelzellen. Diese spielen eine Rolle bei der Darmmotilität.

Zur Tiefe hin folgt der *Mucosa* eine zweite Schicht (*Tela submucosa*), die aus lockerem Bindegewebe, einem losen Maschenwerk aus dünnen Kollagenfibrillen, besteht und von Blutgefäßen und Lymphbahnen durchzogen wird.

Lateral von der *Tela submucosa* schließt sich eine dritte Schicht an, die *Muscularis propria*. Sie ist aus Ringmuskulatur (*Stratum circulare*) und aus Längsmuskulatur (*Stratum longitudinale*) aufgebaut, die beide aus glatter Muskulatur bestehen und für die Motilität des Darms verantwortlich sind.

An der Außenseite der *Muscularis propria* liegt eine Bindegewebeschicht (*Subserosa*), die zumeist von *Peritoneum* umgeben ist (*Serosa*). Die *Serosa* ist beim Dünndarm durch ein Band (*Mesenterium*) an der hinteren Bauchwand befestigt.

Die Hauptaufgaben des Darmes bestehen in der terminalen Verdauung und Resorption von Nahrungsbestandteilen sowie in der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Des Weiteren spielt auch die Abwehr von Nahrungsantigenen und Krankheitserregern eine wichtige Rolle.

Durch Maximierung der Kontaktfläche wird eine möglichst effiziente Ausübung dieser Funktionen gewährleistet. Die Vergrößerung der Oberfläche wird durch unterschiedliche Prinzipien erreicht: Neben Aus- und Einstülpungen der *Lamina propria* (Zotten und Krypten) charakterisieren Falten (*Plicae circulares*) die Oberfläche des Darms. Die Epithelzellen tragen durch eine apikale Ausbildung von Mikrovilli zusätzlich zur Oberflächenerweiterung bei.

1.2 Krypten

Intestinale Epithelzellen entwickeln sich aus Stammzellen, die an der Basis einer Krypte lokalisiert sind und anschließend entlang der Kryptenachse Richtung Lumen wandern. Dort findet ein Ablösen und Abstoßen der Epithelzellen statt (Potten und Allen, 1977). Sie sterben durch Apoptose, Verlust der Zellverankerung oder Abschilferung (Pretlow, 1995; Potten *et al.*, 1997a). Gastrointestinale Stammzellen sind pluripotent und Vorläufer aller Zellen des Epithels (Wong und Wright, 1999). Aus Stammzellen gehen Kolonozyten, Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Panethzellen hervor. Bis heute gibt es keinen geeigneten Stammzellmarker, obwohl den Stammzellen eine wichtige Rolle bei der Karzinomentstehung zugeschrieben wird (Biasco *et al.*, 1992; Potten *et al.*, 1997b; Potten, 1998).

Die regenerative Kapazität des Darmepithels ist erstaunlich: Der Lebenszyklus einer Epithelzelle erstreckt sich im Dickdarm über drei bis acht Tage, im Dünndarm über vier bis sechs Tage. Eine Krypte ist durch ein gut ausbalanciertes Gleichgewicht von Proliferation (basaler Bereich der Krypte), Differenzierung und Absterben (luminaler Bereich der Krypte) von intestinalen Epithelzellen gekennzeichnet (Shanmugathasan und Jothy, 2000). Die dadurch gewährleistete ständige Erneuerung des Gewebes hängt von vielen Regulationsfaktoren ab. Dabei spielen Cadherin-vermittelte Zell-Zell- und Integrin-vermittelte Zell-Matrixkontakte eine wichtige Rolle sowie die Konfiguration der Basalmembran und die TGF β -Expression (Dodge *et al.*, 1990; Perreault *et al.*, 1995; Konstantakos *et al.*, 1996; Siu *et al.*, 1997; Basora *et al.*, 1998). Die genauen Regulationsmechanismen sind aber nach wie vor Gegenstand der Diskussion und im Detail nicht geklärt.

Eine Dysregulation des Gleichgewichts von Proliferation und Absterben kann zu einer klonalen Expansion, zu einer Überproduktion von Zellen führen. Der programmierte Zelltod ist aber neben der Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts auch dafür verantwortlich, dass Kolonozyten mit DNA-Schäden eliminiert werden. Sind also bei einem gestörten Gleichgewicht die Proliferationsraten erhöht und zugleich Apoptosemechanismen defekt, inaktiviert oder abgeschaltet, so können sich DNA-Schäden manifestieren. Dies führt zu einer Erhöhung des Karzinomrisikos (Potten *et al.*, 1997a; Hao *et al.*, 2001).

2. Kolonkarzinom

Die Inzidenz kolorektaler Karzinome (KRK) hat sich in der Bundesrepublik von 1960 bis 1980 verdoppelt. Im Jahr 1996 verstarben 30460 Patienten an einem kolorektalen Karzinom, das somit nach Lungenkarzinomen die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache darstellt. 1996 wurden über 50000 Neuerkrankungen registriert. Das Lebenszeitrisiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt in Deutschland ca. 6 %. Die Mehrzahl der Karzinome tritt nach dem 50. Lebensjahr auf (Schmiegel *et al.*, 1999).

Kolonkarzinome können auf unterschiedlichen Wegen entstehen. Diese Wege können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: erblich und sporadisch.

Zur Gruppe „erblich“ gehören das familiäre adenomatöse polypöse Syndrom (*familial adenomatous polyposis*, FAP), das erbliche nicht-polypöse Kolonkarzinom Syndrom (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC) und andere seltene polypöse Syndrome, wie z.B. das juvenile polypöse Syndrom und das Peutz Jeghers Syndrom (Übersicht bei Sutherland *et al.*, 1998). Es wird geschätzt, dass ca. 5 % der Kolonkarzinome auf genetischen Syndromen mit autosomaldominantem Erbgang beruhen (Cunningham und Dunlop, 1994; Augenlicht *et al.*, 1996).

Für das FAP-Syndrom konnte das verantwortliche Gen identifiziert und charakterisiert werden: *APC (adenomatous polyposis coli)* ist auf Chromosom 5q21 lokalisiert (Kinzler *et al.*, 1991; Pretlow *et al.*, 1992; Miyoshi *et al.*, 1992; Pretlow *et al.*, 1994). Dies ermöglicht heute eine Identifikation von Risikopatienten mittels direkter Genotypanalyse in ca. 80 % der Fälle. Das FAP-Syndrom ist für ca. 1 % aller Kolonkarzinome verantwortlich, wobei das Karzinomrisiko 100 % beträgt (Frank, 2001).

Das HNPCC-Syndrom wurde initial familiäres Karzinomsyndrom, später auch Lynch-Syndrom I bzw. Lynch-Syndrom II genannt (je nach Tumormuster, Lynch *et al.*, 1988). Treten ausschließlich kolorektale Karzinome auf, so handelt es sich um Lynch-Syndrom I. In ca. 30 % entwickeln HNPCC-Patienten zusätzlich Malignome in anderen Geweben, wie z. B. Endometrium, Magen, Pankreas, Gallenwege oder Harntrakt. In diesen Fällen spricht man von Lynch-Syndrom II. Das HNPCC-Syndrom ist allgemein charakterisiert durch ein frühes Manifestationsalter (durchschnittlich 44 Jahre), durch ein bevorzugtes Auftreten von Karzinomen im proximalen Kolon (60 bis 70 %) sowie durch ein gehäuftes Auftreten von syn- und metachronen Kolon-

karzinomen (Vasen, 1994). Als genetische Grundlage konnte in ca. 80-90 % aller HNPCC-Fälle eine Mikrosatelliteninstabilität (MIN) festgestellt werden (s. I.2.3.2). Das HNPCC-Syndrom weist ein Karzinomrisiko unter 80 % auf (Frank, 2001).

Die Mehrheit der Kolonkarzinome sind in die zweite Gruppe einzuordnen, in die Gruppe „sporadisch“. Für die Entwicklung eines sporadisch auftretenden Kolonkarzinoms scheinen Umweltfaktoren und Ernährung eine wichtige Rolle zu spielen. Diese Kolonkarzinome stellen ein gut charakterisiertes Beispiel der Multistep-Karzinogenese mit genotypischen Veränderungen dar.

Kolonkarzinome bieten ein exzellentes System für das Studium von genetischen Veränderungen, die an der Entstehung eines weit verbreiteten humanen Neoplasmas beteiligt sind. Zahlreiche klinische und histopathologische Daten legen nahe, dass die meisten, wenn nicht alle, malignen kolorektalen Tumore (Karzinome) aus benignen Tumoren (Adenome) hervorgehen (Sugarbaker *et al.*, 1985).

Genetische Instabilität ist ein integraler Bestandteil menschlicher Tumore. Sie äußert sich durch Aneuploidie, chromosomale Aberration, Allelverlust oder Verlust bzw. Austausch einzelner Nukleotide (Fearon *et al.*, 1990; Loeb, 1991; Hartwell, 1992; Perucho, 1996; Lengauer *et al.*, 1998; Fullwood *et al.*, 1999).

Charakteristisch für eine Neoplasie ist ein gestörtes Gleichgewicht von Zellproliferation und Zelltod. Vereinfacht gesehen heißt dies, dass eine maligne Neoplasie die Konsequenz einer Aktivierung und/oder einer Unterdrückung von Genen ist, die Zellproliferation oder Apoptose regulieren (Lengauer *et al.*, 1998).

Bis heute konnten drei Hauptgentypen identifiziert werden, die in der Tumorgenese eine Rolle spielen: Tumorsuppressorgene (I.2.1), Onkogene (I.2.2) und Mismatch-Reparaturgene (I.2.3.2).

2.1 Tumorsuppressorgene

Genprodukte von Tumorsuppressorgenen regulieren Wachstum und Differenzierung von Zellen auf eine negative Art und Weise und supprimieren somit indirekt neoplastische Vorgänge. Sie behindern die Expression von (Proto-)Onkogenen, vermindern die Aktivität von Onkogenprodukten oder machen deren Effekte rückgängig (Marshall, 1991). Die Tumor-unterdrückende Wirkung von Genprodukten einiger Tumorsuppressorgene gilt als gesichert. Hierzu zählen unter anderem das

Protein p53, der cyclinabhängige Kinaseinhibitor CDKN2 und das Genprodukt des Retinoblastomgens *rb* (Sparkes *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1987; Hansen und Cavenee, 1987; Hansen und Cavenee, 1988). Viele weitere potentielle Tumorsuppressorgene werden diskutiert wie beispielsweise die Gene für das Ubiquitin-aktivierende Enzymhomolog UBE1L, für Tropomyosin β (TM1), H-ras, Dinukleosid-Phosphatase-Hydrolase und für Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor-Typ γ (PTPR γ) (Pitterle *et al.*, 1998).

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Tumorsuppressorgene auf zellulärem Niveau „rezessiv“ agieren, d.h. dass beide Allele inaktiviert sein müssen, damit der zelluläre Phänotyp sich ändert und das Gen somit seine wachstumshemmende Funktion verliert (Knudson, 1985; Knudson, 1993). Zwei unabhängige Ereignisse sind für den Verlust beider Allele eines Tumorsuppressorgens nötig, um eine gesunde Zelle zu transformieren (*two-hit-model*) (Knudson, 1971; Cavenee *et al.*, 1983). Mögliche Ereignisse dafür sind Punktmutationen, falsche Rekombination während der Mitose oder Verlust eines Chromosomenbruchstückes oder eines ganzen Chromosoms (*loss of heterozygosity*, LOH).

Der Verlust von chromosomalen Regionen ist ein häufiges Ereignis bei kolorektalen Neoplasien. Normalerweise ist dabei nur eines der beiden elterlichen Allele betroffen. Von solchen Allel-Verlusten sind häufig Regionen betroffen, in denen Tumorsuppressorgene liegen. So fehlen z.B. in 75 % aller Kolonkarzinom-Fälle Teile des Chromosoms 17p (Vogelstein *et al.*, 1988; Delattre *et al.*, 1989), die *p53* enthalten (Baker *et al.*, 1989). Die zweithäufigste Region, die in 70 % aller Kolonkarzinome und in 50 % aller späten Adenome von Allel-Verlusten betroffen ist, ist Chromosom 18q (Vogelstein *et al.*, 1988; Delattre *et al.*, 1989). In dieser Region konnten mehrere Kandidaten-Tumorsuppressorgene identifiziert werden: das Gen eines Zelladhäsionsproteins, *DCC* (*deleted in colon carcinoma*), sowie die Gene für SMAD2 und SMAD4. SMAD-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der TGF β -Signaltransduktion (TGF β , *transforming growth factor beta*).

Es gibt natürlich auch Ausnahmen, die nicht dem *two-hit-model* folgen. So sind z.B. für *p53* Mutationen mit dominant negativem Effekt bekannt, die den zellulären Phänotyp bereits durch ein mutiertes Allel verändern (Herskowitz, 1987). Auch kann ein geringer Expressionsgrad des Genprodukts eines Tumorsuppressorgens an der Entstehung eines Neoplasmas beteiligt sein, wie es für *DCC* vermutet wird (Hoffman und Edelman, 1983; Fearon und Vogelstein, 1990).

2.2 Onkogene

Genetische Veränderungen wie Punktmutationen oder Deletionen führen häufig zu einer reduzierten Expression bzw. zu einer Geninaktivierung. Sind Proto-Onkogene betroffen, können somatische Mutationen sowie chromosomale Translokationen oder abnormale Genamplifizierungen eine Hyperaktivierung zur Folge haben. Genprodukte von Proto-Onkogenen erfüllen in gesunden Zellen wichtige zelluläre Funktionen. Sie agieren z.B. als Proteinkinasen, Wachstumsfaktoren oder G-Proteine und fördern somit Zellwachstum und -proliferation. Bishop (1987) zeigte unterschiedliche Mechanismen auf, wie Onkogene aktiviert werden können:

1. Durch chromosomale Translokationen kann ein Gen konstitutiv aktiviert werden. Damit ist keinerlei Regulation mehr möglich.
2. Durch Genamplifizierung sowie durch chromosomale Translokation in die Nähe eines starken Promotors, durch Insertion von retroviraler DNA in die Onkogensequenz oder Integration des Onkogens in ein retrovirales Genom kann eine Überexpression hervorgerufen werden.
3. Somatische Mutationen können eine veränderte Substratspezifität bewirken oder Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren schaffen.

Eine Mutation in einem der beiden elterlichen Allele reicht aus, um ein Proto-Onkogen in ein Onkogen umzuwandeln, und damit eine Stimulation der Zellteilung auszulösen (Friend *et al.*, 1988; Sutherland *et al.*, 1998).

Beim kolorektalen Karzinom spielen Mutationen im *ras*-Onkogen eine bedeutende Rolle. In ca. 50 % aller Karzinome und Adenome, die größer als 1 cm sind, findet man Mutationen in *ras* (Forrester *et al.*, 1987; Bos *et al.*, 1987; Vogelstein *et al.*, 1988). Auch *c-myc* ist ein häufig involviertes Onkogen (Sugarbaker *et al.*, 1985; Roncucci *et al.*, 1993).

Somatische Mutationen werden für das kolorektale Karzinom häufig beschrieben, während Genamplifikationen oder chromosomale Translokationen als nicht so bedeutend eingestuft werden (Fearon und Vogelstein, 1990).

2.3 Phänotypen des Kolonkarzinoms

2.3.1 CIN-Phänotyp

Ca. 80 % aller Kolonkarzinom-Fälle sind durch chromosomale Instabilität (CIN) gekennzeichnet. Bedingt durch Defekte in der Anaphase der Mitose kommt es häufig zu einer abnormalen Chromosomenzahl, einer Aneuploidie (Lengauer *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1999). Dabei spielen Defekte im Aufbau des Spindelfaser-Apparats eine entscheidende Rolle (Cahill *et al.*, 1998). Neben Aneuploidie ist LOH ein markantes Merkmal von Kolonkarzinomen des CIN-Phänotyps.

Weiterhin lässt sich dieser Phänotyp dadurch charakterisieren, dass einige Onko- und Tumorsuppressorgene (*k-ras*, Forrester *et al.*, 1987; *p53*, Baker *et al.*, 1989; *DCC*, Fearon und Vogelstein, 1990; *APC*, Kinzler *et al.*, 1991) regelmäßig an der Tumorgenese beteiligt sind. Daher rührt auch die Bezeichnung „Tumorsuppressor-Phänotyp“.

Die Tumorgenese des Kolonkarzinoms mit CIN-Phänotyp ist eines der am besten charakterisierten Beispiele der Multistep-Karzinogenese (Fearon und Vogelstein, 1990). Das Kolonkarzinom wird als Ergebnis einer Kumulation onkogenetischer Ereignisse gesehen, wobei Hinweise existieren, die für eine sequentielle Kumulation sprechen. Eine Mutation im *APC* Gen scheint ein sehr frühes Ereignis zu sein, gefolgt von einer Aktivierung von *c-k-ras* sowie einer Inaktivierung von *DCC* und *p53* (Abbildung 2). Eine Mutation im *APC* Gen wird dafür verantwortlich gemacht, dass sich die Proliferationszone innerhalb einer Krypte Richtung Lumen verschiebt. Durch kontinuierliche Proliferation kommt es zur Akkumulation von Zellen im Lumenbereich und zur Entstehung von Polypknospen (Abbildung 2a). Eine Akkumulation weiterer onkogenetischer Ereignisse führt zum Wachstum und zur malignen Entartung von Adenomen und letztlich zur Invasion und Metastasierung (Abbildung 2b).

Darüber hinaus zeigt sich, dass Tumore mit zunehmender Zahl genetischer Alterationen wesentlich aggressiver im klinischen Erscheinungsbild sind (Laurent-Puig *et al.*, 1992; Hamelin *et al.*, 1994; Iino *et al.*, 1994; Jen *et al.*, 1994a).

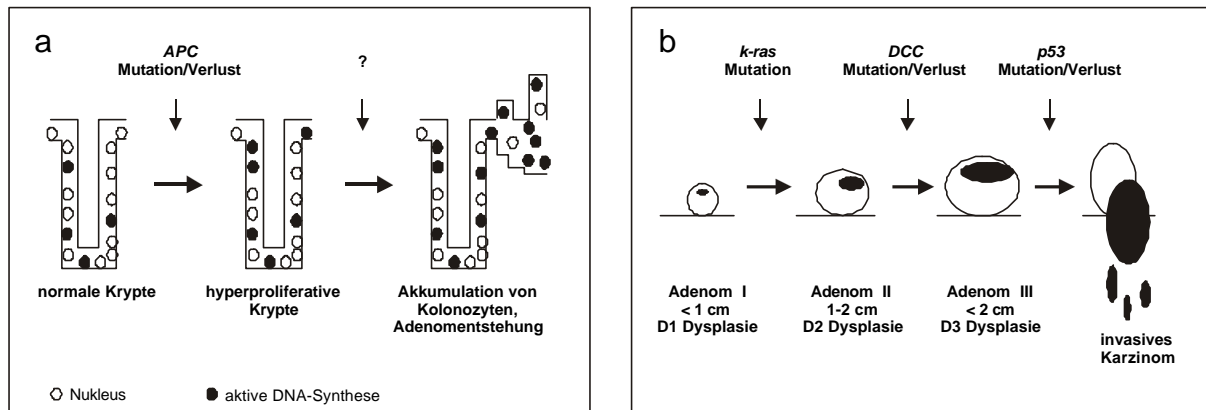


Abbildung 2: Mehrschrittconcept des Kolonkarzinoms (modifiziert nach Fearon und Vogelstein, 1990)

Dysplasieregrade: D1 niedrig-gradige Dysplasie, D2 mittel-gradige Dysplasie, D3 hoch-gradige Dysplasie

2.3.2 MIN-Phänotyp

Mikrosatelliteninstabilität (MIN) ist ein neues molekulares Merkmal, das bei einer beträchtlichen Anzahl humaner Tumore auftritt. Dieser Phänotyp wird als MIN- oder *replication error-* (RER-) Phänotyp bezeichnet. MIN entsteht durch Veränderungen in kurzen, sich wiederholenden DNA-Sequenzen (*repeats*), die über das Genom verteilt und hoch polymorph sind. Längenveränderungen in diesen Mikrosatellitensequenzen treten in ca. 90 % aller HNPCC-Fälle und in ca. 15 % aller sporadischen kolorektalen Tumore auf (Aaltonen *et al.*, 1993; Aaltonen *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1994; Kullmann *et al.*, 1996). Insgesamt sind 10 bis 20 % aller Kolonkarzinome betroffen (Martin *et al.*, 1999).

MIN kommt vor allem in nicht-kodierenden Bereichen des Genoms vor. Bisher sind Instabilitäten nur in wenigen kodierenden Genombereichen gefunden worden. Dazu gehören die Gene für *transforming growth factor β receptor type II* (TGF β IIIR, Markowitz *et al.*, 1995), für *insulin-like growth factor receptor type II* (IGFIIR, Souza *et al.*, 1996), für den Apoptose-Regulator BAX (Rampino *et al.*, 1997), für den Zellzyklus-regulierenden Transkriptionsfaktor E2F-4 (Yoshitaka *et al.*, 1996), für TCF-4 (Duval *et al.*, 1999), für Caspase-5 (Schwartz *et al.*, 1999), für CDX2 (Wicking *et al.*, 1998), für hMSH3 und hMSH6 (Malkhosyan *et al.*, 1996).

Mit MIN werden ungenügende DNA-Replikationsgenauigkeit und defekte post-replikative DNA-Reparaturmechanismen assoziiert, die durch Mutationen in Mismatch-Reparaturgenen bedingt sind und während der Replikation der DNA eine er-

höhte Mutationsrate auf Nukleotidebene zur Folge haben (Nowell, 1986; Umar *et al.*, 1994).

Ein intaktes DNA-Reparatursystem erkennt und behebt Schäden bei der Neusynthese von DNA und stoppt den Zellzyklus, wenn größere DNA-Schäden vorliegen (Boland, 1996). Bis heute sind acht verschiedene Mismatch-Reparaturgene bekannt: *msh2*, *msh3*, *msh5*, *msh6*, *pms1*, *pms2*, *mlh1*, *mlh3* (Her und Doggett, 1998; Lynch und de la Chapelle, 1999; Lipkin *et al.*, 2000). In 60 % aller HNPCC-Fälle können z.B. Mutationen bei *msh2* und *mlh1* festgestellt werden und in 6 % Mutationen bei *pms1* und *pms2* (Liu *et al.*, 1996).

3. Aberrante Crypt Foci (ACF)

Eines der frühen Ereignisse in der Entstehung des Kolonkarzinoms ist die Veränderung des Proliferationsmusters von Epithelzellen in Kolonkrypten (Lipkin und Higgins, 1988; Lipkin, 1988). Aber auch fehlerhaft funktionierende Apoptosemechanismen leisten ihren Beitrag zu den ersten Schritten der Karzinogenese (Bedi *et al.*, 1995). Das Ergebnis ist das Wachstum von Polypen, die mittels Koloskopie entdeckt und aus der Darmmukosa entfernt werden können. Kein Zweifel besteht daran, dass dysplastische Adenome Vorläufer von Karzinomen sind (Muto *et al.*, 1975).

Allerdings wurden vor einigen Jahren histologische Veränderungen in normal erscheinender Mukosa entdeckt, die weit vom Tumor entfernt lokalisiert waren (Shamsuddin *et al.*, 1981). Bird beschrieb 1987 bei Mäusen, die mit dem Karzinogen Azoxymethan behandelt wurden, erstmals Krypten, die bei der mikroskopischen Untersuchung einer Methylenblau-gefärbten Mukosa-Oberfläche größer, dicker und dunkler erschienen (Bird, 1987). Diese Krypten wurden als aberrante Krypten, ganze Kluster dieser Krypten als *aberrant crypt foci* (ACF) bezeichnet und als mögliche Vorstufe des Kolonkarzinoms diskutiert (Tudek *et al.*, 1989). 1991 erscheinen die ersten Beschreibungen von ACF am humanen Darm (Pretlow *et al.*, 1991; Roncucci *et al.*, 1991).

3.1 Morphologische, topologische und histologische Daten

Elektronen- (Paulsen *et al.*, 1994) sowie lichtmikroskopische Untersuchungen (Di Gregorio *et al.*, 1997) haben gezeigt, dass die luminalen Öffnungen von aberranten Krypten größer sind als die von normalen Krypten und uneinheitlicher geformt (rund, gezackt oder länglich). Desweiteren sind ACF auf der Mukosa-Oberfläche leicht erhaben und zeigen im Vergleich zu normalen Krypten eine intensivere Vital-Färbung mit Methylenblau.

In vereinzelt Fällen waren in Längsschnitten Verzweigungen im luminalen Bereich von aberranten Krypten zu beobachten (Yamashita *et al.*, 1995a). Lymphoide Follikel wurden im Bereich der Basis von aberranten Krypten beschrieben (Shpitz *et al.*, 1998).

ACF sind durch ein hyperproliferatives Epithel gekennzeichnet (Roncucci *et al.*, 1993; Otori *et al.*, 1995) und weisen eine erhöhte Expression der Proliferationsmarker *carcinoembryonic antigen* (CEA, Pretlow *et al.*, 1994) sowie *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA, Shpitz *et al.*, 1997; Shpitz *et al.*, 1998) auf. Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen PCNA zeigten, dass sich neben der erhöhten Expression von PCNA in ACF auch eine Verschiebung der Proliferationszone von basal in Richtung luminal manifestiert. Diese Verschiebung ist sowohl in hyperplastischen als auch in dysplastischen ACF zu beobachten, wobei sich die Verschiebung in dysplastischen ACF ausgeprägter zeigt.

Histologisch können ACF sehr heterogen sein. Bisher wurden bis zu vier „Phänotypen“ beschrieben (Roncucci *et al.*, 1991; Pretlow *et al.*, 1994; Nucci *et al.*, 1997; Roncucci *et al.*, 1998; Shpitz *et al.*, 1998). Sie wurden von Di Gregorio *et al.* (1997) aufgrund cytologischer und histologischer Merkmale erstmals in drei Gruppen eingeteilt (vgl. Tabelle 1): Aberrante Krypten aus Gruppe A (hypertrophische ACF) grenzen sich von normalen Krypten hauptsächlich durch die Größe der Krypten und der Kryptenlumina ab. Aberrante Krypten der Gruppe B zeigen hyperplastische Merkmale. Auffällig sind v. a. gezackte Kryptenlumina. Aberrante Krypten der Gruppe C sind durch Dysplasie und sehr kleine Kryptenlumina charakterisiert. ACF vom Typ C zeigen im Vergleich zu ACF vom Typ A oder B die kleinste Anzahl an Einzelkrypten. Die prozentuale Häufigkeit des Auftretens dieser Gruppen ist in Tabelle 2 dargestellt. Tabelle 3 zeigt dies für andere Einteilungen der Gruppen.

Tabelle 1: Klassifizierung von ACF in drei Gruppen nach Di Gregorio *et al.* (1997)

	Gruppe A hypertrophisch	Gruppe B hyperplastisch	Gruppe C dysplastisch
Charakteristika des Kerns der Epithelzellen			
Größe	normal	vergrößert	vergrößert
Umriss	normal	normal/vesikulär	vesikulär/normal
Häufung*	-	+	+
Stratifizierung	-	-	+
Verlust der Polarität	-	-	+
Mucin-Ausschüttung	-	+	+
Zahl der Mitosen	0-3	1-3	>3
Dysplasie	-	-	+
Anzahl an Einzelkrypten pro Focus			
	28	45	21

* Zunahme an basal lokalisierten und überlappenden Kernen

Tabelle 2: Verteilung der ACF-Gruppen nach Di Gregorio *et al.* (1997) innerhalb des Kolonkarzinoms

	hypertrophisch [%]	hyperplastisch [%]	dysplastisch [%]
Di Gregorio <i>et al.</i> , 1997	73	19	8
Roncucci <i>et al.</i> , 1998	73	17	10
Bouzourene <i>et al.</i> , 1999*	35*	57	8

* Hypertrophische ACF werden bei Bouzourene *et al.* (1999) als Gruppe mit „normaler Mukosa“ bezeichnet.

Tabelle 3: Verteilung der ACF-Gruppen nach Nucci *et al.* (1997) innerhalb des Kolonkarzinoms

		hyperplastisch [%]	dysplastisch [%]
FAP-Syndrom	Nucci <i>et al.</i> , 1997	21	79
sporadisches Kolonkarzinom	Nucci <i>et al.</i> , 1997	100	0
	Shpitz <i>et al.</i> , 1998	71	21

In Patienten mit hohem Malignom-Risiko (Patienten mit FAP-Syndrom oder Kolonkarzinom) findet man eine hohe Zahl an ACF, während Patienten mit benignen, nicht-neoplastischen Krankheiten weniger ACF aufweisen (Roncucci *et al.*, 1991; Pretlow *et al.*, 1992; Shpitz *et al.*, 1998). Die Dichte von ACF (Anzahl ACF pro cm² Mukosa) im humanen Darm von Kolonkarzinom-Patienten variiert sehr stark. Die Dichte im Kolon nimmt allgemein von proximal (0,078 ACF/cm², Di Gregorio *et al.*, 1997) Richtung Rektum (0,194 ACF/cm², Di Gregorio *et al.*, 1997) zu, während die Anzahl an Krypten pro Focus abnimmt (Di Gregorio *et al.*, 1997; Roncucci *et al.*, 1998; Shpitz *et al.*, 1998).

3.2 Molekulare Daten

Die ersten genetischen Veränderungen, die in ACF beschrieben wurden, sind Mutationen in *k-ras* (Pretlow *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1994). Bezüglich dem Vorkommen dieser Mutationen gibt es divergente Ergebnisse. Jen *et al.* (1994b), Yamashita *et al.* (1995b), Losi *et al.* (1996) und Nucci *et al.* (1997) beschreiben *k-ras* Mutationen ausschließlich in hyperplastischen ACF, während Takayama *et al.* (1998) *k-ras* Mutationen auch in mehr als 50 % der untersuchten dysplastischen ACF fanden. Mit Ausnahme einer Studie (Smith *et al.*, 1994) wurden in mehr als 50 % aller untersuchten ACF *k-ras* Mutationen detektiert (Tabelle 4), wobei aber allgemein pro ACF eine sehr geringe Anzahl an mutierten Zellen vorlag. Lokalisiert werden konnten Mutationen in Kodon 12 (Otori *et al.*, 1995; Yamashita *et al.*, 1995b) und Kodon 13 (Yamashita *et al.*, 1995b, s. Tabelle 4).

APC Mutationen konnten in Patienten sowohl mit FAP-Syndrom als auch mit Kolonkarzinom nur in dysplastischen ACF gefunden werden (s. Tabelle 5; Smith *et al.*, 1994; Jen *et al.*, 1994b; Otori *et al.*, 1998).

Tabelle 4: *k-ras* Mutationen in ACF

	Kodon 12 Mutationen [%]	Kodon 13 Mutationen [%]
Pretlow <i>et al.</i> , 1993	73	n.u.
Smith <i>et al.</i> , 1994	13 G→T (6), G→A (7)	n.u.
Yamashita <i>et al.</i> , 1995b*	40 G→T (19), G→A (21)	12 GAC
Losi <i>et al.</i> , 1996	57 G→T (43), G→A (14)	n.u.

n.u. nicht untersucht

* Bei 58 % aller untersuchten Fälle wurden Mutationen gefunden. 6 % zeigten andere Mutationen.

Tabelle 5: APC Mutationen in ACF

	Häufigkeit [%]	Bemerkung
Smith <i>et al.</i> , 1994	5	Deletion von 5 bp (Kodon 1061-1063)
Otori <i>et al.</i> , 1998	46	6 % bei milder Dysplasie 40 % bei starker Dysplasie

P53-Akkumulation oder Mutationen in *p53* konnten in ACF von Yamashita *et al.* (1995b) und Losi *et al.* (1996) nicht gefunden werden. Nur Shivapurkar *et al.* (1997) beschreiben in einer Studie den Fall eines Patienten mit *p53* Mutationen in ACF. In dysplastischen ACF von Patienten mit FAP wurde eine Herunterregulierung von $p21^{WAF1/CIP1}$, dessen Transkription durch *p53* reguliert wird, beschrieben (Polyak *et al.*, 1996). Dies weist auf eine veränderte Zellzyklusregulation in ACF hin.

Eine Untersuchung der Expression des Kandidaten-Tumorsuppressorgens *fragile histidine triad (fhit)* ergab eine Herunterregulierung in einer sehr geringen Anzahl an ACF bei Patienten mit sporadischem Kolonkarzinom. Auffallend war dabei, dass die verminderte Expression mit dem Dysplasiegrad korrelierte. Patienten mit FAP-Syndrom zeigten keinerlei Reduktion der FHIT-Expression in ACF (Hao *et al.*, 2000). MIN konnte in einer kleinen Anzahl an ACF (ca. 10 %) nachgewiesen werden (Heinen *et al.*, 1996; Augenlicht *et al.*, 1996). Dies wird als Hinweis dafür betrachtet, dass MIN ein sehr frühes Ereignis in der Tumorgenese sein könnte.

Im Vergleich zu normalen Krypten wurde in ACF eine um 50 % verminderte Expression von *inducible nitric oxide synthase (iNOS)* gezeigt (Hao *et al.*, 2001).

Siu *et al.* (1999) erbrachte den Nachweis, dass sowohl hyper- als auch dysplastische ACF zu einem hohen Prozentsatz monoklonal und damit neoplastisch sind, indem er das Muster der Inaktivierung von Chromosom X untersuchte. Dies steht in Einklang mit der These von Fialkow (1974 und 1979), dass ein Tumor aus einer einzelnen betroffenen Zelle entstehen kann.

4. Fragestellung

Als ein Schwerpunkt der Arbeit wurde das als Tumorsuppressorgen diskutierte Gen der Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor-Typ γ (*ptprg*) näher untersucht. Phosphorylierungsgrad und -muster spielen eine zentrale Rolle bei Wachstumskontrolle, Differenzierung, Metabolismus und Zellzyklusregulation (Hanks *et al.*, 1988; Ullrich und Schlessinger, 1990; Tonks und Neel, 1996). In einer gesunden Zelle wird der Phosphorylierungsgrad auf einem niedrigen Niveau gehalten (Hunter, 1989), da Phosphatasen eine 10- bis 1000-fach höhere Aktivität zeigen als die antagonistisch wirkenden Kinasen (Fischer *et al.*, 1991). Phosphatasen werden deshalb als potentielle Tumorsuppressoren untersucht.

Protein-Tyrosin-Phosphatasen hydrolysieren spezifisch Tyrosin-Phosphoester-Bindungen und werden in zwei Unterklassen eingeteilt: cytoplasmatische mit niedrigem Molekulargewicht und schwere Transmembranformen (Kaplan *et al.*, 1990). Die Transmembranformen zählen zu der Immunglobulin-Oberfamilie der Zelladhäsionsmoleküle und sind aus einem konservierten intrazellulären Bereich, einer Transmembrandomäne und einem variablen extrazellulären Bereich aufgebaut. In dieser Arbeit wurde ein Vertreter der Transmembranform, Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor-Typ γ (PTPR γ), bezüglich seiner Rolle in der Kolon-Karzinogenese näher untersucht.

Folgendes konnte in Vorarbeiten (Kullmann *et al.*, 1999; Wyschkony, 2000) bereits gezeigt werden:

In Untersuchungen zur differentiellen Genexpression wurde eine Hochregulierung von *ptprg*-mRNA im Gewebe von Kolontumoren im Vergleich zu normaler Mukosa beobachtet. Hierzu wurden intestinale Epithelzellen aus neoplastischen Kolonkrypten und dem korrespondierenden Normalgewebe isoliert und daraus RNA gewonnen. Ein Screening der exprimierten mRNAs wurde durch RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) erzielt (Kullmann *et al.*, 1999).

Das Gen *ptprg*, das in einer sehr labilen und für Deletionen und Translokationen sehr anfälligen Region liegt (3p14.2) (LaForgia *et al.*, 1993; Druck *et al.*, 1995), ist in Kolonkarzinomzelllinien vorhanden, während die mRNA in bestimmten Zelllinien (HT-29 und SW620, beide CIN-Phänotyp) nicht transkribiert wird (Wyschkony, 2000). Mutationen im Promotorbereich als Ursache für die fehlende Transkription konnten ausgeschlossen werden (Wyschkony, 2000).

Bezugnehmend auf die bereits vorhandenen Daten sollten folgende Punkte beleuchtet werden:

- 1. Expression der *ptprg*-mRNA in einer größeren Anzahl an Fällen (normales Kolongewebe *versus* Kolontumor) und Lokalisation von *ptprg*-mRNA im Gewebe mittels *in situ* Hybridisierung**
- 2. Überexpression von *ptprg*-mRNA in Kolonkarzinom-Zelllinien**

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Charakterisierung molekularer Veränderungen in frühen Präneoplasien (aberranten Krypten bzw. Adenomen mit niedrigem Dysplasiegrad) im Zusammenhang mit der Entstehung des kolorektalen Karzinoms. Bei Präneoplasien handelt es sich meist um mikroskopisch kleine Areale, die nur im Gewebeschnitt zu erkennen sind. Auf mRNA-Ebene ist zu den molekularen Mechanismen, die in diesen Läsionen eine Rolle spielen, sehr wenig bekannt. Dies liegt wohl daran, dass Studien zur Genexpression an Gewebeschnitten durch die meist gemischten Zellpopulationen in ihrer Wertigkeit stark limitiert sind. Desweiteren sind für herkömmliche Genscreeningtechniken mRNA-Mengen erforderlich, die bisher aus kleinen Gewebeläsionen nicht präpariert werden konnten.

Deshalb mußten

- 1. neue methodische Wege entwickelt werden, um**
- 2. molekulare Profile von mikroskopisch kleinen Läsionen erstellen zu können.**

Damit verbunden war vor allem die Etablierung von neuartigen Techniken zur Isolierung von präneoplastischen Läsionen aus Gewebeschnitten und für ein anschließendes Screening der Genexpression sowie die Anpassung der Screening-Methode an ein niedriges Zellzahlniveau. Die unter Anwendung dieser Techniken gewonnenen Ergebnisse sollten vor allem neue Impulse bei der Beantwortung der kontrovers diskutierten Bedeutung von aberranten Krypten als prä-adenomatöse Vorläuferstadien liefern.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Bezugsquellen von Substanzen, Chemikalien, Enzymen und sonstigen Materialien

Stoffbezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 3000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 3000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Acrylamid-Bis-Fertiglösung (19:1)	Appligene, Illkirch, F
Acrylamid-Bis-Fertiglösung (37,5:1)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Acrylase	Stratagene, Amsterdam, NL
Agarose	FMC Bioproducts, Rockland, USA
Amphotericin B	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin-trihydrat	Sigma, Deisenhofen
<i>AmpliTaq</i> [®] DNA Polymerase, Stoffel Fragment	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
AMV Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim
APS	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
β -Mercaptoethanol	Amresco, Salon, USA
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma, Deisenhofen
BioMax [™] ML Röntgenfilm	Kodak, Rochester, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen
Ciprofloxacin	Bayer, Leverkusen
Complete [™] Proteasen Inhibitoren Cocktail	Boehringer, Mannheim
DEPC	Sigma, Deisenhofen
Digoxigenin-UTP	Boehringer, Mannheim
DMEM (1 g/l Glukose) Grundmedium	Biochrom, Berlin
DMEM (4,5 g/l Glukose) Grundmedium	Biochrom, Berlin
DNase I	Boehringer, Mannheim
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Bio-Rad, München
Einfrierröhrchen (2 ml)	Corning Costar, Bodenheim
Eosin	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Linz, A
Formalin	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Sigma, Deisenhofen
FuGENE [™] 6 Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
GelStar [®]	BMA, Rockland, USA
Geneticin (G418)	Gibco, Karlsruhe

Gentamycin	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Hematoxylin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Seromed, Berlin
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Klenow-Enzym	Boehringer, Mannheim
Kupfer-II-Sulfat-Pentahydrat	Sigma, Deisenhofen
LPC-Mikrozentrifugenröhrchen, 0,5 ml	P.A.L.M. Mikrolaser Technologie, Wolfratshausen
Luria Broth	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Domspitz, Regensburg
Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin	Dianova, Hamburg
MEM-Vitamine, 50x	Seromed, Berlin
Mineralöl, leicht	Sigma, Deisenhofen
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Natriumpyruvat, 100 mM	Biochrom, Berlin
NEAS, 100x	Biochrom, Berlin
Neu Fuchsin Färbelösung	Dako, Hamburg
Nitrocellulosemembran, 0,2 µm	Novex, Frankfurt
OCT™ Tissue-Tek®	DiaTec, Hallstadt
PBS	PAA, Linz, A
PEN-Folie	P.A.L.M. Mikrolaser Technologie, Wolfratshausen
Penicillin (10 ⁴ u/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAA, Linz, A
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
RNase-Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
RPMI 1640 Grundmedium	Gibco, Karlsruhe
SDS	Fluka, Buchs
SSC, 20x	Sigma, Deisenhofen
SuperFrost® Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Triton® X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	PAA, Linz, A
Tween®-20	Sigma, Deisenhofen
Whatman-Papier 3MM	Biometra, Göttingen
X-Gal	Gibco, Karlsruhe
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Corning Costar, Bodenheim
Zellkulturobjektträger, 4-Kammer Chamber Slide	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten, 6-Loch	Falcon, Heidelberg

Alle anderen Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Merck Eurolab, Darmstadt in *p.a.*-Qualität bezogen. Die verwendeten Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von New England Biolabs, Schwalbach bezogen.

1.2 Organismen

Tabelle 6: Organismen

Die genaue Zusammensetzung der Medien ist in II.2.1.1 aufgeführt. Hier wird nur der Grundmedium-Typ genannt. MSS (stabil) bzw. MIN (instabil) bezeichnet den Mikrosatellitenstatus der jeweiligen Kolonkarzinom-Zelllinie.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> TOP 10	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80/lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 deoR recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7696 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$	Invitrogen, Karlsruhe

Zelllinie	Herkunft	Besonderheit	Medium
HT-29	Kolon, Adenokarzinom, human	MSS	DMEM
SW480	Kolon, Adenokarzinom, human	p53 mutiert	RPMI 1640
SW620	Kolon, Adenokarzinom, human	p53 mutiert	RPMI 1640
LoVo	Kolon, Adenokarzinom, human	MIN	RPMI 1640
HCT-15	Kolon, Adenokarzinom, human	MIN	RPMI 1640
23132/87	Magen, Adenokarzinom, human		RPMI 1640
A549	Lunge, Karzinom, human		DMEM
BT-20	Brust, Adenokarzinom, human		Eagle's MEM
Caki-1	Niere, Karzinom, human		DMEM
HT1080	Fibrosarkom, human		DMEM

Fibroblasten-Primärkulturen	Herkunft		Medium
Nr. 33/37	Darm, normal, human		Darmfibroblasten-Medium
NHDF-c	Haut, normal, human		DMEM
SKDE	Sklerodermiehaute, human		DMEM
RA	Rheumatoide Arthritis, human		DMEM
OA	Osteoarthritis, human		DMEM

Bei allen verwendeten Zelllinien und Primärkulturen handelt es sich um humane, adhärenz wachsende Zellen. Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, von der American Type Cell Culture (ATCC), Rockville, USA oder von PromoCell, Heidelberg erhalten. Fibroblasten-Primärkulturen wurden von Mitarbeitern der Forschungsabteilung Innere Medizin I der Uniklinik Regensburg zur Verfügung gestellt.

1.3 Oligonukleotide

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide

Aufgeführte Oligonukleotide sind teilweise mit f oder r bezeichnet: f steht für vorwärts und r steht für rückwärts bezüglich der 5'-3'-Orientierung der DNA. T_{ann} bezeichnet die primer-spezifische „annealing“-Temperatur, die Temperatur, bei der die Primer an die DNA binden.

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')	T_{ann}	Produktlänge	Anwendung
Kin A-	CCAAATGCACCTTCACC			RAP-PCR
Kin A- nested	AATGCACCTTCA			RAP-PCR
Nuclear 1+	ACGAAGAAGAG			RAP-PCR
Nuclear 2+	AAGAAGAGCAA			RAP-PCR
OPN 21	ACCAGGGGCA			RAP-PCR
OPN 21 nested	CCAGGGGCAC			RAP-PCR
OPN 23	CAGGGGCACC			RT der RAP-PCR
OPN 24	AGGGGCACCA			RT der RAP-PCR
US 6	GTGGTGACAG			RT der RAP-PCR
US 9	GTGACAGACA			RT der RAP-PCR
ptprg1196_f ptprg1710_r	AAGGACAGCGACAAAGACTT GTTGGTGACGAATCACCATC	54°C	514 bp	RT-PCR, Sondenherstellung
ptprg2645_f ptprg2978_r	CGCTGTAAGTCTGATATGAA GCTCTTCAGCGTGACAATAA	53°C	333 bp	LightCycler-PCR, Sondenherstellung
ptprg3491_f ptprg3880_r	TCCTTATAACCAGGAGTAGGA ATTCTTCTCGACTTGGCCAG	53°C	389 bp	RT-PCR
p58/hhr23B_f p58/hhr23B_r	GCAACTACGACAGCAACAAC TGGCAGCCAAATTCTCATTC	53°C	417 bp	RT-PCR
mch4_f mch4_r	GACGAAAGTGGAAATGGAGA GAGACTGAATATACCAGCTG	53°C	403 bp	RT-PCR
c-jun_f c-jun_r	ATGAGGAACCGCATCGCTG TAGCATGAGTTGGCACCCACTG	56°C	194 bp	RT-PCR
e2f1_f e2f1_r	GCTGGACCACCTGATGAATA GATCTGTGGTGAGGGATGAG	55°C	379 bp	RT-PCR
GAPDH600_f GAPDH600_r	TTAGCACCCCTGGCCAAGG CTTACTCCTTGGAGGCCATG	60°C	521 bp	RT-PCR
β -actin884_f β -actin1198_r	TCCTGTGGCATCCACGAAACT GAAGCATTTCGCGGTGGACGAT	57°C	314 bp	RT-PCR
18S_f 18S_r	TCAAGAACGAAAGTCGGAG GGACATCTAAGGGCATCACA	50-60°C	488 bp	LightCycler-PCR
M13_f M13_r	CGTTGTAAAACGACGGCCAG CAGGAAACAGCTATGACCAT	55°C		Plasmid-PCR

Oligonukleotide wurden von MWG Biotech, Ebersberg in HPSF-Qualität (*high purity salt free*) bezogen. Die in lyophilisiertem Zustand gelieferten Oligonukleotide wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst (100 μM).

Die Sequenzen der Oligonukleotide für die RAP-PCR stammen aus dem Labor von McClelland, Sidney Kimmel Cancer Center, San Diego, USA. Die Oligonukleotidsequenzen der 18S-PCR-Primer wurden aus dem „QuantumRNA™ Kit“ entnommen, die der M13-Primer aus dem „TOPO™ TA Cloning® Kit“.

Alle genspezifischen Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms „DNAsis 2.5“ (Hitachi Software Engineering, Amersham Pharmacia, Freiburg) entworfen. Die Spezifität der Oligonukleotide wurde durch „BLAST Search“ überprüft (Altschul *et al.*, 1997, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

1.4 Vektoren und Plasmide

Tabelle 8: Vektoren

Vektor	Größe	Charakterisierung	Referenz
pcDNA3.1	5,4 kb	Ampicillin-/Geneticin-Resistenz, Expressionsvektor	Invitrogen, Karlsruhe
pCR®II-TOPO	3,9 kb	Ampicillin-Resistenz, max. Insertlänge bis 1,5 kb	Invitrogen, Karlsruhe
pCR®-XL-TOPO	3,5 kb	Kanamycin-Resistenz, Insertlänge 1,5-10 kb	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 9: Plasmide

n. v.: nicht veröffentlicht

Plasmid	Insert	Verwendung	Referenz
pGFP	<i>green fluorescent protein</i> -cDNA	Transfektion	Clontech, Heidelberg
pPTRG	ptprg cDNA, Länge 5,3 kb	Transfektion	Sorio, n. v.
pPTRGin	ptprg cDNA-Fragment, Intrazellulärbereich (Phosphatase-Domäne I) Länge 333 bp (Primer: ptprg2645_f + ptprg2978_r)	<i>in situ</i> Hybridisierung	n. v.
pPTRGex	ptprg cDNA-Fragment, Extrazellulärbereich (FN-Repeat + flexible Region) Länge 514 bp (Primer: ptprg1196_f + ptprg1710_r)	<i>in situ</i> Hybridisierung	n. v.
pBR322	-	Radioaktivmarker	NEB, Schwalbach

1.5 Antikörper

Tabelle 10: Antikörper

Primärantikörper (Klon)	Spezifizierung	Bezugsquelle/Referenz
Caspase-10 p20, Mch4 (H-131)	Kaninchen <i>anti</i> -human, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
p-c-Jun (KM-1)	Maus <i>anti</i> -human IgG ₁ , monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
β-Catenin (E-5)	Maus <i>anti</i> -human IgG ₁ , monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
E2F1 (KH95)	Maus <i>anti</i> -human IgG _{2A} , monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
FAST-Kinase (C-20)	Ziege <i>anti</i> -human, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
IFN-γRα (GIR-94)	Maus <i>anti</i> -human IgG2b, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
IFN-γRβ (GIR-208)	Maus <i>anti</i> -human IgG1, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Rac1 (C11)	Kaninchen <i>anti</i> -human, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
PTPRγ (TL1)	Maus <i>anti</i> -human, monoklonal	van Niekerk und Poels (1999)
Thrombospondin (N-20)	Ziege <i>anti</i> -human, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Sekundärantikörper	Bezugsquelle	Anwendung
<i>anti</i> -Digoxigenin-AP	Boehringer, Mannheim	II.2.4.4
<i>anti</i> -Digoxigenin, Gold-markiert	Dianova, Hamburg	II.2.4.4
Ziege <i>anti</i> -Kaninchen, IgG-spezifisch	Dianova, Hamburg	II.2.5.3
Ziege <i>anti</i> -Maus, IgG-spezifisch	Dianova, Hamburg	II.2.5.3
Esel <i>anti</i> -Ziege, IgG-spezifisch	Dianova, Hamburg	II.2.5.3
Ziege <i>anti</i> -Maus, Ig-spezifisch, biotinyliert	BD Transduction Laboratories, Heidelberg	II.2.5
Ziege <i>anti</i> -Kaninchen, Ig-spezifisch, biotinyliert	BD Transduction Laboratories, Heidelberg	II.2.5
Ziege <i>anti</i> -Maus, IgG-spezifisch, Meerrettich-peroxidase gekoppelt	Bio Rad, München	II.4.3.3.3
Ziege <i>anti</i> -Kaninchen, IgG-spezifisch, Meerrettich-peroxidase gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	II.4.3.3.3

1.6 Kits und Standards

Tabelle 11: Verwendete Kits

Kit	Hersteller/Firma
1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostics, Mannheim
Atlas TM human Cancer cDNA Expression Array	Clontech, Heidelberg
Atlas TM human Cell Cycle Array	Clontech, Heidelberg
Atlas TM human Apoptosis Array	Clontech, Heidelberg
Dynabeads [®] mRNA DIREKT Kit	Dynal, Oslo, N
Expand TM High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler–FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
MAXIscript TM	Ambion, Austin, USA
NOWA	EnerGene, Regensburg
QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick TM Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick TM PCR purification Kit	Qiagen, Hilden
QuantumRNA TM 18S Internal Standard	Ambion, Austin, USA
RiboGreen TM RNA Quantitation Kit	Molecular Probes, Leiden, NL
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TM TA Cloning [®]	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 12: Standards

Standard	Verwendung	Hersteller
100 bp marker	Agarose-Gelelektrophorese	Gibco, Karlsruhe
500 bp marker	Agarose-Gelelektrophorese	Gibco, Karlsruhe
1 kb marker	Agarose-Gelelektrophorese	Gibco, Karlsruhe
pBR322, MspI verdaut*	PAGE	NEB, Schwalbach
Multimark TM Multi-Colored Standard	SDS-PAGE	Novex, Frankfurt
Cruz Marker TM MW Standards	SDS-PAGE	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

* radioaktive Markierung s. II.3.6.4

1.7 Geräte

Tabelle 13: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
GeneAmp [®] PCR System 9700 (Thermocycler)	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Jung Fricocut 2800E	Leica, Heidelberg
Lasermikroskop PALM [®] Robot-MicroBeam	P.A.L.M. Mikrolaser Technologie, Wolfratshausen
LightCycler Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim
Mikroskopsystem Leitz DM RBE (Metaview Software)	Leica, Heidelberg
RP X-OMAT Processor Modell M6B	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
Spectra Fluor Plus, Magellan Software	Tecan, Männedorf, CH
Storm 860 Phosphorimager	Molecular Dynamics, Freiburg
Vertikale Gelelektrophoresekammer Modell S2	Gibco, Karlsruhe

2. Zellbiologische Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zusammensetzung der Nährmedien und Kulturbedingungen

DMEM:

DMEM (1 g/l Glukose) Grundmedium	500 ml
FCS	50 ml
HEPES (1 M)	5 ml
Penicillin (10 ⁴ u/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	5 ml
Amphotericin B (1 mg/ml)	0,5 ml

RPMI 1640:

RPMI 1640 Grundmedium	500 ml
FCS	50 ml
HEPES (1 M)	5 ml
Penicillin (10 ⁴ u/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	5 ml
Amphotericin B (1 mg/ml)	0,5 ml

Darmfibroblastenmedium:

DMEM (4,5 g/l Glukose) Grundmedium	500 ml
FCS	50 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml
NEAS (100x)	5 ml
MEM-Vitamine (50x)	5 ml
Penicillin (10 ⁴ u/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	5 ml
Ciprofloxacin (2 mg/ml)	2 ml
Gentamycin (50 mg/ml)	0,5 ml
Amphotericin B (1 mg/ml)	0,5 ml

Eagles MEM:

Eagle's MEM	500 ml
FCS	50 ml
NEAS (100x)	5 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml
Penicillin (10^4 u/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	5 ml
Amphotericin B (1 mg/ml)	0,5 ml

Zellkulturen wurden routinemäßig in 75 cm²-Zellkulturflaschen oder in 6-Loch-Platten in einem CO₂-Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei einer Atmosphäre von 37°C, 10 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.1.2 Passagierung von Zellen

Die Zellen wurden bei 80-90 % Konfluenz von den Zellkulturflaschen abgelöst. Dazu wurde das Kulturmedium abgezogen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA (0,5 % in PBS) überschichtet und für 1 bis 10 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen, bei 300x g für 10 min abzentrifugiert (Omnifuge 2.0RS, Heraeus Sepatech, Hanau) und in Medium resuspendiert. Jeweils 1/5 bis 1/10 der Zellen wurde in einer neuen Kulturflasche ausgesät und das Medium alle zwei Tage gewechselt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilarbeitsbank durchgeführt.

2.1.3 Zellzahlbestimmung/Vitalitätstest

Die Zellzahl einer Zellkultur wurde mikroskopisch mit einem Neubauer-Hämozytometer im Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Lebende Zellen erscheinen dabei farblos, tote Zellen färben sich blau. Aus einer gut suspendierten Zellkultur wurde ein Aliquot steril entnommen, mit Trypanblau-Lösung verdünnt und im Hämozytometer unter einem Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Göttingen) mit einem 10-er Objektiv ausgezählt (pro Großquadrat vier Kleinquadrate, in der Diagonalen liegend). Die Zellzahl pro ml ergab sich aus der erhaltenen Zellzahl multipliziert mit 2500 unter Berücksichtigung der Verdünnung.

Alternativ wurde zur Bestimmung der Vitalität von Zellen ein MTS-Test nach Angaben des Herstellers (Promega, Mannheim) durchgeführt.

2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfriermedium:

FCS	45 ml
DMSO	5 ml

Zur Langzeitlagerung wurde ein Teil der Zellen eingefroren. Hierzu wurden die Zellen abtrypsiniert, bei 300x g für 10 min zentrifugiert (Omnifuge 2.0RS, Heraeus Sepatech, Hanau), in 2 ml Einfriermedium aufgenommen, auf zwei Einfrierröhrchen (je 1 ml/Röhrchen) verteilt und auf Eis gestellt. Die Einfrierröhrchen wurden über Nacht bei -80°C in einem Einfrierbehälter, der ein Abkühlen der Zellen mit 1°C pro min gewährleistete, eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in einen Flüssigstickstofftank überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch eine kurzzeitige Wärmebehandlung des Einfrierröhrchens (2 min, 37°C -Wasserbad). Anschließend wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt, bei 300x g abzentrifugiert (Omnifuge 2.0RS, Heraeus Sepatech, Hanau) und in Zellkulturflaschen mit frischem Medium überführt. Nach 12 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen bei 80-90 % Konfluenz passagiert (s. II.2.1.2).

2.1.5 Transfektion von Zellen

Um Zellen mit Expressionsplasmiden zu transfizieren, wurden sie in 6-Loch-Platten ausgesät (ca. 10^5 Zellen/Loch) und für mindestens 24 h kultiviert. Anschließend wurden die ca. 30-50 % konfluenten Zellen mit PBS gewaschen und mit neuem Medium versehen. Die Plasmid-DNA wurde mit FuGENE 6 Transfektionsreagenz und serumfreiem Medium nach Angaben des Herstellers inkubiert und zu den Zellen gegeben. Dabei wurden zuerst für jede zu transfizierende Zelllinie unterschiedliche Plasmid-DNA-, sowie FuGENE 6-Konzentrationen getestet, um die optimalen Mischungsverhältnisse zu bestimmen (s. III.1.2.2.1).

Die Zellen wurden mit dem DNA-FuGENE 6-Komplex für 48-120 h kultiviert und anschließend zur RNA- oder Proteingewinnung geerntet (II.3.1.1, II.4.2).

2.1.6 Selektion transfizierter Zellen

Zur Selektion transfizierter Zellen wurde das Antibiotikum Geneticin (G418) eingesetzt. Alle mit dem Expressionsplasmid pcDNA 3.1 transfizierten Zellen verfügten über eine Geneticin-Resistenz, da dieses Plasmid das entsprechende Resistenzgen trägt. Geneticin wurde dem Medium nach Angaben des Herstellers zugesetzt, und die transfizierten Zellen mit dem geneticinhaltigen Medium bis zur Konfluenz inkubiert.

2.2 Gewebe

2.2.1 Asservierung des Gewebes

Für Vorversuche waren Biopsien, die im Rahmen von Koloskopien in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg, entnommen wurden, ausreichend. Die Biopsien wurden auf Eis möglichst schnell ins Labor transportiert, dort in OCT™ Tissue-Tek®-Einfriermedium eingebettet und in mit flüssigem Stickstoff gekühlten n-Butanol langsam tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

Das für die Hauptversuche verwendete Kolongewebe wurde im Institut für Pathologie, Prof. Rüschoff, Städtische Kliniken Kassel asserviert. Dazu wurden Gewebeproben von Kolontumoren und frühen Kolonadenomen und von jedem Patienten jeweils normale Mukosa entnommen. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Auf die schnelle Verarbeitung des Gewebes wurde dabei besonders geachtet, da durch die hohe enzymatische Aktivität im Kolon v.a. RNA sehr raschem Abbau unterliegt.

2.2.2 Kryogewebeschnitte

Zum Anfertigen von Kryogewebeschnitten stand ein Jung Frigocut 2800E Kryostat zur Verfügung. Es wurde eine Schneidetemperatur von -20°C gewählt. Die Schnittdicke betrug 5 bis 8 μm . Über mögliche Fixierungsvorgänge wird bei den jeweiligen Verwendungen der Kryogewebeschnitte berichtet. Für histologische Beurteilungen wurden die Gewebeschnitte Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt.

2.3 Lasergesteuerte Mikrodissektion (LGM)

Die LGM stellt eine neu entwickelte Methode dar, mit der man genau definierte, mikroskopisch kleine Zellgruppen sowie einzelne Zellen aus Gewebeschnitten isolieren kann. Unter mikroskopischer Kontrolle werden die gewünschten Objekte mit einem Laserstrahl ausgeschnitten und in ein LPC-Mikrozentrifugenröhrchen (0,5 ml) überführt.

2.3.1 Kryogewebeschnitte und Fixierung

Für die LGM wurden die Objektträger mit einer 1,35 µm dünnen Polyethylenmembran (PEN-Folie) überzogen. Zum Befestigen der Folie auf dem Objektträger wurde anfangs Nagellack, später Klebeband verwendet. Damit die Schnitte gut auf der Folie anhaften konnten, wurde die Folie nach dem Aufbringen auf den Objektträger mit Poly-L-Lysin (0,2 % in DEPC-H₂O) beschichtet. So vorbehandelte Objektträger wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Die Kryogewebeschnitte wurden unter RNase-freien Bedingungen frisch angefertigt und nach kurzem Antrocknen sofort fixiert, um RNasen unschädlich zu machen (s. III.2.1.1). Nach dem Fixieren wurden die Schnitte HE gefärbt und luftgetrocknet.

2.3.2 Prinzip der LGM

Für die LGM stand ein PALM[®] Robot-MicroBeam, ein Mikrolaser-System mit gepulstem UV-Laser (Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm) zur Verfügung. Eine extrem hohe Energiedichte im stark fokussierten Bereich des Laserstrahls erlaubt biologische Strukturen zu „schneiden“. Ein Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur fokussiert den Laserstrahl auf das Objekt, wobei eine Strahldicke von weniger als 1 µm ermöglicht wird. Das Prinzip des „Schneidens“ mit dem Laser ist ein lokal beschränkter, ablativer Fotodekompositionsprozess ohne Hitzeentstehung (Srinivasan, 1986). Dabei erfolgt eine Fotolyse chemischer Bindungen. Daher ist es möglich, bestimmte Gewebebereiche, einzelne Zellen oder subzelluläre Partikel (z.B. Chromosomen) zu präparieren (vgl. Abbildung 3), ohne enthaltene DNA, RNA oder Proteine zu schädigen.

Nach der Mikrodissektion werden die isolierten Objekte direkt in den Deckel eines LPC-Mikrozentrifugenröhrchens (0,5 ml) katapultiert. Dieser Deckel, der zur besseren

Anhaftung der katapultierten Objekte innen mit Mineralöl benetzt wurde, wird in einer dafür vorgesehenen Halterung direkt über dem Objektträger eingespannt. Diese als *laser pressure catapulting* (LPC) bezeichnete Methode basiert darauf, dass durch einen kurzen „Laserschuss“ mit leicht defokussiertem Laserstrahl eine extrem hohe Fotonendichte unter dem ausgeschnittenen Objekt erzeugt wird. Diese hohe Fotonendichte wirkt wie ein plötzlich unter dem Objekt entstehendes „Luftkissen“. Der damit verbundene Impuls ermöglicht es, dass das Objekt einige Millimeter entgegen der Schwerkraft bewegt werden und in das darüber angebrachte Auffanggefäß befördert werden kann (vgl. Abbildung 3). Dieses *catapulting* wird durch das Aufbringen der PEN-Folie auf den Objektträger erleichtert, denn der Laserstrahl schneidet diese Folie zusammen mit dem daran anhaftenden Gewebe, während die Folie selbst kaum am Objektträger haftet.

Die katapultierten Objekte werden in dem Deckel eines LPC-Mikrozentrifugenröhrchens (0,5 ml) gesammelt und anschließend durch Zentrifugation direkt in das mit Lysepuffer versehene RG überführt.

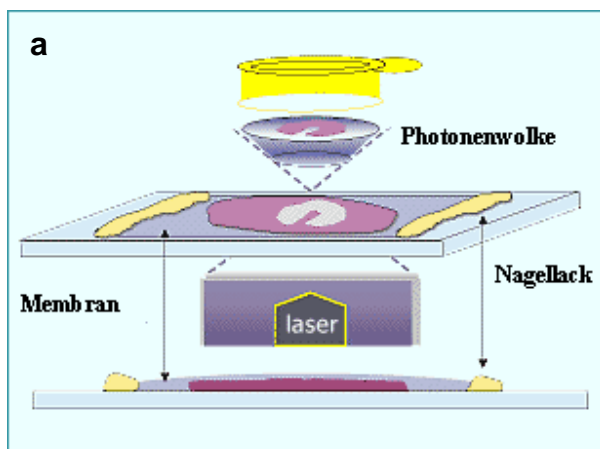
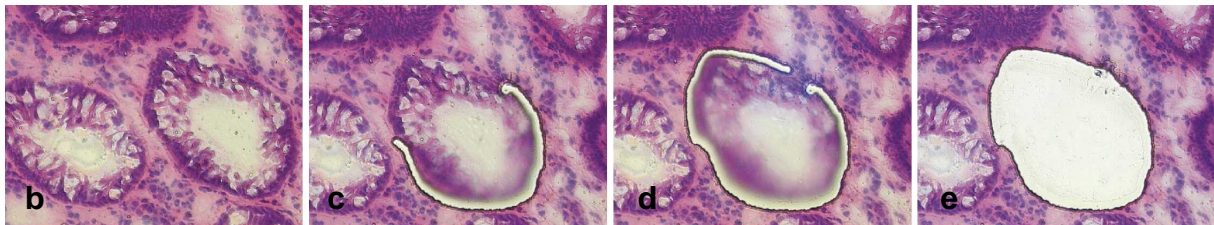


Abbildung 3:
Lasergesteuerte Mikrodissektion

a: Prinzip der lasergesteuerten Mikrodissektion (nach <http://www.palm-mikro-laser.com/technology/index5.html>)

b-e: Beispiel für lasergesteuerte Mikrodissektion (LGM und LPC) einer normalen Kolonkrypte (Querschnitt).

b: vor LGM, c, d: während LGM, e: nach LPC
Vergrößerungen: 400-fach



2.4 *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung ermöglicht eine Detektion von spezifischer mRNA in Zellen verschiedenster Gewebe, wobei nicht-radioaktiv markierte Sonden inzwischen eine ähnliche Sensitivität und Spezifität erreicht haben wie die ursprünglich dafür verwendeten radioaktiv-markierten Sonden (Giaid *et al.*, 1989; Denijn *et al.*, 1990; Dorries *et al.*, 1993). Im Gegensatz zur gegenüber äußeren Bedingungen relativ unempfindlichen Immunhistochemie müssen bei der *in situ* Hybridisierung mehrere Faktoren beachtet werden. Hierzu zählen

- a) die absolute Vermeidung einer RNase-Kontamination von Beginn des Herstellens von Gefrierschnitten bis zum Abschluss der Hybridisierungsphase,
- b) die laufende Überwachung der Farbentwicklung gegen Ende der *in situ* Hybridisierung, um ein möglichst gutes Signal- Rauschverhältnis zu erhalten.

2.4.1 Puffer und Lösungen

DEPC-H₂O_{dest}:

1 ml/l	DEPC
	Zur RNase-Dekontamination wird H ₂ O _{dest} für 2 h unter Rühren bei Raumtemperatur mit DEPC inkubiert und anschließend autoklaviert.

100x Denhardt's Lösung:

20 g/l	Ficoll 400
20 g/l	Polyvinylpyrrolidon
20 g/l	BSA

20x SSC:

3 M	NaCl
0,3 M	Natriumcitrat pH 7,0

STE:

50 mM	NaCl
10 mM	Tris/HCl (pH 8.0)
1 mM	EDTA (pH 8.0)

SSC-Dextransulfat:

50 %	Dextransulfat in 20x SSC
------	--------------------------

Prähybridisierungspuffer:

50 % (v/v)	Formamid
1 % (v/v)	100x Denhardt's Lösung
40 % (v/v)	SSC-Dextransulfat
5 %	Heringsspermien-DNA, für 10 min bei 65°C hitzedenaturiert
2,5 %	Hefe-t-RNA

Lösung A:

10 % (v/v)	20x SSC
50 % (v/v)	Formamid

Lösung B1:

150 ml	1x SSC
1,5 ml	SDS (20 %)

Lösung B2:

150 ml	0,5x SSC
1,5 ml	SDS (20 %)

Lösung B3:

150 ml	0,1x SSC
1,5 ml	SDS (20 %)

PVA-Tris:

10 %	PVA
0,1 M	Tris/NaCl pH 9,5

NBT/BCIP Farblösung:

5 ml	PVA-Tris
5 mM	MgCl ₂
1 mg	BCIP
2,5 mg	NBT
1 mM	Levamisol

Tris/NaCl pH 7,6:

0,1 M	Tris
0,2 M	NaCl
	pH 7,6

Tris/NaCl pH 9,5:

0,1 M	Tris
0,1 M	NaCl
0,05 M	MgCl ₂
	pH 7,6

2.4.2 Sondenherstellung

Die Herstellung von Sonden zum Nachweis von mRNAs in Gewebe erfolgte mit Plasmiden, die ein Fragment der nachzuweisenden cDNA enthielten (s. Tabelle 9). Verwendete Konstrukte wurden zur Kontrolle sequenziert (s. II.3.7.2, II.3.7.3).

Als Vektor wurde pCR[®]II-TOPO verwendet. Dieser Vektor hat den Vorteil, dass er sowohl den Promotor für die SP6 als auch für die T7-RNA-Polymerase enthält und somit eine direkte Transkription von RNA-Sonden ermöglicht. Mittels SP6- bzw. T7-RNA-Polymerasen wird die zur mRNA komplementäre antisense-Sonde, welche an die gesuchte mRNA bindet, bzw. die als Kontrolle verwendete sense-Sonde, welche dem kodierenden DNA-Strang entspricht und nicht an die gesuchte mRNA bindet, aus der cDNA im Plasmid überschrieben.

Ein Linearisieren des jeweiligen Konstruktes durch Restriktionshydrolyse gewährleistete, dass Sonden einheitlicher Länge generiert werden konnten.

Die Transkription der Sonden wurde mit dem „MaxiScript™ Kit“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Markierung der Sonden wurde Digoxigenin-UTP verwendet. Die Aufreinigung der Sonden erfolgte mittels Gelelektrophorese (2 % Agarose in TAE); das Ausschneiden der gewünschten Bande und die Eluation der enthaltenen Sonde mittels „QiaQuick Gel Extraction“ (s. II.3.6.2, II.3.6.3). So aufgereinigte Sonden wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.3 Hybridisierung

Es wurden Gefrierschnitte mit einer Schrittdicke von 5 bis 8 μm verwendet, die nach kurzer Lufttrocknung für 1 h bei Raumtemperatur in 3 % Paraformaldehyd fixiert wurden.

Zunächst wurden die Schnitte in einer RNase-freien, feuchten Kammer mehrfach gewaschen: es wurde ein Waschschriff mit 2x SSC für 5 min durchgeführt, gefolgt von zwei Waschschriffen mit Triethanolamin-HCl (0,1 M, pH 8,0). Dann wurde mit 0,25 % Acetanhydrid in Triethanolamin-HCl angesäuert und nochmals zweimal mit Triethanolamin-HCl gewaschen.

Prähybridisiert wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit Prähybridisierungspuffer.

Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über 12 h in einer feuchten Kammer bei 50-52 $^{\circ}\text{C}$. Als Hybridisierungspuffer diente Prähybridisierungspuffer, in dem die RNA-Sonde verdünnt und für 10 min bei 80 $^{\circ}\text{C}$ denaturiert worden war. Die Gewebeschnitte wurden mit Deckgläschen abgedeckt und mit Nagellack versiegelt. Pro Sonde wurden mehrere Verdünnungen (5-200 ng/Gewebeschnitt) getestet. Als Kontrolle wurde eine Hybridisierung mit der sense-Sonde durchgeführt, die keine oder lediglich eine minimale Bindung an das Gewebe aufweisen darf.

Nach Beendigung der Hybridisierungsphase wurde das Deckgläschen entfernt und es folgten mehrere Waschschriffte, zunächst dreimal mit 2x SSC, dann zweimal mit 2x STE.

Zum Entfernen ungebundener Sonden wurde ein einstündiger Verdau mit RNase A (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in STE) bei 37 $^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Es folgten diverse stringente Waschschriffte: zunächst dreimalig mit STE, dann fünfminütig bei 50 $^{\circ}\text{C}$ mit Lösung A, gefolgt von dreimaligem Waschen mit 2x SSC und abschließend jeweils 15-minütiges Waschen mit den Lösungen B1, B2 und B3 bei 50 $^{\circ}\text{C}$.

2.4.4 Immunologischer Nachweis

Der Nachweis einer erfolgreichen Hybridisierung erfolgte immunologisch unter Verwendung von Anti-Digoxigenin-Antikörpern (s. Tabelle 10). Diese Antikörper bestehen nur aus einem F_{ab}-Fragment gegen Digoxigenin, welches an alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Die unspezifische Bindung der F_c-Teile eines Antikörpers an im Gewebe evtl. stark exprimierte F_c-Rezeptoren wird somit vermieden.

Zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindungen wurden die Gewebeschnitte zunächst für 30 min bei Raumtemperatur mit 2 %igem Normal-Schaf-Serum (Dianova, Hamburg) in Tris/NaCl pH 7,6 geblockt. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte ebenfalls in 1 %igem Normal-Schaf-Serum in Tris/NaCl pH 7,6 für 1 h bei Raumtemperatur. Nach gründlichem Waschen der Objektträger mit Tris/NaCl pH 7,6 und einem zehnmütigen Alkalisierungsschritt in Tris/NaCl pH 9,5 erfolgte die Farbentwicklung mit NBT/BCIP im Dunkeln. In der Regel benötigte die Farbentwicklung zwischen 30 und 240 min.

Sollte die alkalische Phosphatase-Signalentwicklung aufgrund einer nur geringen Genexpression unbefriedigende Ergebnisse liefern, so kann zum Nachweis auch die empfindlichere Immunogold-Silbertechnik mit fotochemischer Entwicklung (s. II.2.5.4) verwendet werden.

2.5 Immunhistochemie

2.5.1 Puffer und Lösungen

Tris/NaCl pH 7,6:

6 g/l	Tris
8 g/l	NaCl

Citratpuffer (für Paraffinschnitte):

2 mM	Zitronensäure
10 mM	Zitronensäure, Tri-Natrium-Salz

Citratpuffer* (für Silberfärbung):

0,3 M	Zitronensäure
0,2 M	Zitronensäure, Tri-Natrium-Salz

Cacodylatpuffer:

0,2 M	Cacodylat pH 7,35
-------	----------------------

3 % Glutaraldehyd-Cacodylat:

3 % (v/v)	Glutaraldehyd
50 % (v/v)	Cacodylatpuffer

2.5.2 Gewebeschnitte

Bei der Immunhistochemie kamen Gefrier- oder Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm zum Einsatz.

2.5.2.1 Vorbehandlung von Gefrierschnitten

Gefrierschnitte wurden auf Superfrost Objektträgern angefertigt und für 5 min in Aceton fixiert und danach luftgetrocknet.

2.5.2.2 Vorbehandlung von Paraffinschnitten

Paraffinschnitte wurden zunächst entparaffiniert: Einer zweimal zehnmütigen Inkubation der Schnitte in Xylol folgte eine Rehydratisierung mittels einer absteigenden Ethanolreihe (10 min 100 % EtOH, 5 min 95 % EtOH, 5 min 80 % EtOH, 5 min 70 % EtOH, 2-3 min H₂O_{dest}). Anschließend wurde ein Blocken der Peroxidase als Farbentwicklungsenzym durch eine fünfminütige Inkubation in 0,3 % Peroxid durchgeführt, und die Schnitte zweimal mit Tris/NaCl pH 7,6 gewaschen.

Eine Demaskierung von möglichen Antikörperbindungsstellen wurde durch 30-minütiges Kochen in Citratpuffer erreicht. Die Schnitte wurden nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur dreimal in Tris/NaCl pH 7,6 gewaschen. Bei jedem zu analysierenden Gewebe wurde jeweils ein demaskierter Schnitt und ein unbehandelte Parallelschnitt untersucht.

2.5.3 Phosphatase-Immunhistochemie

Sowohl die Direktmarkierung von Antigenen als auch Doppelmarkierungsversuche nach *in situ* Hybridisierungen wurden mittels „AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) Substrat Kit für Peroxidase“ (Vector Laboratories, Burlingame, USA) durchgeführt.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blocken, wurden die Schnitte für 30-40 min in Tris/NaCl pH 7,6 mit 4 % Magermilchpulver und 2 % normalem Serum (Ziege oder Maus, je nach Ursprung des Primärantikörpers) inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Tris/NaCl pH 7,6 wurde der Primärantikörper (1:50-1:200 in Tris/NaCl pH 7,6 mit 2 % Magermilchpulver, vgl. Tabelle 10) für 1 h bei Raumtemperatur oder für 12-14 h bei 4°C appliziert. Die Schnitte wurden anschließend erneut in Tris/NaCl pH 7,6 gewaschen, gefolgt von einer 45-minütigen Inkubation mit einem biotinylierten

Sekundärantikörper (1:400 in Tris/NaCl pH 7,6 mit 2 % Magermilchpulver, vgl. Tabelle 10). Nach Entfernen des Sekundärantikörpers wurden die Schnitte 45 min mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin (Dianova, Hamburg) inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte unter Verwendung des „AEC Substrat Kits für Peroxidase“ nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde die Detektionslösung für 30 min auf die Schnitte aufgebracht. Eine Färbung wurde nach 10-30 min sichtbar und die Farbreaktion konnte durch Waschen mit Tris/NaCl pH 7,6 beendet werden.

2.5.4 Immunogold-Silbertechnik

Das Blocken von unspezifischen Bindungsstellen (F_c -Rezeptoren) erfolgte in Tris/NaCl pH 7,6 mit 2 % normalem Serum (entsprechend dem Ursprung des Sekundärantikörpers) und 4 % Magermilchpulver für 30 min bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen der Schnitte in Tris/NaCl pH 7,6 wurden diese für 45-60 min bei Raumtemperatur oder für 12-14 h bei 4°C mit primären Antikörpern in Konzentrationen von 1-20 µg/ml inkubiert. Als Kontrolle dienten jeweils Antikörper gegen speziesspezifische Immunglobuline. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Tris/NaCl pH 7,6 gewaschen und nachfolgend mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, gerichtet gegen den F_c -Teil des Primärantikörpers (s. Tabelle 10), in einer Verdünnung von 1:600 in Tris/NaCl pH 7,6 für 45 min inkubiert. Nach erneutem Waschen in Tris/NaCl pH 7,6 wurden die Schnitte für 45 min mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin (Dianova, Hamburg) (1:600 in Tris/NaCl pH 7,6) beschickt. Zum Abschluss erfolgte eine Inkubation mit Antikörpern gegen Meerrettichperoxidase, gekoppelt mit 6 nm großen Goldpartikeln (s. Tabelle 10). Die Verdünnung dieser Antikörper betrug 1:40, die Inkubationszeit 60 min.

Die Signalentwicklung erfolgte fotochemisch mittels der sogenannten Immunogold-Silberreaktion (modifiziert nach Komminoth, 1992). Hierfür wurden die Gewebeschnitte zunächst in Tris/NaCl pH 7,6 gewaschen und danach mittels 3 %igem Glutaraldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Der erste Schritt der fotochemischen Silberverstärkungsreaktion beinhaltete die Inkubation mit Hydrochinon (2,5 mg/ml in Citratpuffer*), der zweite Schritt die mit der eigentlichen Entwicklungslösung (2,5 mg/ml Hydrochinon in Citratpuffer* und 2 mg/ml Silberacetat in H_2O_{dest}). Die Entwicklungszeit betrug maximal 18-20 min. Nachfolgend erfolgte die Fixierung mittels fotografischem Fixiermedium für 2 min. Nach der Fixierung und einer nochmaligen intensiven Waschung mit Tris/NaCl pH 7,6 wurde entweder eine

Doppelmarkierung mittels Phosphatase-Immunhistochemie (II.2.5.3) angeschlossen oder direkt Deckgläschen zur Beurteilung der Färbung aufgebracht.

2.5.5 Immuncytochemie

Für die Immuncytochemie wurden Zellen in 75-cm²-Zellkulturflaschen bis 80 % Konfluenz kultiviert, anschließend auf Zellkulturobjektträgern (4-Kammer-*Chamber-Slides*) mit einer Dichte von ca. 10⁵ Zellen pro Kammer ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese für 5-10 min in Aceton fixiert und wie unter II.2.5.3 beschrieben weiterbehandelt.

3. Molekularbiologische Methoden

3.1 RNA-Isolierung

3.1.1 aus Zellmaterial

Zur Gesamt-RNA-Isolierung aus Zellkulturen wurde der „RNeasy[®] Spin Column Purification Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Die Zellen wurden bei 80-90 % Konfluenz nach Entfernen des Kulturmediums und einmaligem Waschen mit PBS direkt in der Zellkulturflasche lysiert. Es wurden routinemäßig 650 µl Lysepuffer pro 75 cm²-Flasche eingesetzt. Das Lysat wurde mittels QIA-Shredder-Säulen (Qiagen, Hilden) homogenisiert. Im Weiteren wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Um Verunreinigungen mit DNA zu minimieren, wurde das Isolierungsprotokoll um einen 30-minütigen DNase-Verdau erweitert („RNase-free DNase Set“, Qiagen, Hilden).

3.1.2 aus Gewebematerial nach LGM

Das durch LGM und LPC gewonnene Gewebematerial (s. II.2.3) wurde in 300 µl Lysepuffer aufgenommen und durch sofortiges Mischen lysiert. Eine Homogenisation mittels QIA-Shredder-Säulen (Qiagen, Hilden) war aufgrund der minimalen Gewebemenge nicht notwendig. Ansonsten wurde wie unter II.3.1.1 beschrieben verfahren.

Die geringe eingesetzte Gewebemenge hatte entsprechend geringe RNA-Mengen zur Folge. Der Eluationsschritt am Ende der RNA-Isolierungsprozedur wurde deshalb abgewandelt: Das gewonnene Eluat wurde ein zweites Mal auf die Säule appliziert und nach kurzer Einwirkzeit erneut „durchzentrifugiert“. So konnte die Ausbeute an RNA beim Eluieren von der Säule verbessert werden.

3.1.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

3.1.3.1 Ethidiumbromidplatten

RNA-Konzentrationen wurden routinemäßig mit sog. Ethidiumbromid-Platten bestimmt. Dabei handelt es sich um Platten mit 1 % (w/v) Agarose in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) die 5 µg/ml Ethidiumbromid enthalten. Trägt man je 1 µl der zu bestimmenden RNA-Lösung sowie gegebenenfalls entsprechende Verdünnungen parallel zu einer Reihe von RNA-Standardkonzentrationen (12,5; 25; 50; 100; 200 ng/µl) auf, so kann durch Vergleich der Fluoreszenzstärke unter UV-Licht (312 nm) die unbekannte Konzentration der Probe abgeschätzt werden.

3.1.3.2 RiboGreen™ RNA Quantitation Kit

Zur exakten Bestimmung der RNA-Konzentrationen für die RT-PCR wurde der „RiboGreen™ RNA Quantitation Kit“ verwendet. Der an RNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen kann in einem Fluorometer (Spectra Fluor Plus, Tecan, Männedorf, CH) detektiert werden. Die entsprechenden RNA-Konzentrationen wurden anschließend mit der Magellan-Software (Tecan, Männedorf, CH) berechnet.

3.2 PCR und RT-PCR

Reverse Transkription und daran anschließende Amplifikation über PCR ist eine hochempfindliche Technik, um das Vorhandensein von spezifischen RNA-Molekülen zu bestimmen.

3.2.1 Reverse Transkription für RT-PCR

Für die reverse Transkription wurde der „1st Strand cDNA Synthesis Kit“ mit AMV als reverser Transkriptase verwendet. Der Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese wurde in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen (MicroAmp[®] Reaction Tubes, 8 tubes/strip, PE Applied Biosystems, Foster City, USA) auf Eis gemischt und setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	µl pro 20 µl Ansatz	Endkonzentration
10x RT-Puffer*	2	1x
25 mM MgCl ₂	4	5 mM
10 mM dNTP	2	1 mM
„Random Hexamers“ p(dN) ₆	2	0,16 µg/µl
RNase Inhibitor (40 u/µl)	1	2 u/µl
AMV Reverse Transkriptase (10 u/µl)	0,8	0,4 u/µl
RNA	x	0,05-25 ng/µl
H ₂ O bidest	ad 20	

* 100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8,3

Folgendes Programm wurde zur cDNA-Synthese benützt:

25°C	10 min	Oligonukleotidbindung an die RNA
42°C	60 min	Umschreiben der RNA in cDNA
68°C	15 min	Inaktivierung der reversen Transkriptase

3.2.2 PCR

PCR (Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988) wurde in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen (MicroAmp[®] Reaction Tubes, 8 tubes/strip, PE Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

3.2.2.1 Reaktionsansatz für Routineuntersuchungen

20 µl-Reaktionsansätze für Routineuntersuchungen wurden auf Eis vorbereitet und so bis zum Reaktionsstart aufbewahrt. Als Matrize diente cDNA (s. II.3.2.1) oder gereinigte Plasmid-DNA (s. II.III.3.7.1.3). Des Weiteren wurden je 10 pmol der gewünschten Oligonukleotidprimer (s. Tabelle 7) hinzugefügt und mit Nukleinsäurefreiem H₂O_{bidest} auf 10 µl aufgefüllt. Dann wurden den Ansätzen je 10 µl des Master-

Mixes aus dem „*Taq* PCR Master Mix Kit“ zugegeben. Die Amplifizierung erfolgte standardmäßig in einem Thermocycler 9700 (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) nach folgendem Programm:

1x	95°C	5 min	Denaturierung
35x	94°C	30 sec	Denaturierung
	T _{ann}	30 sec	Primer-Annealing
	72°C	60 sec	Elongation
1x	72°C	7 min	Elongation

Die Wahl der Annealing-Temperatur T_{ann} ist vom jeweils eingesetzten Oligonukleotid-Primerpaar abhängig (s. Tabelle 7).

Zur Überprüfung der PCR wurden 5-10 µl PCR-Produkt mit Auftragspuffer versetzt und in einem 1 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. II.3.6.1, II.3.6.2).

3.2.2.2 Reaktionsansatz mit „Expand™ High Fidelity PCR System“

Folgender Ansatz fand bei der Amplifizierung langer oder zur Klonierung/Sequenzierung (s. II.3.7) vorgesehener Fragmente Anwendung. Als Enzyme wurden dabei zwei DNA Polymerasen eingesetzt: *Taq* und *Pwo* DNA Polymerase. Die 3'-5' Exonuklease-Proofreading-Aktivität der *Pwo* DNA Polymerase resultiert in einer dreifach verringerten Fehlerrate bei der Amplifizierung.

Reagenzien	µl pro 50 µl Ansatz	Endkonzentration
10x Expand-HF-Puffer*	5	1x
10 mM dNTP	1	200 µM
5 µM Primer (f und r)	je 2	je 0,2 µM
Enzymmix°	0,75	0,05 u/µl
cDNA	2-10	
H ₂ O bidest	ad 50	

* enthält 15 mM MgCl₂, ° *Taq* DNA Polymerase und *Pwo* DNA Polymerase

Die Reaktionen wurden nach folgendem Programm inkubiert:

1x	95°C	2 min	Denaturierung
35x	94°C	30 sec	Denaturierung
	T _{ann}	30 sec	Primer-Annealing
	68°C	1-3 min	Elongation
1x	68°C	7 min	Elongation

Die Wahl der Annealing-Temperatur T_{ann} ist vom jeweils eingesetzten Oligonukleotid-Primerpaar abhängig (s. Tabelle 7).

Zur Überprüfung der PCR wurden 5-10 μl PCR-Produkt mit Auftragspuffer versetzt (s. II.3.6.1) und in einem 1 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. II.3.6.2).

3.3 Realtime-PCR mit der LightCycler-Technologie

3.3.1 Allgemeines Prinzip und Reaktionsansatz

Zur Quantifizierung von mRNA stand ein Realtime-PCR-Gerät, ein LightCycler, zur Verfügung. Es kam der „FastStart SYBR Green MasterMix Kit“ zum Einsatz. Die 20 μl -Reaktionsansätze wurden in Glaskapillaren (Roche Diagnostics, Mannheim) angefertigt und setzten sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	μl pro 20 μl Ansatz	Endkonzentration
10x FastStart SYBR Green MasterMix*	2	1x
25 mM MgCl_2	0,8-3,2	2-5 mM
5 μM Vorwärtsprimer	2	0,5 μM
5 μM Rückwärtsprimer	2	0,5 μM
cDNA	2	
H_2O bidest	ad 20	

* enthält 10 mM MgCl_2

Zur Detektion wurde SYBR Green verwendet, ein Fluoreszenzfarbstoff, der in Lösung nur schwach, gebunden an doppelsträngige DNA jedoch sehr stark fluoresziert. Am Ende der Elongationsphase eines jeden Zyklus wurde automatisch die SYBR Green-Fluoreszenz als Maß für die PCR-Produktmenge gemessen (530 nm, Kanal 1).

Am Ende eines jeden PCR-Laufs wurde das PCR-Produkt einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen, um evtl. vorhandene unspezifische PCR-Produkte auszuschließen. Der Schmelzpunkt eines PCR-Produkts ist abhängig von dessen Länge und GC-Gehalt. Somit hat **ein** PCR-Produkt **einen** spezifischen Schmelzpunkt. Primerdimere oder zusätzliche PCR-Produkte können in den meisten Fällen an Hand der Schmelzkurve identifiziert werden, da neben dem spezifischen Schmelzpunkt

weitere Schmelzpunkte beobachtet werden können. Reaktionen mit mehreren Schmelzpunkten werden nicht zur Quantifizierung herangezogen.

Die Expression eines Gens wurde durch relative Quantifizierung bestimmt. Als interner Standard wurde 18S-rRNA verwendet und die Genexpression relativ dazu dargestellt.

Pro Probe wurden zwei Ansätze (in zwei unterschiedlichen Kapillaren) angesetzt: ein Ansatz mit genspezifischen Primern und ein Ansatz mit Primern für 18S-rRNA.

Die Proben wurden nach folgendem Programm inkubiert:

1x	95°C	10 min	Aktivierung des Hotstart-Enzyms
45x	94°C	5 sec	Denaturierung
	T _{ann}	5 sec	Primer-Annealing
	72°C	x sec*	Elongation (*PCR-Produktlänge bp/25)
	Aufheizen von 50°C auf 95°C (0,1°C pro sec)		Schmelzkurve

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte wie unter II.3.3.2 beschrieben mittels LightCycler-Software (Roche Diagnostics, Mannheim) und MS Excel.

3.3.2 Auswertung

Mittels LightCycler-Software konnte der ct-Wert (Zyklus, bei dem alle analysierten Proben eine definierte Produktmenge aufweisen) jeder einzelnen Reaktion bestimmt werden. Dazu wurde die *Second Derivative Maximum* Methode verwendet. Zugleich muß dieser Wert am Anfang des linearen Bereichs der PCR-Verlaufskurve gewählt werden. Dies wird dadurch gewährleistet, dass ein Zeitpunkt gewählt wird, bei dem die Hintergrundfluoreszenz zum ersten Mal deutlich überschritten wird.

Die ct-Werte der genspezifischen Reaktion wurden auf den ct-Wert der jeweils parallel durchgeführten Reaktion mit 18S-rRNA-Primer normalisiert. Dazu wurden die ct-Werte von einander subtrahiert. Die relative Produktmenge wurde nach folgender Formel berechnet: $2^{-[ct(\text{Gen})-ct(18S)]}$.

Die Berechnungen und grafischen Darstellungen wurden in MS Excel durchgeführt.

3.3.3 Primer-Effizienztest

Für jedes genspezifische Primerpaar musste die Effizienz der PCR-Reaktion getestet und optimiert werden. Dazu wurde die cDNA unverdünnt, in einer 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnung in die Reaktion eingesetzt und die jeweiligen ct-Werte bestimmt. Diese wurden dann mittels Standardkurve (Logarithmus der Konzentration *versus* ct-Wert) analysiert, die Steigung der Gerade ermittelt und die daraus resultierende Effizienz E mit der Formel $E=10^{-1/\text{Steigung}}$ berechnet.

Eine optimale PCR-Reaktion hat einen Effizienzwert von $E=2$, d.h. in jedem Zyklus findet eine Verdopplung des Produkts statt. Effizienzen von $E=2\pm 0,1$ sind für relative Quantifizierungen verwendbar (LightCycler Handbuch, Roche Diagnostics, Mannheim). Zudem sollten die Effizienzen der in Relation gesetzten Gene möglichst wenig voneinander abweichen, um den Fehler in der relativen Quantifizierung möglichst gering zu halten. Ungleiche Amplifizierungseffizienzen bewirken falsche Expressionsunterschiede.

Um die optimale Effizienz für jedes Primerpaar zu ermitteln, wurden unterschiedliche $MgCl_2$ -Konzentrationen (2-5 mM) mit oben beschriebener Verdünnungsreihe getestet.

3.4 RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR)

RNA arbitrarily primed PCR (Welsh und McClelland, 1990; Welsh *et al.*, 1992; McClelland und Welsh, 1994; McClelland *et al.*, 1995; McClelland *et al.*, 1997) stellt eine Variation des Differential Displays dar, bei der zwei oder mehrere RNA-Populationen bzgl. ihres RNA-Expressionsmusters miteinander verglichen und unterschiedlich exprimierte Gene identifiziert werden können. Es handelt sich dabei um einen RNA-Fingerprint, der durch zufälliges *priming* sowohl in der Erststrang- als auch in der Zweitstrangsynthese charakterisiert ist. In jedem Schritt wird üblicherweise ein 10 Basen langer, arbiträrer Primer verwendet. Die Zweitstrangsynthese wird mit Radionukleotiden ($\alpha^{32}P$ -dATP oder $\alpha^{32}P$ -dCTP) durchgeführt. Die amplifizierten DNA-Fragmente werden dann auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (s. II.3.6.4) elektrophoretisch aufgetrennt und nach erfolgter Autoradiografie analysiert. Dabei erhält man ein Bandenmuster aus 100-150 Fragmenten.

3.4.1 RAP-PCR aus Zellmaterial

Die reverse Transkription zur Erststrangsynthese wurde mit Gesamt-RNA (s. II.3.1.1) durchgeführt. Dabei wurde ein 10 Basen langer, arbiträrer Primer (s. Tabelle 7) eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	μl pro 10 μl Ansatz	Endkonzentration
10x RT-Puffer*	1	1x
100 mM DTT	1	10 mM
10 mM dNTP	0,2	0,2 mM
100 μM Primer	0,2	2 μM
M-MLV Reverse Transkriptase (200 u/ μl)	0,1	2 u/ μl
RNase Inhibitor (40 u/ μl)	0,5	2 u/ μl
RNA	5	0,1-50 ng/ μl
H ₂ O bidest	ad 10	

* 500 mM Tris/HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 40 mM MgCl₂

Die Ansätze wurden in 5 min von 25°C auf 37°C erwärmt und anschließend für 60 min bei 37°C inkubiert. Das Stoppen der reversen Transkription erfolgte bei 68°C für 15 min.

Im Anschluss an die reverse Transkription wurde eine PCR mit einem zweiten arbiträren Primer (s. Tabelle 7) durchgeführt. Die radioaktive Markierung erfolgte mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 3000 Ci/mmol) für Fingerprintanalysen (s. II.3.6.4) bzw. $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 3000 Ci/mmol) für cDNA-Expressionsarrays (s. II.3.5). Die Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	μl pro 20 μl Ansatz	Endkonzentration
10x Stoffel-Puffer*	2	1x
25 mM MgCl ₂	3,2	4 mM
10 mM dNTP ^o	0,8	0,4 mM
100 μM Primer	0,8	4 μM
Taq, Stoffel Fragment (10 u/ μl)	0,4	0,2 u/ μl
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP bzw. $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP	0,5 bzw. 2,8	0,25 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ bzw. 1,4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$
cDNA	10	
H ₂ O _{bidest}	ad 20	

* 100 mM Tris/HCl pH 8,3, 100 mM KCl

^o Für Fingerprintanalysen mit dCTP-Markierung wurde eine Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP verwendet. Für Arrayanalysen mit dATP-Markierung eine Mischung aus dCTP, dGTP und dTTP.

Die Ansätze wurden nach folgendem Programm inkubiert:

1x	95°C	1 min	Denaturierung
35x	94°C	30 sec	Denaturierung
	35°C	30 sec	Primer-Annealing
	72°C	60 sec	Elongation
1x	72°C	7 min	Elongation

Die Analyse der PCR-Fragmente erfolgte durch denaturierende Polyacrylamidgелеlektrophorese (PAGE, s. II.3.6.4) oder cDNA-Expressionsarrays (s. II.3.5).

3.4.2 RAP-PCR aus Gewebematerial nach LGM

Da nach LGM nur sehr geringe RNA-Mengen zur Verfügung standen, mußte das Standardprotokoll entsprechend geändert und optimiert werden. Diese Optimierung ist ein Hauptteil der vorliegenden Arbeit (vgl. III.2):

Die reverse Transkription wurde wie unter II.3.4.1 beschrieben mit folgenden Änderungen durchgeführt: Es wurde die gesamte RNA aus einem LGM-Experiment eingesetzt (30 µl) und somit die Reaktion in einem 50 µl-Ansatz durchgeführt. Nach erfolgter reverser Transkription wurde die Reaktion präzipitiert (Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 3 Volumen eiskaltem EtOH_{abs}, Inkubation bei -20°C für mindestens 2 h, Zentrifugation 10000x g/4°C/30 min, Waschen mit 70 % EtOH, Zentrifugation 10000x g /4°C/15 min) und in 30 µl sterilem H₂O_{dest} resuspendiert.

Die Zweitstrangsynthese wurde mittels einer „nested“ PCR-Strategie (McClelland *et al.*, 1993; Ralph *et al.*, 1993) in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wurde eine Voramplifikation der cDNA mit einem arbiträren Primer (OPN 21, Nuklear 1+, Kin A-) in einer PCR mit 15 Zyklen erreicht. Im zweiten Schritt fand die Hauptamplifikation in einer PCR mit 35 Zyklen statt. Dazu wurde ein zweiter, „nested“ Primer eingesetzt, der entweder am 3'-Ende eine (OPN 21 nested) oder drei (Nuklear 2+) zusätzliche Basen aufwies oder eine Teilsequenz des ersten Primers enthielt (Kin A- nested).

Zwischen dem ersten und dem zweiten Amplifizierungsschritt wurde die DNA präzipitiert (s. oben).

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	erster Schritt µl pro 50 µl Ansatz	zweiter Schritt µl pro 20 µl Ansatz
10x Stoffel-Puffer*	5	2
25 mM MgCl ₂	8	3,2
10 mM dNTP ^o	1	0,8
100 µM Primer	2	0,8
<i>Taq</i> , Stoffel Fragment (10 u/µl)	1	0,4
α ³² P-dCTP bzw. α ³² P-dATP	-	0,5 bzw. 2,8
DNA	30	10
H ₂ O _{bidest}	3	ad 20

* 100 mM Tris/HCl pH 8,3, 100 mM KCl

^o Für Fingerprintanalysen mit dCTP-Markierung wurde eine Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP verwendet. Für Arrayanalysen mit dATP-Markierung eine Mischung aus dCTP, dGTP und dTTP.

Die Ansätze wurden nach dem in II.3.4.1 beschriebenen Bedingungen inkubiert: der erste Amplifizierungsschritt für 15 Zyklen, der zweite Amplifizierungsschritt für 35 Zyklen.

Die Analyse der PCR-Fragmente erfolgte durch denaturierende Polyacrylamidgелеlektrophorese (PAGE, s. II.3.6.4) oder cDNA-Expressionsarrays (s. II.3.5).

3.5 cDNA-Expressionsarray

Zur Bestimmung von Genexpressionsmustern wurden AtlasTM cDNA-Expressionsarrays (AtlasTM Human Cancer cDNA Expression Array, AtlasTM Human Cell Cycle Array, AtlasTM Human Apoptosis Array) der Firma Clontech, Heidelberg verwendet. Dabei handelt es sich um Nylonmembranen mit daran gebundenen cDNAs unterschiedlicher Gengruppen. Die Länge der gebundenen cDNA-Fragmente liegt zwischen 200 und 500 bp. Alle cDNAs sind an je zwei nebeneinander liegenden Punkten auf der Membran gespottet („Doppelspots“). cDNA-Expressionsarrays wurden immer in Kombination mit RAP-PCR (s. II. 3.4) durchgeführt (s. Abbildung 4).

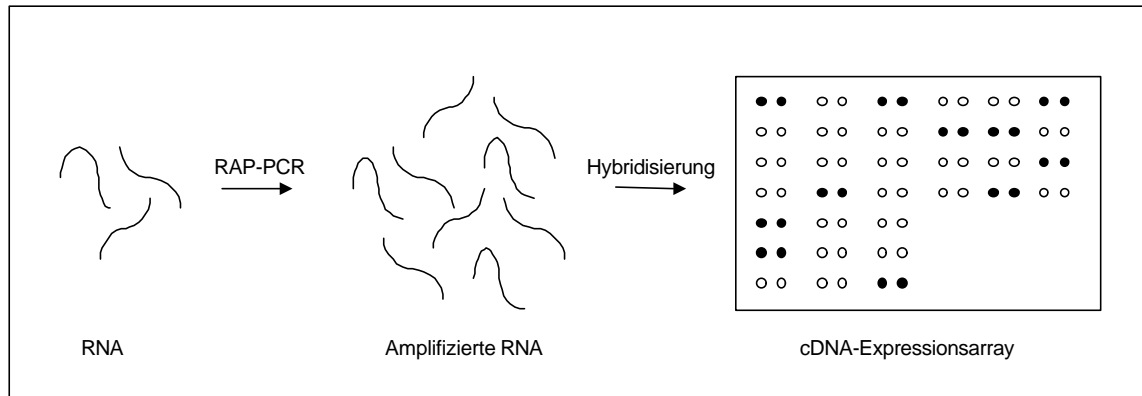


Abbildung 4: Schematische Darstellung der kombinierten Methode von RAP-PCR- und cDNA-Expressionsarray

3.5.1 Puffer und Lösungen

Denaturierungslösung (10x):	1 M NaOH, 10 mM EDTA
Neutralisierungslösung (2x):	1 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0
Waschlösung I:	2x SSC, 1 % SDS
Waschlösung II:	0,1x SSC, 0,5 % SDS
20x SSC-Puffer:	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0

3.5.2 Herstellung von Hybridisierungssonden

Hybridisierungssonden wurden durch Amplifizierung von RNA *via* RAP-PCR (s. II.3.4.1) bzw. „nested“ RAP-PCR generiert (s. II.3.4.2). Zur radioaktiven Markierung wurden im Amplifizierungsschritt 28 μCi $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 3000 Ci/mmol) verwendet.

3.5.3 Aufreinigung von RAP-PCR-Reaktionen

Nachdem durch Gelelektrophorese und Autoradiografie (s. II.3.6.4) ein stabiles Fingerprintmuster nachgewiesen werden konnte, wurden RAP-PCR-Reaktionen von nicht eingebauten Nukleotiden und kleinen DNA-Fragmenten (< 0,1 kb) gereinigt. Dazu wurden NucleoSpin[®]-Säulen (Clontech, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Eluation der Hybridisierungssonden am Ende der Prozedur erfolgte in 100 μl .

3.5.4 Prähybridisierung

Zu jeder Membran wurden 6 ml vorgewärmte (68°C) Hybridisierungslösung (ExpressHyb, Clontech, Heidelberg), versetzt mit 0,1 mg/ml denaturierter (10 min 95°C) Salmon-Testis-DNA, in eine kleine Hybridisierungsflasche (Weithalsglasflasche 150x35 mm, Biometra, Göttingen) gegeben. Die Prähybridisierung zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte 30 min bei 68°C im Hybridisierungssofen (Biometra, Göttingen).

3.5.5 Denaturierung von Hybridisierungssonden

Die Hybridisierungssonden wurden während der Prähybridisierung der Membranen denaturiert. Dazu wurde die aufgereinigte Sonde mit 1/10 Volumen Denaturierungslösung (s. II.3.5.1) versetzt und für 20 min bei 68°C inkubiert. Anschließend fand eine Neutralisierung der Lösung durch Zugabe von 1 Volumen Neutralisierungslösung (s. II.3.5.1) statt. Der Ansatz wurde dann weitere 10 min bei 68°C inkubiert.

3.5.6 Hybridisierung

Die vorbereiteten Sonden (s. II.3.5.2, II.3.5.3, II.3.5.4) wurden der Prähybridisierungslösung zugemischt. Die Hybridisierung der Sonde mit den Membranen wurde bei 68°C über Nacht durchgeführt.

3.5.7 Waschen

Nach erfolgter Hybridisierung wurden verschiedene Waschschrte ausgeführt, um ungebundene Sonde zu entfernen. Zuerst wurde dreimal für jeweils 15 min bei 68°C mit Waschlösung I (s. II.3.5.1) gewaschen, anschließend zweimal mit Waschlösung II (s. II.3.5.1). Zur Entfernung von SDS-Rückständen wurden die Membranen bei Raumtemperatur in 2x SSC-Puffer (s. II.3.5.1) geschwenkt, bevor sie in Plastikfolie eingeschweißt wurden. Das Einschweißen schützte die Membranen vor Austrocknen. Somit standen sie für weitere Hybridisierungen zur Verfügung.

3.5.8 Phosphorimaging

Um Hybridisierungssignale sichtbar zu machen, wurden die Membranen für ca. fünf Tage auf einem Phosphorimager-Screen exponiert. Die von dem in der Hybridisierungssonde inkorporierten $\alpha^{32}\text{P}$ emittierte, ionisierende β -Strahlung erzeugt ein Abbild der Signale auf dem Screen. Beim Einscannen des Screens mittels eines Phosphorimagers (STORM 860, Molecular Dynamics, Freiburg) werden die BaFBR:EU⁺²-Kristalle des Screens durch einen Laserstrahl weiter angeregt. Dies führt zur Freisetzung von Energie in Form von blauem Licht. Anschließend fallen die BaFBR:EU⁺²-Kristalle wieder in ihren Grundzustand zurück. Das emittierte Licht kann detektiert und in ein quantitatives Bild umgesetzt werden.

Das erzeugte Bild konnte mittels ImageQuant-Software (Molecular Dynamics, Freiburg) bearbeitet werden. Die Auswertung erfolgte dann mittels AtlasTM 2.0-Software (Clontech, Heidelberg, s. II.3.5.9).

3.5.9 AtlasTM 2.0-Software

Die AtlasTM 2.0-Software wurde speziell für die Auswertung von AtlasTM cDNA-Expressionsarrays von Clontech (Heidelberg) entwickelt. Für jedes Hybridisierungssignal kann mittels dieser Software eine Expressionsintensität berechnet werden. Dazu muß die durch Phosphorimaging erzeugte Bilddatei (s. II.3.5.8) an ein Gitter angepaßt werden. Die Hybridisierungssignale müssen genau mit dem Gitter zur Deckung kommen (s. II.3.5.9.1). Desweiteren kann eine Normalisierung der errechneten Expressionsintensitäten auf die Expressionsstärke von Haushaltsgenen oder auf die generelle Expressionsstärke durchgeführt werden. Diese Normalisierung ermöglicht einen Vergleich von mehreren Arrays bezüglich differenziell exprimierter Gene (s. II.3.5.9.2).

3.5.9.1 Array-Alignment

Mittels zweier manuell einzustellender Orientierungspunkte kann ein vorgegebenes Gitter mit dem Bild der Membran zur Deckung gebracht werden. Im nächsten Schritt werden dann pro Gitterfeld zwei kreisrunde Felder (Spots) definiert, die mit der Lage der gespotteten cDNAs auf der Membran übereinstimmt. Die Position dieser Spots muß exakt der Position der Hybridisierungssignale angeglichen werden. Diese Anpassung kann automatisch von der Software ausgeführt werden (Auto-Alignment-

Funktion) oder aber manuell durchgeführt werden. Auch bei Verwendung der Auto-Alignment-Funktion war bei manchen Hybridisierungssignalen eine manuelle Feinkorrektur nötig, v.a. in der Umgebung sehr starker Signale. Im Zuge dieser Feinkorrektur wurden von benachbarten starken Signalen überstrahlte Spots von der Auswertung ausgeschlossen. Ebenso von der Analyse ausgeschlossen wurden Spots, bei denen parallele Spots unterschiedlich starke Hybridisierungssignale zeigten.

Für die Intensität der einzelnen Hybridisierungssignale eines Arrays wurde der Mittelwert der beiden parallelen Spots errechnet.

3.5.9.2 Array-Vergleich

Es konnten immer nur jeweils zwei Arrays miteinander verglichen werden. Diese wurden in der Vergleichsansicht (*Comparison View*) der Software dargestellt.

Um eine Standardisierung durchführen und unterschiedlich eingesetzte RNA-Mengen berücksichtigen zu können, standen mehrere Möglichkeiten der Normalisierung zur Verfügung: Normalisierung auf ein Haushaltsgen, Normalisierung auf eine Auswahl mehrerer Haushaltsgene oder eine globale Normalisierung. Die ersten beiden Methoden beruhen auf einem Abgleich der Expressionsintensität jedes Gens auf ein bzw. mehrere Haushaltsgene. Bei der globalen Normalisierung wird der Signalwert jedes einzelnen Hybridisierungssignals zum Abgleich herangezogen.

Die Expressionsintensitäten errechnen sich aus den abgeglichenen, normalisierten Werten abzüglich des Hintergrundwertes, multipliziert mit dem Normalisierungskoeffizienten. Dieser Koeffizient wird mittels Summenmethode (*Default*) ermittelt.

Pro Hybridisierungssignal/Gen werden zwei unterschiedliche normalisierte Werte angegeben: Verhältnis oder Ratio ($\text{Ratio} = \text{Intensität Array 2} / \text{Intensität Array 1}$) und Differenz ($\text{Differenz} = \text{Intensität Array 2} - \text{Intensität Array 1}$).

Die Vergleichsansicht der Software stellt pro Gen zwei Felder dar, das obere mit dem Verhältnis, das untere mit der Differenz. Zudem gibt es eine farbliche Kodierung:

Schwarz - nicht exprimiert

Grün - gleich stark exprimiert

Blau - in Array 2 schwächer exprimiert als in Array 1

Rot - in Array 2 stärker exprimiert als in Array 1

3.5.10 Strippen von Membranen

Um Membranen mehrmals verwenden zu können, mußte nach erfolgter Hybridisierung die zuletzt verwendete Hybridisierungssonde entfernt werden. Dazu wurden sie für 10 min bei 95°C in 0,5 % SDS gekocht. Nach zehnmütigem Abkühlen wurden die Membranen in 2x SSC geschwenkt und feucht in Plastikfolie eingeschweißt. Die Lagerung bis zur nächsten Hybridisierung erfolgte bei -20°C.

3.6 Gelelektrophorese

3.6.1 Puffer und Lösungen

TAE-Puffer:

40 mM	Tris
20 mM	Essigsäure
1 mM	EDTA

TBE-Puffer:

90 mM	Tris
90 mM	Borsäure
1 mM	EDTA

PAGE-Stammlösung:

226,8 g	Harnstoff
54 ml	TBE (10x)
90 ml	Acrylamid-bis-Fertiglösung (19:1)
216 ml	H ₂ O

PAGE-Gebrauchslösung (5 %):

100 ml	PAGE-Stammlösung
600 µl	APS (10 %)
60 µl	TEMED

Auftragspuffer für Agarosegele:

50 % (v/v)	Glycerin
0,05 %	Bromphenolblau
0,05 %	Xylenyanol
10 mM	Tris/HCl pH 8
1 mM	EDTA

Auftragspuffer für Polyacrylamidgele:

100 ml	Formamid
100 mg	Xylenyanol
100 mg	Bromphenolblau
2 ml	EDTA (0,5 M) pH 8,0

3.6.2 Agarosegele

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA, PCR-Produkten, Plasmiden und DNA-Fragmenten nach Restriktionshydrolyse erfolgte routinemäßig in horizontalen Agarosegelen mit je nach Bedarf 0,7 bis 2 % Agarose in TAE-Puffer (s. II.3.6.1). Die RNA- bzw. DNA-Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit Auftragspuffer (s. II.3.6.1) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte in TAE-Puffer bei konstanter Spannung (je nach Erfordernis 30 bis 100 V) bis zur gewünschten Auftrennung. Zur Sichtbarmachung von RNA- bzw. DNA-Banden unter UV-Licht (312 nm) enthielten die Gele 1 µg/ml Ethidiumbromid oder GelStar®. Als Längenstandard fanden die in Tabelle 12 aufgeführten DNA-Marker Verwendung.

3.6.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente aus Restriktionsansätzen zu isolieren oder PCR-Produkte aufzureinigen, wurden diese in Agarosegelen (s. II.3.6.2) aufgetrennt. Anhand der im Gel parallel aufgetrennten Längenmarker (s. Tabelle 12) konnte das zu isolierende Fragment unter UV-Licht identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Dieses wurde in ein ERG überführt und dann die enthaltene DNA mit Hilfe des „QIAquick™ Gel Extraction Kits“ nach Angaben des Herstellers eluiert.

3.6.4 Polyacrylamidgele

Für Fingerprintanalysen wurden radioaktiv markierte RAP-PCR-Produkte (s. II.3.4) in 5 % denaturierenden Polyacrylamid-TBE-Gelen aufgetrennt (PAGE). Es wurde eine vertikale Sequenzgelapparatur (Modell S2, Gibco, Karlsruhe) benutzt. Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen, wobei eine Glasplatte mit Acrylase vorbehandelt wurde, um das spätere Ablösen der Gele zu erleichtern. Nach Polymerisation wurden die Gele auf 45°C erwärmt (100 W, 30-40 min). Die Proben wurden 1:1 mit Auftragspuffer (s. II.3.6.1) versetzt, bei 95°C für 5 min denaturiert und auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer mit einer Leistung von 100 W bei konstanter Temperatur (45°C) für ca. 90 min.

Für Autoradiogramme wurden die Gele unter Kunststoffolie auf Whatman 3MM-Chromatografiepapier getrocknet. Dazu wurde ein beheizter Vakuum-Geltrockner (80°C, 60-120 min, Gel Dryer Modell 583, Biorad, München) verwendet.

Für Autoradiogramme war ein radioaktiv markierter Längenstandard erforderlich. Es wurde ein MspI-verdautes pBR322-Plasmid (New England Biolabs, Schwalbach) radioaktiv mittels Klenow-Fragment der DNA Polymerase I (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers markiert.

3.7 Klonierung, Sequenzierung und Sequenzauswertung

3.7.1 Klonierung

3.7.1.1 Puffer und Lösungen

LB₀-Medium:

15,5 g/l Luria Broth

LB₀-Agarplatten:

15,5 g/l Luria Broth
15 g/l Agar
80 µg/ml X-Gal

Je nach Bedarf wurde dem LB₀-Medium Antibiotikum zugesetzt:

100 µg/ml Ampicillin
50 µg/ml Kanamycin

3.7.1.2 Ligation und Transformation

PCR-Produkte konnten mit Hilfe des „TOPO™ TA Cloning® Kits“ (Invitrogen, Karlsruhe) direkt kloniert werden. TOPO-Vektoren stellen für die in der PCR durch die *Taq* Polymerase erzeugten 3'-A-überhängenden Enden kompatible 3'-T-Überhänge bereit. Die Klonierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Je nach PCR-Produktlänge kamen zwei unterschiedliche Vektoren (s. Tabelle 8) zum Einsatz. Die Transformation erfolgte in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (One Shot® TOP 10, s. Tabelle 6). Die transformierten Zellen wurden auf LB₀-Agarplatten (s. II.3.7.1.1) mit entsprechendem Antibiotikazusatz (s. Tabelle 8) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

Die verwendeten TOPO-Vektoren enthalten *lacZ'* und erlauben eine Identifikation positiver Klone mit Hilfe eines Blau-Weiß-Screenings auf X-Gal-Platten. Transformanden mit einem rekombinanten Plasmid erscheinen weiß bis hellblau, solche ohne blau.

Kulturen bis zu maximal 10 ml Volumen wurden im Reagenzglas, größere Volumina in Erlenmeyerkolben mit maximal 20 % Füllung bei 37°C über Nacht in einem Horizontalschüttler bei ca. 200 Upm (GLF 3017 Schüttler, GLF, Burgwedel) inkubiert.

3.7.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um Plasmid-DNA zu gewinnen, wurden Fertigsäulen und –lösungen („QIAprep® Spin Miniprep Kit“ für maximal 5 ml Kulturvolumen bzw. „QIAGEN® Plasmid Maxi Kit“ für maximal 50 ml Kulturvolumen) nach entsprechenden Herstellerangaben eingesetzt.

3.7.1.4 Glycerinkulturen

Transformierte *E. coli*-Stämme wurden als Glycerinkulturen gesichert. Dazu wurde eine 10 ml ÜK abzentrifugiert (10 min, 3000x g, Omnifuge 2.0RS, Heraeus Sepatech, Hanau) und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl LB-Glycerinmedium (LB:Glycerin 1:1) resuspendiert und in einem Schraubdeckelgefäß bei –80°C aufbewahrt.

3.7.2 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung von Nukleotidsequenzen wurde mit einem automatischen Kapillarsequenziergerät (ABI Prism 310, PE Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977), wobei die vier Abbruchnukleotide mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind. Das *Cycle Sequencing* wurde in 30 Zyklen durchgeführt, wobei eine Annealing-Temperatur von 50°C gewählt wurde. Dabei enthielt der Sequenzieransatz 100-200 ng gereinigtes PCR-Produkt bzw. 500-600 ng gereinigte Plasmid-DNA und 6 pmol des gewünschten Oligonukleotidprimers (s. Tabelle 7). Nach Auftrennung der DNA-Einzelketten wurden die Farbstoffe mit Laserlicht angeregt. Über einen Fotomultiplier wurde die entsprechende Strahlung detektiert und die Meßsignale mit einem Datenanalyseprogramm ausgewertet. Die Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeit von Herrn Melzl und Herrn Köster am Institut für Medizinische Mikrobiologie (Prof. Wolf), Universität Regensburg, ausgeführt.

3.7.3 Sequenzdatenanalyse

Die Auswertung von Sequenzen wurde mit Hilfe des NCBI BLAST-Servers (blastx 2.01.10, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, Altschul *et al.*, 1997) und dem Programm DNAsis 2.5 (Hitachi Software Engineering, Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

4. Proteinchemische Methoden

4.1 Lösungen und Puffer

Lysepuffer (modifizierter RIPA-Puffer):

50 mM	Tris/HCl pH 8,0
100 mM	NaCl
1 % (v/v)	NP-40
0,1 %	SDS
10 mM	Na ₄ P ₂ O ₄
10 % (v/v)	Glycerin
1 Tablette	Complete Proteasen Inhibitoren Cocktail (pro 10 ml Lysepuffer)

Sammelgelpuffer (4x):

500 mM	Tris/HCl pH 6,8
0,4 %	SDS

Trenngelpuffer (4x):

1,5 M	Tris/HCl pH 8,8
0,4 %	SDS

Auftragspuffer (Lämmli-Puffer):

60 mM	Tris/HCl pH 7,5
10 % (v/v)	Glycerin
5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
2 %	SDS
0,01 %	Bromphenolblau

Laufpuffer (pH 8,5):

25 mM	Tris
20 mM	Glycin
0,1 %	SDS

Transferpuffer/Semi-Dry-Blotpuffer:

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
20 % (v/v)	Methanol

TBST-Puffer:

20 mM	Tris
14 mM	NaCl
0,1 % (v/v)	Tween [®] -20 pH 7,6

TBST*-Puffer:

10 mM	Tris
150 mM	NaCl
0,1 % (v/v)	Tween®-20
5 %	Magermilch
	pH 7,6

TBST°-Puffer:

10 mM	Tris
150 mM	NaCl
0,1 % (v/v)	Tween®-20
3 %	Magermilch
	pH 7,6

4.2 Zellaufschluss zur Proteingewinnung

Um Zellen zur Proteingewinnung aufzuschließen, wurden sie entweder durch Zentrifugation (10 min, 300x g, Omnifuge 2.0RS, Heraeus Sepatech, Hanau) aufkonzentriert und in Protein-Lysepuffer in einem ERG aufgenommen oder direkt in der Zellkulturflasche bzw. in der 6-Loch Platte mit Protein-Lysepuffer überschichtet und durch mehrmaliges Schwenken lysiert. So gewonnene Zelllysate wurden mit gepulstem Ultraschall homogenisiert. Verwendet wurde dazu ein Sonopuls UW 70 (Bandelin electronic, Berlin) mit konischer Mikrospitze. Dabei wurden „power“ 30 % und „Puls“ 50 % als Parameter gewählt. Anschließend wurden die Lysate bei 4°C für 30 min abzentrifugiert (10000x g, Biofuge fresco, Heraeus, Hanau), um alle im Lysat verbliebenen Zellbestandteile zu entfernen.

4.3 Analyse von Proteinlösungen

4.3.1 Proteinmengen-Bestimmung

Proteinmengen und -konzentrationen wurden kolorimetrisch mit Hilfe des „BCA Protein Assay Kits“ (Sigma, Deisenhofen) nach Herstellerangaben bestimmt. Das Verfahren beruht im Wesentlichen auf einer Modifikation der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976; Zor und Seliger, 1996).

4.3.2 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung denaturierter Proteine wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese mit vertikalen SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt (Lämmli, 1970). Die Konzentration des Trenngels lag je nach Bedarf bei 6-15 %, die des Sammelgels jeweils bei 5 %. Der Gellauf erfolgte in einer XCell II™ Mini-Cell Apparatur (Novex, Frankfurt). Proteinproben wurden vor dem Auftrag mit einem Viertelvolumen

Auftragspuffer (s. II.4.1) versetzt und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte bei 170 V bis die Lauffront die Gelunterkante erreichte (60-90 min).

4.3.3 Western Blot

4.3.3.1 Transfer von Protein auf Membranen (Elektroblot)

Für den Transfer von Protein wurde eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm) verwendet. Der Transfer von Protein aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembran erfolgte mittels elektrischem Feld in einer Blot-Apparatur (XCell II™ Blot Module, Novex, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers. Vor dem Blot mußte die Membran gemeinsam mit dem Gel und den benötigten Whatman 3MM-Filterpapierstücken kurz in Transferpuffer äquibriert werden. Die Blot-Dauer betrug 60 min. Die maximale Stromstärke wurde entsprechend der Gelgröße (5,5 mA pro cm² Gel) eingestellt. Als Transferpuffer diente Semi-Dry-Blotpuffer (s. II.4.1). Der erfolgreiche Transfer der Proteine wurde durch eine Ponceau S-Färbung der Membran (s. II.4.3.3.2) kontrolliert.

4.3.3.2 Ponceau-S-Färbung

Um auf Filtermembranen transferierte Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden die Membranen eine Minute mit einer 0,2 %igen Lösung von Ponceau S in 3 % (v/v) TCA reversibel gefärbt (Salinovich und Montelaro, 1986). Sofort anschließend wurde durch Waschen mit H₂O_{dest} der Hintergrund entfärbt. Somit konnte der Transfererfolg überprüft und wenn erforderlich auch dokumentiert werden. Weiteres Waschen der Membran mit H₂O_{dest} führte zu einer vollständigen Entfärbung der Membran, mit der anschließend wie gewohnt verfahren werden konnte.

4.3.3.3 Immunologischer Nachweis

Nach dem Transfer von Protein auf Nitrocellulosemembran wurden die Membranen in TBST*-Puffer (s. II.4.1) für 4 h oder über Nacht abgesättigt. Anschließend folgte eine Inkubation für mindestens 2 h oder über Nacht mit einer Lösung des primären Antikörpers (s. Tabelle 10) in TBST°-Puffer (s. II.4.1). Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST wurde eine Stunde mit sekundären, Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Antikörpern (s. Tabelle 10) inkubiert und erneut fünfmal in TBST gewaschen.

III. ERGEBNISSE

1. Die Rolle von *ptprg* für das Kolonkarzinom

Eine Identifizierung von *ptprg* als mögliches Kandidatengen für die Entstehung von Kolonkarzinomen war das Ergebnis von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe. Das mRNA-Expressionsmuster von normalen intestinalen Epithelzellen und Epithelzellen aus Tumorgewebe wurde verglichen. Dazu wurden Epithelzellen aus Normal- und Tumorkolongewebe isoliert und einer differenziellen Genexpressionsanalyse (RAP-PCR) unterzogen. *Ptprg* konnte als differenziell exprimiert identifiziert werden. Die Hochregulierung von *ptprg* im Tumor für diesen einen Kolonkarzinom-Fall konnte anschließend mittels einer semi-quantitativen, genspezifischen RT-PCR nachgewiesen werden (Kullmann *et al.*, 1999, s. Abbildung 5).

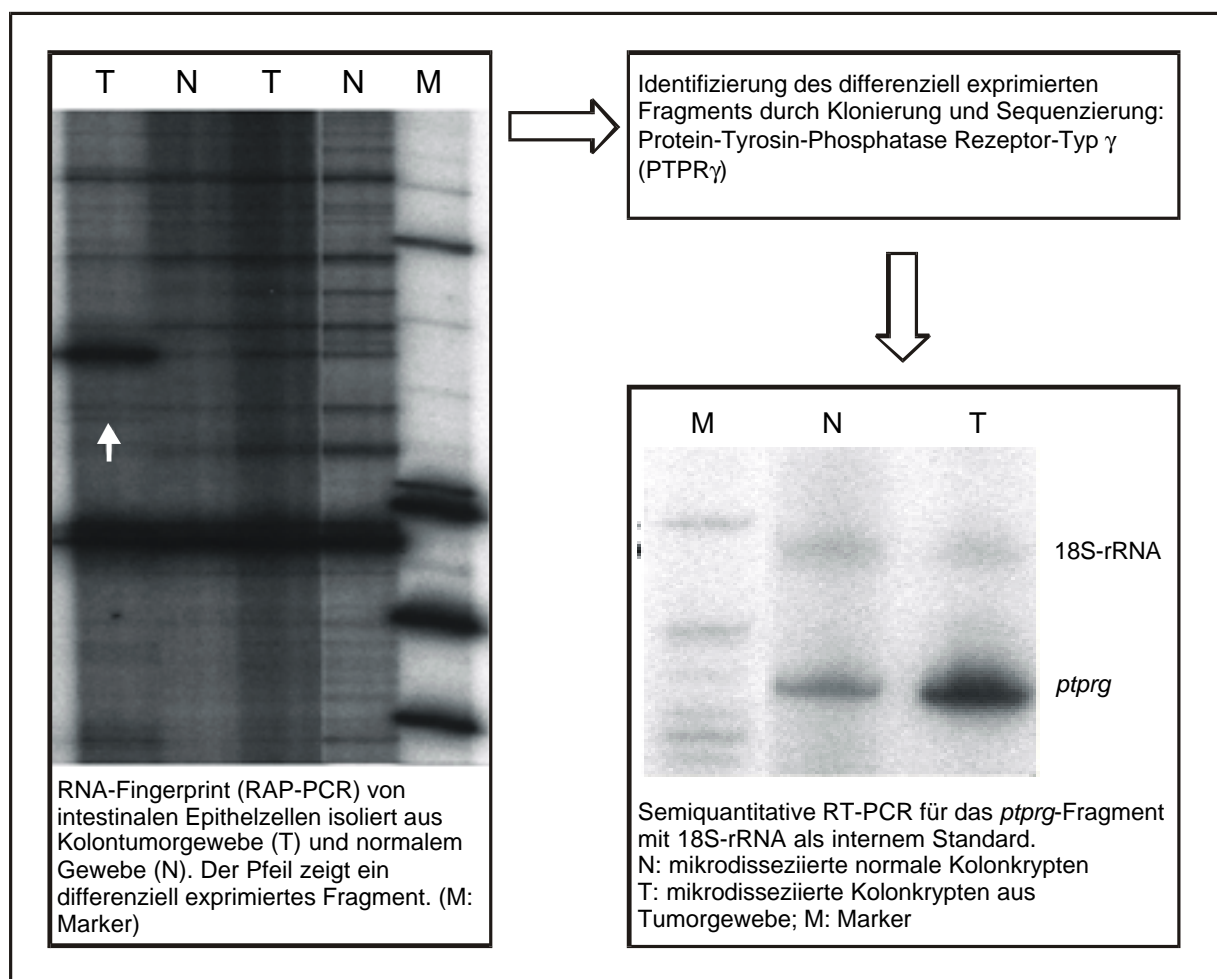


Abbildung 5: Identifizierung von *ptprg* als Kandidatengen für das Kolonkarzinom

Im Folgenden sollte die Expression von *ptprg* in einer größeren Anzahl an Kolonkarzinom-Fällen untersucht werden sowie mögliche Funktionen näher charakterisiert werden.

1.1 *Ptprg* Expression im Gewebe

1.1.1 Fälle

Es standen cDNAs von 19 Kolontumorgeweben und korrespondierendem Normalgewebe zur Verfügung. Die Tumore waren bezüglich Mikrosatellitenstatus und LOH charakterisiert und wurden von K. Beyser, Institut für Pathologie, Städtische Kliniken Kassel, zur Verfügung gestellt. Vier der 19 Fälle wiesen eine Mikrosatelliteninstabilität (MIN) auf, zwei davon waren in die Kategorie sporadisches Kolonkarzinom und die zwei anderen Fälle in die Kategorie erbliches Kolonkarzinom (HNPCC) einzuordnen. Die restlichen 15 Fälle waren in den Konsensussequenzen mikrosatellitenstabil (MSS). Bei den 15 stabilen Fällen konnte in zwei Fällen ein LOH im *APC*-Gen gefunden werden (K. Beyser, persönliche Mitteilung, vgl. Anhang 2).

1.1.2 Realtime PCR

19 Normal- und Tumor-cDNAs wurden hinsichtlich *ptprg*-Expression analysiert. Dazu wurde ein Realtime-PCR-Ansatz mit relativer Quantifizierung gewählt (s. II.3.3). Die PCR-Bedingungen wurden optimiert und die Effizienzen (E) ermittelt. Für ein $MgCl_2$ -Optimum von 3 mM und eine optimale Annealing-Temperatur von 54°C lagen die Effizienzen bei $E_{ptprg}=2,02$ und bei $E_{18S}=1,95$. Alle Reaktionen wurden zweifach durchgeführt.

73,7 % der Fälle (14 von 19) zeigten eine Hochregulierung der *ptprg*-mRNA, wobei die Werte zwischen 1,2 und 89-facher Hochregulierung lagen (s. Abbildung 6). Bei 52,6 % der Fälle (10 von 19) lag dabei eine Hochregulierung um mehr als vierfach vor. Fünf Fälle (26,3 %) zeigten im direkten Vergleich zu korrespondierender normaler Kolonmukosa eine Herunterregulierung der *ptprg*-mRNA (1,1 bis 23,1-fach, s. Abbildung 6). Es handelte sich hierbei um ein erbliches hochinstabiles Kolonkarzinom, ein mikrosatellitenstabiles Kolonkarzinom mit einem LOH im *APC*-Gen sowie drei weitere mikrosatellitenstabile Kolonkarzinome.

Drei der vier MIN-Fälle zeigten eine Hochregulierung der *ptprg*-mRNA (89-, 8,5-, 12,4-fach), während einer der Fälle eine Herunterregulierung aufwies (17-fach).

Innerhalb der MSS-Fälle konnte bei elf Fällen (73,3 %) eine Hochregulierung beobachtet werden und bei vier Fällen (26,7 %) eine Herunterregulierung. Einer der beiden MSS-Fälle mit LOH zeigte eine Hoch-, der andere eine Herunterregulierung. Es konnte keine Relation zwischen dem *ptprg*-Expressionsniveau und dem Mikrosatellitenstatus der Tumore hergestellt werden. Ebenso zeigten Kolonkarzinome mit herunterregulierter *ptprg*-mRNA-Expression im Vergleich zu solchen mit hochregulierter Expression keine besonderen Auffälligkeiten in der makro- oder histopathologischen Beurteilung.

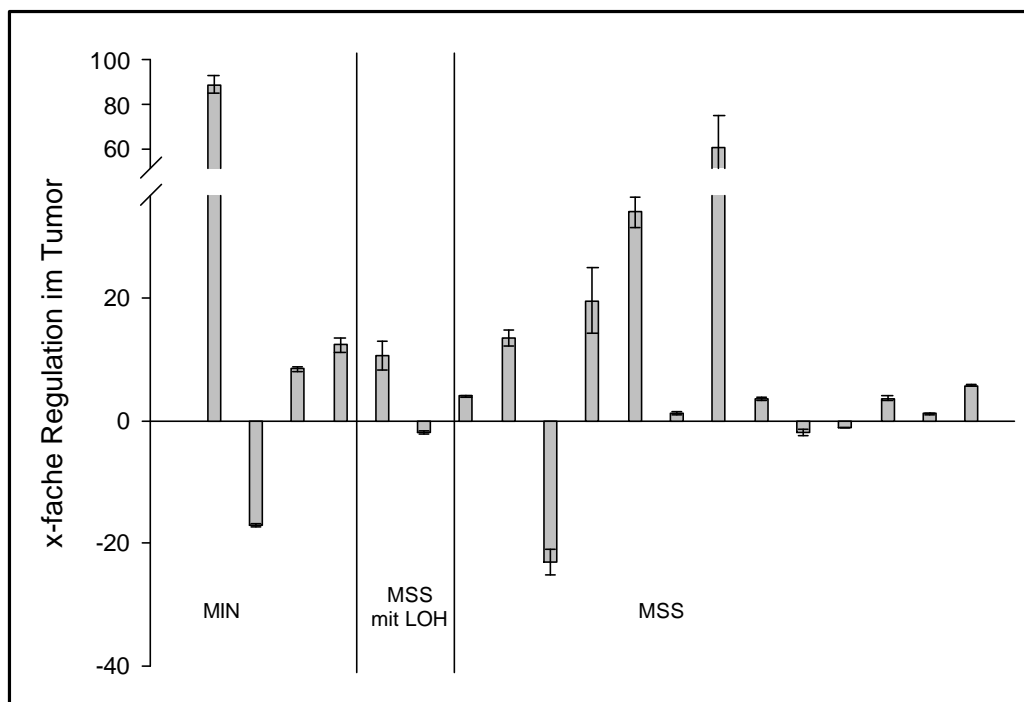


Abbildung 6: Auswertung der Realtime PCR-Analyse

Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von zwei unabhängigen PCR-Experimenten. Pro Probe wurden zwei unabhängige PCR-Reaktionen durchgeführt, eine Reaktion mit Primern für *ptprg* und eine Reaktion mit Primern für 18S-rRNA. Es wurde eine relative *ptprg* Produktmenge errechnet, wobei eine Standardisierung auf 18S-rRNA eingeschlossen wurde. Die relative *ptprg*-Produktmenge von N und T wurde anschließend ins Verhältnis gesetzt.

1.1.3 Lokalisierung von *ptprg*-mRNA im Gewebe

Zur Lokalisierung von *ptprg*-mRNA im Gewebe wurde die Methode der *in situ* Hybridisierung gewählt. Dazu wurden RNA-Sonden für *ptprg* hergestellt (s. II.1.4 Tabelle 9, II.2.4.2). Es konnte eine *ptprg*-Expression in Kolonkrypten, genauer in Epithelzellen, nachgewiesen werden; auch vereinzelte Zellen im Stromagewebe lieferten ein positives *ptprg*-Signal.

1.2 *Ptprg*-Überexpression in einer Zelllinie

1.2.1 *Ptprg*-Expression in Kolonkarzinom-Zelllinien

Für Überexpressionsexperimente wurde eine Kolonkarzinom-Zelllinie gesucht, die ohne Transfektion keine *ptprg*-Basisexpression zeigte. Dazu wurde zuerst die *ptprg*-Expression in Kolonkarzinom-Zelllinien (HT-29, SW620, LoVo und HCT-15) sowie Kontrollzelllinien (HT1080, 23132/87, RA und OA Fibroblasten) bestimmt (s. Abbildung 7). Dazu wurde ein Realtime-PCR-Ansatz mit Bedingungen wie in III.1.1.2 beschrieben verwendet.

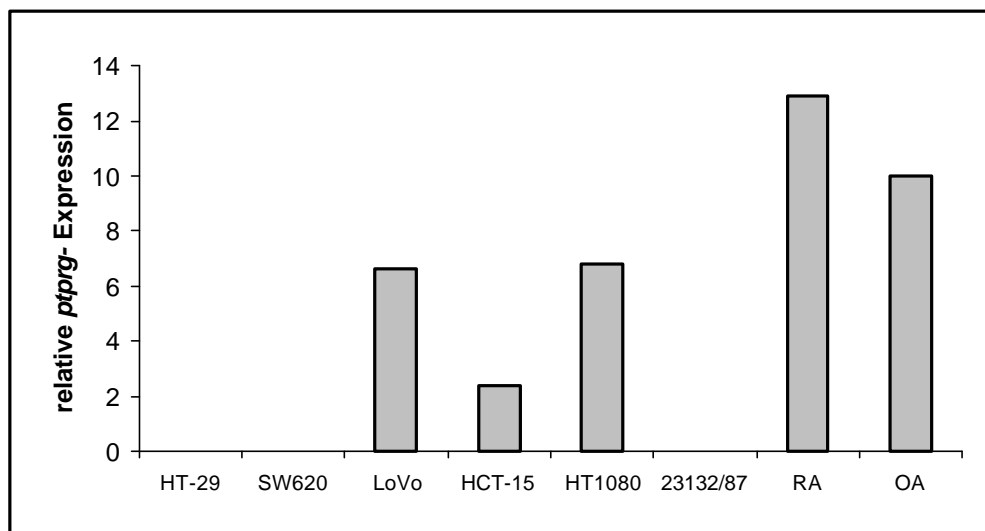


Abbildung 7: Relative *ptprg*-Expression in Kolonkarzinom- sowie Kontroll-Zelllinien ermittelt mittels Realtime-PCR

Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei durchgeführten Wiederholungen. (HT-29, SW620, LoVo, HCT-15: Kolonkarzinom-Zelllinien; HT1080: Fibrosarkom-Zelllinie; 23132/87: Magenkarzinom-Zelllinie; RA bzw. OA: Synoviale Fibroblasten von Patienten mit Rheumatoider bzw. Osteoarthritis)

Die Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 hat sich aufgrund der fehlenden *ptprg*-Basisexpression (vgl. Abbildung 7) als geeignet für Überexpressionsexperimente erwiesen und wurde für weitere Experimente verwendet.

1.2.2 Optimierung von Transfektion und Selektion

1.2.2.1 Transfektion

Die Transfektion von HT-29 Zellen mit einem *ptprg*-Expressionsplasmid (s. II.1.4 Tabelle 9) erfolgte unter Verwendung des Transfektionsreagenz FuGENE (s. II.2.1.5). Zuerst wurde ein optimales FuGENE:DNA Verhältnis für HT-29 Zellen ermittelt. Als Maß für die Transfektionseffizienz wurde das *ptprg*-mRNA-Niveau durch Realtime-Quantifizierung bestimmt. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich, hat sich das Verhältnis von 6 μ l FuGENE zu 3 μ g Plasmid-DNA (Spur 3) als ausreichend für die Transfektion von HT-29 Zellen erwiesen.

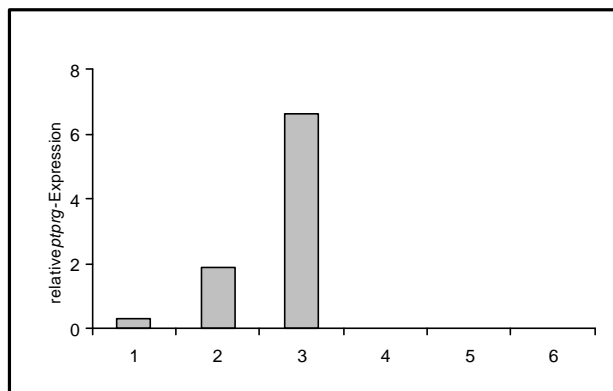


Abbildung 8:

Evaluierung der *ptprg*-Transfektionseffizienz mittels Realtime-PCR

- 1: *ptprg*-Transfektion: 3 μ l FuGENE zu 0,5 μ g Plasmid-DNA (*ptprg*)
- 2: *ptprg*-Transfektion: 6 μ l FuGENE zu 2,0 μ g Plasmid-DNA (*ptprg*)
- 3: *ptprg*-Transfektion: 6 μ l FuGENE zu 3,0 μ g Plasmid-DNA (*ptprg*)
- 4: Negativkontrolle nur mit Plasmid-DNA ohne FuGENE
- 5: Negativkontrolle nur mit FuGENE ohne Plasmid-DNA
- 6: GFP-Transfektion: 6 μ l FuGENE zu 3 μ g Plasmid-DNA (GFP; Kontrollplasmid)

Zur Bestimmung der Transfektionsrate kam ein Kontrollplasmid mit GFP-Reporter zum Einsatz. Transfizierte Zellen konnten leicht fluoreszenzmikroskopisch detektiert und ausgezählt werden, da alle GFP-transfizierten Zellen eine grüne Fluoreszenz aufwiesen. Diese Versuche haben gezeigt, dass maximal 5 % aller Zellen unter den ermittelten „optimierten“ Bedingungen transfiziert wurden.

Mittels Western Blot (s. II.4) konnte kein PTPRG selbst in der Population mit der höchsten mRNA-Expression nachgewiesen werden. Der einzige zur Verfügung stehende Antikörper liefert bekanntermaßen nur bei sehr starken PTPRG-Expressionen detektierbare Signale (C. Sorio, persönliche Mitteilung).

1.2.2.2 Selektion

Die gewonnenen Ergebnisse zur erzielbaren Transfektionsrate machten deutlich, dass eine Selektion auf transfizierte Zellen erforderlich war. Da das Expressionsplasmid als Selektionsmarker eine Geneticin-Resistenz trug, konnten *ptprg*-positive Zellen durch den Zusatz von Geneticin (G418) selektioniert werden.

Zur Ermittlung der notwendigen Konzentration an Geneticin wurden HT-29 Zellen in 96-Loch-Platten ausgesät, mit 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750 und 1000 µg Geneticin pro ml Medium für mindestens 14 Tage inkubiert und anschließend die Vitalität mittels MTS-Test (s. II.2.1.3) bestimmt. 500 µg Geneticin pro ml Medium erwiesen sich als ausreichend, um nicht-transfizierte HT-29 Zellen quantitativ zu eliminieren (Daten nicht gezeigt).

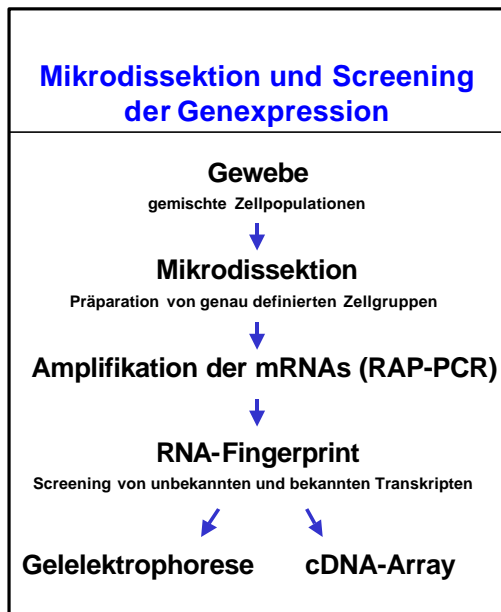
Die Selektion mußte zeitversetzt zwei Tage nach der Transfektion erfolgen, da sich ansonsten die Zellen nach einigen Tagen vom Boden der Kulturplatte ablösten, vermutlich durch zwei Stressoren bedingt durch Transfektion und Selektion.

Das vor der Transfektion linearisierte Konstrukt wurde in das Genom der Zellen integriert. Das Expressionsplasmid wurde dazu außerhalb des für *ptprg*-kodierenden Bereichs durch Restriktionshydrolyse mit *ScaI* im Ampicillin-Resistenzgen des Vektors geschnitten und linearisiert.

Weitere Selektionsversuche zeigten, dass es nötig war, möglichst früh Vereinzellungen der transfizierten Zellen durchzuführen, um ein Überwachsen der *ptprg*-positiven Klone durch falsch-positive zu verhindern. Die Vereinzellungen wurden manuell mit Hilfe einer Pipette durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte aufgrund der sehr zeitaufwändigen Prozedur bisher keine *ptprg*-positive Reinkultur erhalten werden.

2. Entwicklung einer neuartigen methodischen Strategie

Um molekulare Veränderungen in genau definierten, mikroskopisch kleinen Gewebeproben wie aberranten und früh-adenomatösen Krypten ermitteln zu können, war es nötig, eine neue methodische Strategie zu entwickeln. Genau definierte,



mikroskopisch kleine Gewebeproben wurden aus Gefrierschnitten durch lasergesteuerte Mikrodisektion (LGM und LPC) isoliert und anschließend bezüglich Genexpression auf mRNA-Ebene unter Zuhilfenahme von RAP-PCR und cDNA-Expressionsarrays analysiert (Abbildung 9). Dies erforderte einige methodische Optimierungen, da alle bisher bekannten mRNA-Screening-Techniken sehr große Mengen an RNA benötigten, welche nach lasergesteuerter Mikrodisektion nicht zur Verfügung gestellt werden können.

Abbildung 9:
Schema der methodischen Strategie

2.1 Vorarbeiten

2.1.1 Effektivität unterschiedlicher Fixierungsmethoden für Gefrier- gewebeschnitte

Für eine erfolgreiche Durchführung lasergesteuerter Mikrodisektionen war ein vollständig dehydrierter Gewebeschnitt notwendig. Die Qualität der Fixierung wurde anhand verschiedener Merkmale beurteilt:

- Das Gewebe wies auch nach Fixierung noch eine akzeptable Morphologie auf, so dass Strukturen noch ausreichend genau erkannt werden konnten.
- Das Ausschneiden der gewünschten Gewebebereiche mit Hilfe eines Laserstrahls und das Katapultieren der ausgeschnittenen Bereiche in ein LPC-Mikrozentrifugenröhrchen waren mit Standardeinstellungen des Lasers durchzuführen.
- Intakte RNA konnte aus dem mikrodisezierten Gewebe isoliert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass quervernetzende Fixanzien wie z.B. Formalin nicht für auf RNA basierende Anwendungen geeignet sind. Dagegen haben Ethanol und Aceton Fixierungseigenschaften, die eine Isolierung von RNA mit guter Qualität ermöglichen (Goldsworthy *et al.*, 1999).

Um Fixierungsbedingungen für optimale RNA-Stabilität und -Quantität aus Darmgewebe zu ermitteln, wurden folgende Parameter getestet: Aceton- bzw. Ethanolkonzentration, Fixierungstemperatur und Fixierungsdauer (s. Tabelle 14).

Es wurden Gefrierschnitte (5 µm) angefertigt, auf unterschiedliche Art und Weise fixiert (s. Tabelle 14), RNA isoliert (s. II.3.1.1) und anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese (s. II.3.6.2) bzw. eine RT-PCR (s. II.3.2.1, II.3.2.2.1) mit Primern für die Haushaltsgene *gapdh* oder *b-actin* (s. Tabelle 7) durchgeführt.

Eine gelelektrophoretische Analyse zeigte, dass die RNA nach Ethanolfixierung (70 % und 100 %) des Gewebes sowohl qualitativ als auch quantitativ hochwertiger einzustufen war als nach Acetonfixierung (100 %, Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse einer RT-PCR mit Primern für Haushaltsgene mit RNA aus ethanolfixierten Gewebeschnitten sind in Tabelle 14 dargestellt. Eine optimale RNA-Qualität und -Quantität wurde durch Fixierung mit Ethanol/Eisessig (20/1) bei -20°C erzielt. Für diese Fixierungsart konnten konstant und reproduzierbar RT-PCR-Produkte erhalten werden. Die Fixierungsdauer hatte keinen offensichtlichen Einfluß auf die RNA-Qualität, weshalb für alle weiteren Versuche die kürzere Dauer gewählt wurde.

Tabelle 14: Getestete Fixierungsbedingungen und Ergebnisse der RT-PCR

Die Versuche wurden zweimal unabhängig voneinander durchgeführt, jeweils mit 5 parallel fixierten Schnitten. 3 (5): 3 von insgesamt 5 parallel ausgeführten Reaktionen zeigten ein positives Signal in der RT-PCR mit Primern für die Haushaltsgene *gapdh* oder *b-actin*.

Fixanz	Temperatur [°C]	Dauer	Ergebnisse der RT-PCR	
Ethanol 70 %	Raumtemperatur	10 min	3 (5)	2 (5)
Ethanol 70 %	Raumtemperatur	20 h	3 (5)	2 (5)
Ethanol 70 %	-20	10 min	3 (5)	4 (5)
Ethanol 70 %	-20	20 h	3 (5)	4 (5)
Ethanol/Eisessig (20/1)	Raumtemperatur	10 min	4 (5)	4 (5)
Ethanol/Eisessig (20/1)	-20	10 min	4 (5)	5 (5)
Ethanol/Eisessig (20/1)	-20	20 h	4 (5)	5 (5)

2.1.2 Optimierung der RNA-Isolierung aus Gefriergewebeschnitten

RNA-Isolierungen wurden mit dem „RNeasy[®] Mini Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt. Als Anpassung an die zu erwartenden kleinen RNA-Mengen aus Gewebeschnitten wurden folgende Ergänzungen des Standardprotokolls vorgenommen:

Dem Lysepuffer wurden 2 µg einer synthetischen RNA (PolyA) als Träger-RNA zugesetzt. Dies beeinflusste nachfolgende Analysen nicht und die Verluste an der zu isolierenden RNA aus dem Gewebe konnten minimiert werden. Desweiteren wurde das Eluationsvolumen von 50 µl auf 30 µl verringert und das Eluat ein zweites Mal auf die Säule appliziert, um RNA-Verluste beim Eluieren zu vermeiden.

2.1.3 Grenzen der Standard-RAP-PCR

Standardmäßig wurde RAP-PCR mit RNA aus Zellkulturen durchgeführt (s. II.3.4.1). Dabei wurden 100-500 ng RNA pro RAP-PCR-Reaktion eingesetzt. Diese RNA-Mengen standen aber nach lasergesteuerter Mikrodissektion aus Gewebeschnitten nicht zur Verfügung. Daher wurde zuerst die Zellzahl bestimmt, aus der noch ausreichend RNA für Standard-RAP-PCR präpariert werden konnte: Es wurde RNA aus 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ und 10⁶ HT-29 Zellen isoliert und diese Standard-RAP-PCR-Analysen unterzogen. Dabei wurde auf Stabilität und Reproduzierbarkeit des RNA-Fingerprint-Musters, d.h. auf ein identisches Bandenmuster in parallelen Reaktionen einer RNA-Lösung, geachtet. Ebenso ging das Vorhandensein von Banden im Bereich von 400-500 bp in die Bewertung ein, da dies einen Hinweis auf die RNA-Qualität (Größe der isolierten RNA-Fragmente) lieferte.

Ausreichende Stabilität und Reproduzierbarkeit zeigten sich nur bei den RAP-PCR-Fingerprints von 10⁵ und 10⁶ HT-29 Zellen.

2.2 Ausarbeitung eines RAP-PCR Protokolls für kleine RNA-Mengen (< 100 ng)

2.2.1 „Nested“ Strategie

Das Problem der Reproduzierbarkeit bei geringen RNA-Mengen in RAP-PCR-Fingerprint-Analysen konnte dadurch gelöst werden, dass die Zweitstrangsynthese in zwei Amplifikationsschritten (zweistufig) durchgeführt wurde. Diese „nested“ Strategie

ermöglichte stabile und reproduzierbare RAP-PCR-Fingerprints mit RNA aus ca. 50 HT-29 Zellen. Dazu waren folgende Optimierungen notwendig:

Für beide Amplifizierungsschritte wurde eine optimale Zyklenzahl ermittelt (niedrigste Zyklenzahl für beide Amplifizierungsschritte, um ein stabiles Fingerprintmuster zu erhalten): Im ersten Schritt wurden 15, im zweiten Schritt 35 Amplifizierungszyklen für ausreichend befunden.

Die gesamte RNA aus einem Isolierungsvorgang (30 µl) wurde in die reverse Transkription eingesetzt. Diese Reaktion wiederum wurde komplett in den ersten Amplifizierungsschritt eingesetzt, während 1/3 des Amplifikats des ersten Schrittes für den zweiten Amplifizierungsschritt ausreichend war. Dabei hat es sich als notwendig erwiesen, die Reaktionen vor dem Einsetzen in die nächste Reaktion aufzukonzentrieren und aufzureinigen. Anfangs geschah dies mit Hilfe des „QIAquick™ PCR Purification Kits“. Nachdem aber Stabilitätsschwankungen im RAP-PCR-Fingerprint zu beobachten waren, wurden die Reaktionen zwischen den einzelnen Schritten mit Ethanol präzipitiert. Dadurch konnten RNA- bzw. cDNA-Verluste minimiert und somit stabilere Bedingungen geschaffen werden.

Die genannten Optimierungen wurden mit unterschiedlichen Primerkombinationen getestet. Dabei kamen nur Primerpaare zum Einsatz, die sich in Standard-RAP-PCR-Analysen bewährt hatten (M. Judex, persönliche Mitteilung). Die „nested“ Primer wurden nach unterschiedlichen Strategien ausgewählt. *OPN 21 nested* verfügt über eine, *Nuklear 2+* über drei zusätzliche Basen am 3'-Ende. Entsprechend fehlen bei *OPN 21* am 5'-Ende eine und bei *Nuklear 2+* drei Basen. *Kin A- nested* umfaßt eine Teilsequenz von *Kin A-*.

Folgende Kombinationen kamen zum Einsatz:

Tabelle 15: Primerkombinationen für „nested“ RAP-PCR

Primer RT	Primer 1.Schritt	Primer 2.Schritt
US 6	OPN 21	OPN 21 nested
OPN 23	OPN 21	OPN 21 nested
US 6	Kin A-	Kin A- nested
OPN 23	Kin A-	Kin A- nested
OPN 23	Nuklear 1+	Nuklear 2+
OPN 24	Nuklear 1+	Nuklear 2+

Dabei hat sich die Kombination *OPN 23/OPN 21/OPN 21 nested* als die Beste für RAP-PCR-Analysen mit „nested“ Strategie aus kleinen RNA-Mengen erwiesen. Mit

dieser Kombination konnten in Polyacrylamidgel-Analysen die größte Zahl an Banden erhalten werden. Somit konnte eine große Anzahl an Transkripten in das Screening eingeschlossen werden. Zudem war zu beobachten, dass auch ein größerer Anteil an Produkten im höher-molekularen Bereich (400-500 bp) lag. Dies war v.a. im Vergleich mit Reaktionen mit *Kin A*/*Kin A-nested* auffällig, bei denen v.a. Produkte im mittleren Bereich (200-300 bp) zu detektieren waren.

2.2.2 „Nested“ RAP-PCR in Kombination mit lasergesteuerter Mikrodissektion

Zur Bestimmung der Mindest-Zellmenge aus Gewebematerial für RAP-PCR wurden 10, 20, 30, 50 und 100 quergeschnittene Krypten mikrodisseziert und daraus isolierte RNA in „nested“ RAP-PCR-Reaktionen eingesetzt. Es zeigte sich, dass mindestens 200 Zellen (entsprechend ca. 20 quergeschnittene Krypten) benötigt werden, um eine ausreichende Reproduzierbarkeit und Stabilität der Fingerprints zu gewährleisten.

Als entscheidende Limitierung für Stabilität und Reproduzierbarkeit hat sich die Qualität des Gefriermaterials erwiesen. Die RNA-Isolation aus Darmgewebe ist kritisch, da im Darm eine sehr hohe enzymatische Aktivität herrscht. Die Gewebeproben müssen frisch sein und sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren werden, um eine erfolgreiche RAP-PCR zu ermöglichen.

Ein weiterer problematischer Schritt war die DNase-Behandlung der RNA aus dehydriertem, gelasertem Gewebe. Da geringste DNA-Mengen RNA-Fingerprints verfälschen können, war ein ausreichend effektiver DNase-Verdau notwendig. Erst eine Verdopplung der Inkubationsdauer (30 anstatt der vom Hersteller empfohlenen 15 min) führte zu akzeptablen Ergebnissen. Die Qualität der DNase-Behandlung konnte durch eine PCR-Reaktion ohne vorausgegangene reverse Transkription getestet werden.

2.3 cDNA-Expressionsarrays

2.3.1 RAP-PCR-Produkte als Hybridisierungs sonden

RAP-PCR-Reaktionen, die die Kriterien der Stabilität und Reproduzierbarkeit in Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Analysen erfüllten, wurden als Hybridisierungs sonden für cDNA-Expressionsarrays verwendet. Da für cDNA-Expressionsarrays hoch-aktive radioaktiv markierte Sonden nötig waren, wurde das gesamte dATP einer RAP-PCR-Reaktion durch $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ ersetzt. Der Einbau erfolgte während der Amplifizierung im zweiten PCR-Schritt ("nested" Schritt). So markierte RAP-PCR-Reaktionen wurden mit Arraymembranen hybridisiert (s. II.3.5).

Die Kombination von lasergesteuerter Mikrodissektion und cDNA-Expressionsarray bietet eine einzigartige Möglichkeit, die Genexpression in Subpopulationen aus nativer Umgebung (Gewebe) isolierter Zellen zu evaluieren.

2.3.2 Auswertung und Normalisierung von cDNA-Expressionsarrays

Zur Auswertung von cDNA-Expressionsarrays wurde die speziell für die Auswertung und Normalisierung von AtlasTM cDNA-Expressionsarrays entwickelte AtlasImageTM 2.0-Software von Clontech verwendet. Es hat sich gezeigt, dass bei unterschiedlichen Hybridisierungen die Signalintensität sowie der Hintergrundwert sehr unterschiedlich sein können. Dies stellte ein großes Problem beim Vergleich von Arrays aus unterschiedlichen Hybridisierungen dar. Deshalb war es notwendig eine Normalisierung durchzuführen.

Für die Wahl des Korrekturfaktors gab es mehrere Möglichkeiten: den Signalmittelwert aller Spots (globale Normalisierung), den Signalwert **eines** Haushaltsgens oder den Mittelwert mehrerer Haushaltsgene (benutzerdefinierte Normalisierung). Abbildung 10 zeigt exemplarisch die Auswirkungen unterschiedlicher Korrekturfaktoren auf die Auswertung. Das Muster der unterschiedlich exprimierten Gene variierte in einigen Fällen drastisch. Während Auswertungen mit globaler Normalisierung und der gegen das Haushaltsgen Tubulin $\alpha 1$ (*tuba1*) fast identische Ergebnisse lieferten, zeigten die Auswertungen mit Normalisierungen gegen 60S ribosomales Protein L13A (60S) oder **b-actin** sowie ohne Normalisierung deutliche Unterschiede. Dies zeigte sich bei der Auswertung des Anteils an hoch- bzw. herunterregulierten Genen. Dieser schwankte zwischen 0,2 und 7,1 % bezüglich der Hoch- und zwischen 1,0 und 10,2 % bezüglich der Herunterregulierung (s. Tabelle 16).

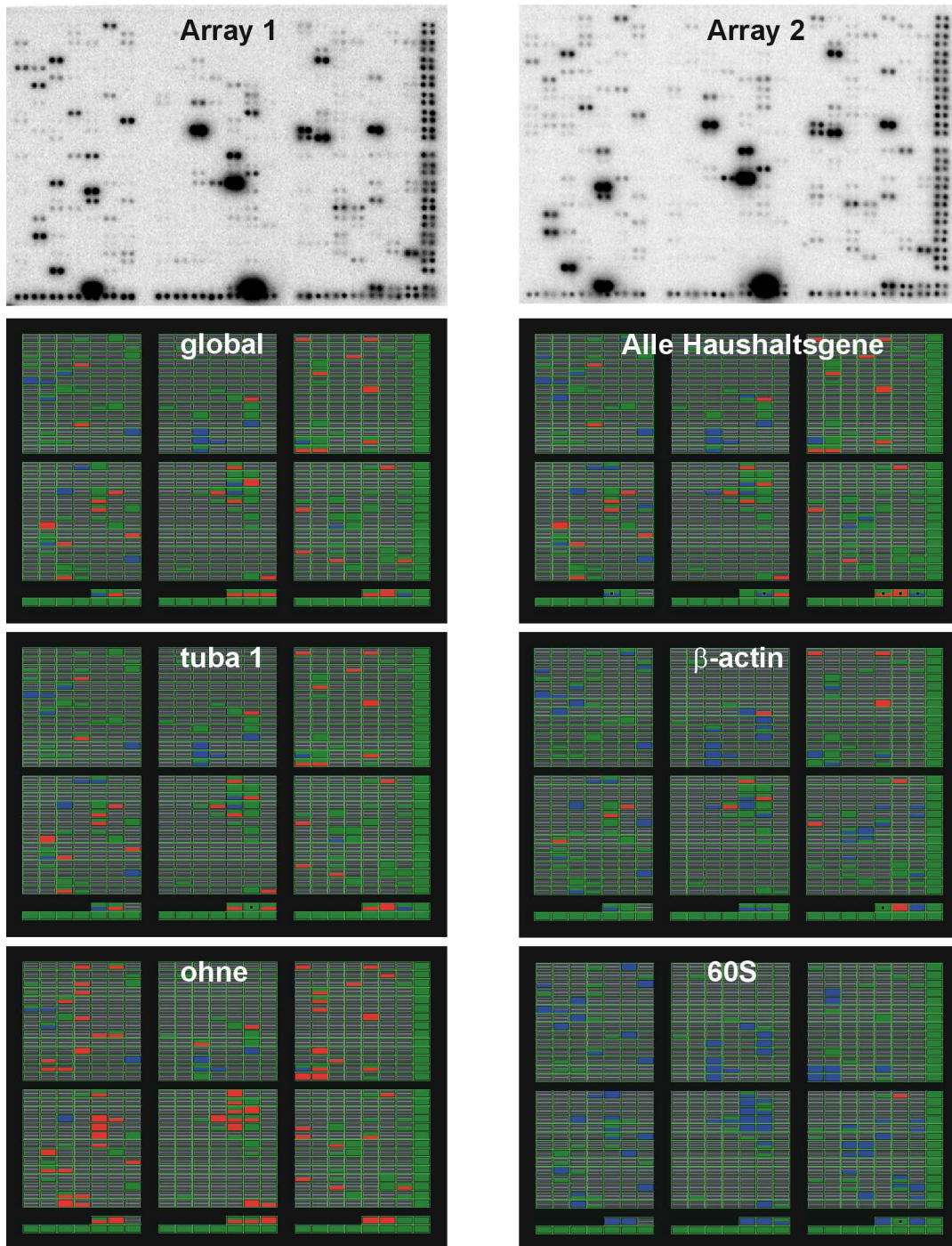


Abbildung 10: Differenziell exprimierte Gene zwischen zwei Populationen (Array 1 und Array 2), ermittelt mit unterschiedlichen Normalisierungsmethoden

Definition der Farben in der Vergleichsansicht der Software:

grün: keine Expressionsunterschiede

rot: Hochregulierung des Gens in Array 2 verglichen mit Array 1

blau: Herunterregulierung des Gens in Array 2 verglichen mit Array 1

grau: Signalintensität unter/gleich Hintergrundwert

Obere Hälfte jeder „Genbox“: Verhältnis zwischen Array 2 und Array 1

Untere Hälfte der „Genbox“: Differenz zwischen Array 2 und Array 1

Nicht als differenziell exprimiert gewertet werden Gene, deren Genbox nur in der unteren Hälfte rot bzw. blau markiert ist (Das Verhältnis der Signalintensitäten wird als ausschlaggebend betrachtet).

Tabelle 16: Anteile der unterschiedlich exprimierten Gene, ermittelt mit unterschiedlichen Normalisierungsmethoden

Die Prozentsätze wurden folgendermaßen ermittelt: Anzahl der differenziell exprimierten Gene (in der Vergleichsansicht s. Abbildung 10 rot bzw. blau markiert) / Gesamtanzahl der Gene pro Array (588)

Normalisierung	Hochregulierung [%]	Herunterregulierung [%]
ohne	7,1	1,0
60S	0,2	10,2
<i>b-actin</i>	1,2	4,9
alle Haushaltsgene	2,4	2,9
<i>tuba1</i>	2,6	1,9
global	2,7	1,9

Die Ergebnisse der globalen Normalisierungsmethode waren am besten mit den visuellen Eindrücken in Einklang zu bringen (s. Abbildung 10).

Für alle weiteren Auswertungen wurde die globale Normalisierung verwendet (vgl. IV.2.3).

3. Genexpression in normalen Kolonkrypten

Zum Verständnis der Regulation von normalen Kolonkrypten wurden Genexpressionsprofile von basalen und luminalen Kryptenabschnitten unter Zuhilfenahme der neu entwickelten methodischen Strategie (s. III.2) erstellt. Die physiologischen Grundlagen der Kryptenorganisation (s. I.1.2) mit räumlicher Trennung von Proliferation und Zelltod sowie der ständigen kontrollierten Regeneration des Gewebes sollten auch zum Verständnis der Vorgänge in neoplastischen Kolonkrypten beitragen. Zugleich sollten diese Versuche zur Etablierung und Evaluierung der neu entwickelten Strategie verwendet werden.

3.1 Mikrodissektion von normalen Kolonkrypten

Für vergleichende Genexpressionsanalysen wurden basale sowie luminale Kryptenabschnitte aus längsgeschnittenen Kolonkrypten im Gewebeschnitt mittels lasergesteuerter Mikrodissektion isoliert (s. II.2.3, Abbildung 11). Pro Probe wurden 35 Kryptenabschnitte mikrodisseziert und gesammelt. Es wurden dazu Serienschnitte verwendet, um die Krypte dreidimensional erfassen zu können. Diese Versuche wurden mit im Rahmen von Koloskopien entnommenen und anschließend im Labor möglichst schnell in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Biopsien durchgeführt. Durch diese schnelle Verarbeitung war eine gute Qualität des Gewebes und der nach lasergesteuerter Mikrodissektion isolierten RNA gewährleistet.

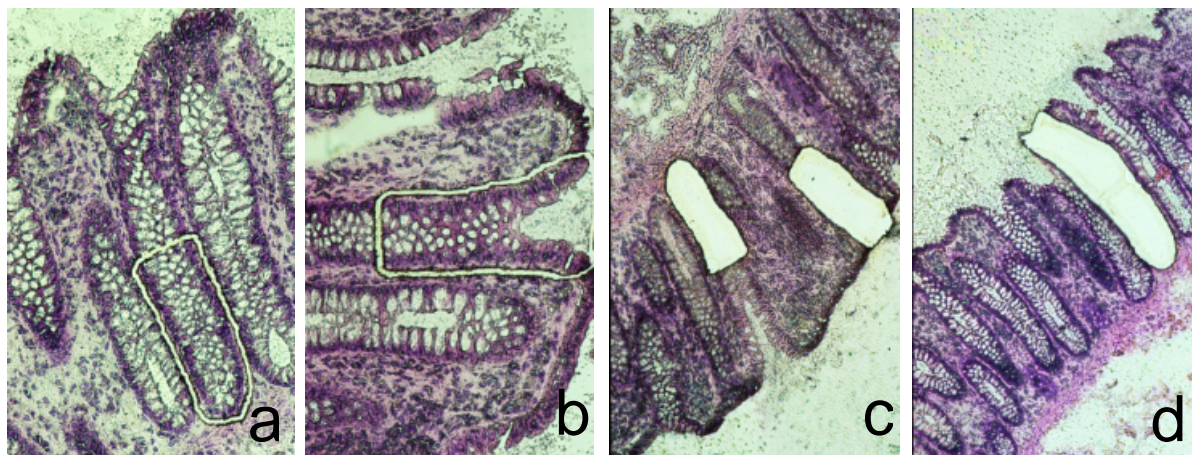


Abbildung 11: Lasergesteuerte Mikrodissektion von normalen Kolonkrypten

Fixierung: Ethanol/Eisessig 20/1, Färbung: Hämatoxylin/Eosin, Vergrößerungen: 200-fach (a, b) bzw. 100-fach (c, d)

a, b: Ausschneiden der gewünschten Objekte mit einem fokussierten Laserstrahl
c, d: Katapultieren der ausgeschnittenen Objekte

3.2 RAP-PCR und cDNA-Expressionsarrays

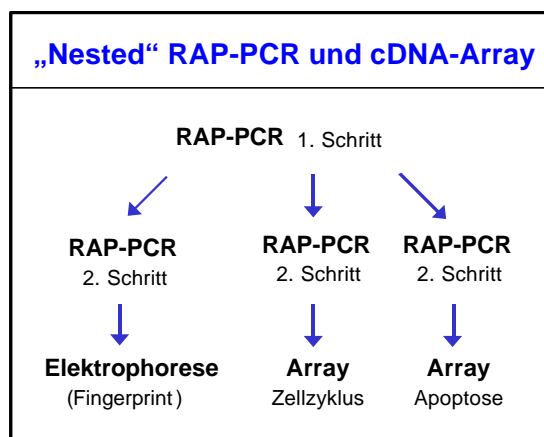


Abbildung 12: Schema des Experiments

Aus den mikrodissezierten Proben von basalen und luminalen Kryptenabschnitten wurde RNA isoliert und diese mittels „nested“ RAP-PCR amplifiziert (s. II.3.4.2, III.2.2.2, Schema vgl. Abbildung 12). Ein Drittel jeder voramplifizierten Reaktion wurde nach erfolgtem zweiten Amplifikationsschritt mittels denaturierender Poly-

acrylamid-Gelelektrophorese (s. II.3.6.4) auf Stabilität des mRNA-Fingerprints und damit verbundener Eignung als Hybridisierungssonde für cDNA-Expressionsarrays überprüft.

Abbildung 13a zeigt einen RAP-PCR Fingerprint von basalen (B) *versus* luminalen (L) Kryptenabschnitten. Da parallel durchgeführte Reaktionen größtenteils ein identisches Bandenmuster aufwiesen und nur vereinzelte Banden in nur einer der beiden Populationen vorkamen, war das Kriterium der Stabilität erfüllt. Die Pfeile zeigen exemplarisch differenziell exprimierte Transkripte, welche jedoch nicht näher identifiziert wurden, da der Fingerprint als Hybridisierungssonde für cDNA-Expressionsarrays verwendet werden sollte.

Die restlichen zwei Drittel jeder voramplifizierten Reaktion wurden zur Herstellung von Sonden für cDNA-Expressionarrays verwendet. Hybridisiert wurde gegen zwei unterschiedliche cDNA-Expressionarrays (s. II.3.5): Arrays mit Zellzyklus-assoziierten Genen sowie Arrays mit Apoptose-assoziierten Genen (s. Abbildung 13b). Zusätzlich zu den in Abbildung 13b markierten, differenziell exprimierten Genen (- 1, - 2, - 3, - 4) erscheinen auch andere Gene als differenziell exprimiert. Dies konnte allerdings in Wiederholungsexperimenten nicht reproduziert werden und wurde deshalb nicht weiterverfolgt. Allgemein war eine sehr geringe Anzahl von Signalen detektierbar. Die meisten Gene auf den Arraymembranen zeigten kein Hybridisierungssignal.

Eine Auflistung der differenziell exprimierten Gene und ihr Expressionsniveau nach Arrayevaluierung inklusive Normalisierung mittels AtlasImage™ 2.0-Software ist in Tabelle 17 dargestellt. Es wurde globale Normalisierung verwendet (vgl. III.2.3.2). Vier Gene konnten identifiziert werden, die in normalen Kolonkrypten differenziell exprimiert waren. Dies entsprach ca. einem Prozent aller analysierten Gene (4 von 316). Die Gene für c-Jun und Mch4 zeigten eine Überexpression in luminalen Kryptenabschnitten, während die Gene für p58/HHR23B und E2F1 in basalen Kryptenabschnitten vermehrt exprimiert waren.

Darüber hinaus zeigten fünf Gene eine konstante, reproduzierbare Expression in basalen und luminalen Kryptenabschnitten. Alle Experimente (von lasergesteuerter Mikrodissektion bis Hybridisierung/cDNA-Expressionsarray) wurden zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und nur Gene, die in beiden Wiederholungen identische Regulierungen zeigten, gingen in die Analyse ein und wurden weiter verfolgt (s. o.).

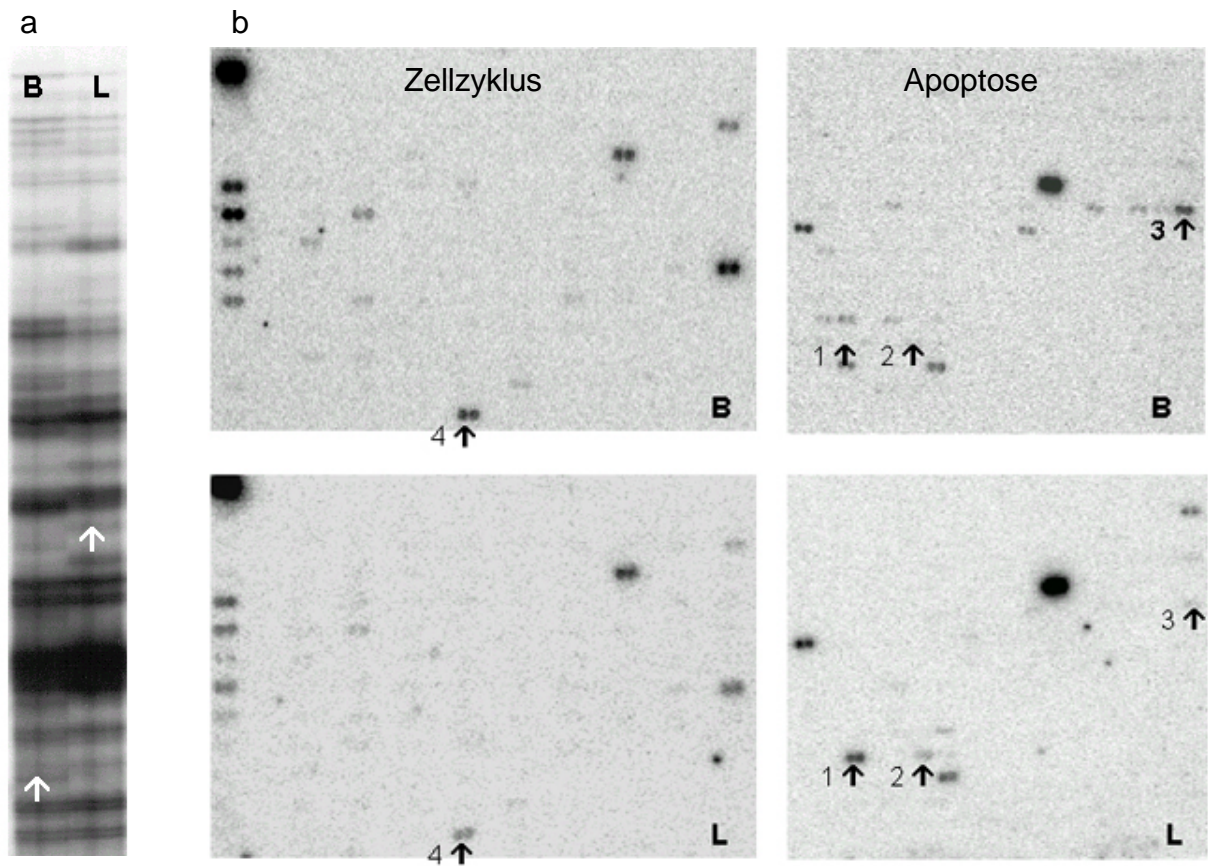


Abbildung 13: RAP-PCR-Fingerprint (a) und cDNA-Expressionsarray (b) nach lasergesteuerter Mikrodisektion von basalen (B) und luminalen (L) Kryptenabschnitten

a: Für die RAP-PCR wurde die Primerkombination *OPN 23/OPN 21/OPN 21 nested* verwendet. Die Pfeile markieren exemplarisch differenziell exprimierte Fragmente.

b: RAP-PCR-Reaktionen wurden für die Hybridisierung auf cDNA-Expressionsarrays verwendet. Links ist ein Ausschnitt der Arrays mit Zellzyklus-assoziierten Genen und rechts mit Apoptose-assoziierten Genen gezeigt. Doppelspots repräsentieren exprimierte Gene. Pfeile markieren differenziell exprimierte Gene: 1 *c-jun*, 2 *mch4*, 3 *p58/HHR23B*, 4 *e2f1*.

Tabelle 17: Liste der Gene, die in basalen versus luminalen Kryptenabschnitten differenziell exprimiert waren

Expressionslevel wurden mittels AtlasImage™ 2.0-Software (Clontech) ermittelt. 1, 2, 3, 4 in der linken Spalte entsprechen der Beschriftung in Abbildung 13.

Gen/Genprodukt (Accession Number)	Expressionslevel (zwei Experimente)	
	basal	luminal
1 <i>c-jun</i> Proto-Onkogen (J04111)	2 1	42 38
2 apoptotische Protease MCH4; Caspase-10 Vorläufer (U60519)	4 7	9 15
3 <i>Xeroderma pigmentosum</i> Gruppe C Reparatur-Protein, <i>p58/HHR23B</i> (D21090)	59 14	4 7
4 PRB-Bindeprotein E2F1, Retinoblastoma-Bindeprotein 3 (M96577)	14 21	4 4

3.3 Bestätigung der differentiellen Expression

3.3.1 Genspezifische RT-PCR

Für die vier in cDNA-Expressionsarrayanalysen als differentiell exprimiert identifizierten Gene (vgl. III.3.2) wurden genspezifische RT-PCRs etabliert. Zum Nachweis der differentiellen Expression wurde RNA aus Laser-mikrodissezierten basalen sowie luminalen Kryptenabschnitten isoliert und durch RT-PCR mit anschließender Gelelektrophorese analysiert (s. II.3.2.1, II.3.2.2.1, II.3.6.2). Als Kontrolle für eine intakte RNA und für den Einsatz von vergleichbaren RNA-Mengen wurde pro analysierter RNA parallel zur genspezifischen Reaktion eine Reaktion mit Primern für das Haushaltsgen *b-actin* durchgeführt. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, konnte die differentielle Expression der Gene für *c-Jun*, *MCH4*, *E2F1* sowie *p58/HHR23B* auf RNA-Ebene bestätigt werden: Die Gene für *c-Jun* und *MCH4* zeigten in luminalen Kryptenabschnitten eine stärkere Expression als in basalen, während mRNA für *E2F1* und *p58/HHR23B* vermehrt in basalen Kryptenabschnitten detektiert werden konnte.

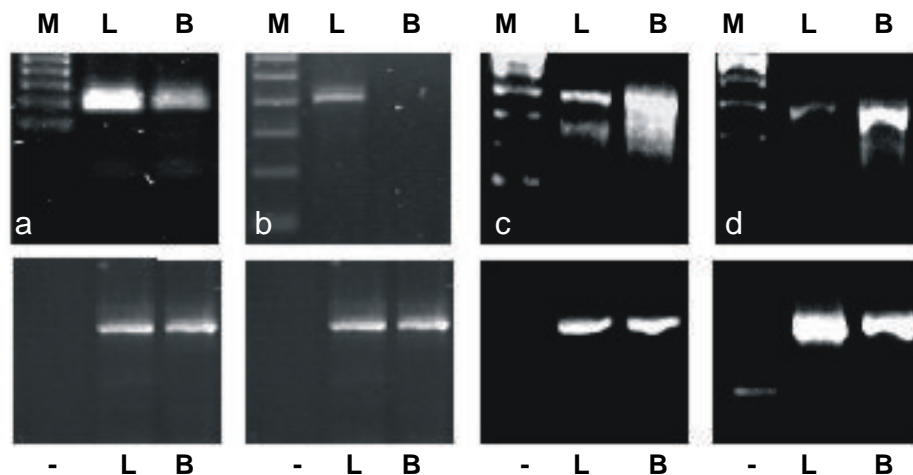


Abbildung 14: Genspezifische RT-PCR von Laser-mikrodissezierten normalen Kolonkrypten zur Bestätigung der differentiellen Expression von *c-jun* (a), *mch4* (b), *e2f1* (c) und *p58/HHR23B* (d)

Als Kontrolle diente *b-actin* (untere Reihe). L bezeichnet die Reaktionen mit RNA von luminalen Kryptenabschnitten, B die Reaktionen mit RNA von basalen Kryptenabschnitten, - die Negativkontrollen. Als Marker (M) wurde eine 100 bp Leiter verwendet.

3.3.2 Immunhistochemie

Ob die differenzielle Expression auch auf Proteinebene sichtbar war, sollte durch immunhistochemische Färbungen untersucht werden (s. II.2.5). Kommerziell erwerbbar gab es für c-Jun, Mch4, E2F1, nicht aber für p58/HHR23B. Wie Abbildung 15 zeigt, konnte sowohl die Expression von c-Jun als auch von Mch4 nahezu ausschließlich in den luminalen Kryptenabschnitten nachgewiesen werden. Dies steht in Einklang mit den Daten der cDNA-Expressionsarrays sowie der RT-PCR. Dagegen war die differenzielle Expression von E2F1 durch immunhistochemischen Färbungen auf Proteinebene nicht zu demonstrieren. Intestinale Epithelzellen zeigten keine E2F1 Expression, lediglich vereinzelte Zellen im Stroma konnten immunhistochemisch angefärbt werden (Daten nicht gezeigt).

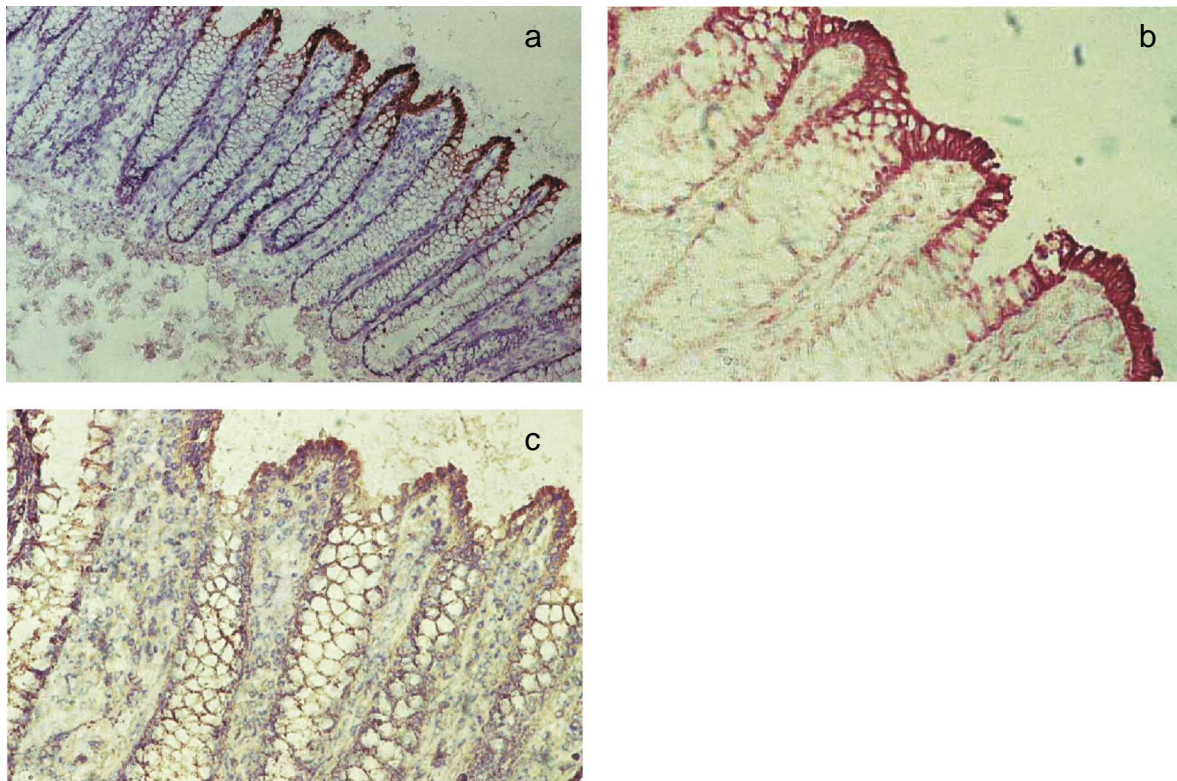


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbungen von normalen Kolonkrypten mit Antikörpern gegen c-Jun (a, b) und Mch4 (c)

a, c: positive Färbung (rot) in luminalen Kryptenabschnitten, mit HE-Gegenfärbung

b: positive Färbung (rot) in luminalen Kryptenabschnitten, ohne HE-Gegenfärbung

Negativkontrollen (Isotypkontrollen) zeigten keine positive Färbung. Vergrößerungen:

100-fach (a) bzw. 200-fach (b, c)

4. Genexpression in aberranten Krypten und frühen Adenomen

4.1 Histologie und lasergesteuerte Mikrodisektion

Für vergleichende Genexpressionsanalysen wurden normale, aberrante sowie früh-adenomatöse Krypten aus Gewebeschnitten mittels lasergesteuerter Mikrodisektion isoliert (s. II.2.3). Diese Versuche wurden mit im Institut für Pathologie, Städtische Kliniken Kassel gesammelten Geweben durchgeführt. Durch ein schnelles Einfrieren der Gewebe nach Entnahme war eine gute Qualität der nach lasergesteuerter Mikrodisektion isolierten RNA gewährleistet.

Eine eingehende pathologische Begutachtung der Gewebeschnitte nach HE-Färbung (s. Abbildung 16) mit Markierung der zu mikrodisezierenden Krypten wurde von Prof. Rüschoff, Institut für Pathologie, Städtische Kliniken Kassel durchgeführt. Normale Krypten wurden sowohl längs- als auch querschnitten, aberrante und adenomatöse Krypten nur querschnitten in die Versuche eingeschlossen. Dies gewährleistete im Fall der aberranten und adenomatösen Krypten die Verwendung von stringenten morphologischen und histologischen Kriterien (vgl. Tabelle 18). Wenn möglich wurden Serienschnitte verwendet, um die Krypten dreidimensional zu erfassen. Pro Probe wurden ca. 40 Krypten mikrodiseziert und gesammelt.

Folgende morphologische und histologische Kriterien wurden bei der Zuordnung der Kolonkrypten zu den unterschiedlichen Stadien (normal, aberrant, adenomatös) berücksichtigt: Kryptengröße, Kriptenform, Epitheldicke, Kerngröße der Epithelzellen, Cytoplasmamenge, Vorhandensein von Becherzellen (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Morphologische und histologische Kriterien für die Auswahl normaler, aberranter und adenomatöser Kolonkrypten für die lasergesteuerte Mikrodisektion (J. Rüschoff, pers. Mitteilung)

+ vorhanden, +/- teilweise vorhanden, - nicht vorhanden

Charakteristika	normal	aberrant	adenomatös (D1)
Kryptengröße	klein	klein bis mittel	vergrößert
Kriptenform	rund	rund bis oval	länglich
Epitheldicke	1 Zellschicht	1(-2) Zellschichten	mehrere Zellschichten
Kerngröße	klein	klein	vergrößert
Cytoplasma	erscheint hell im Schnitt	erscheint hell im Schnitt	kaum vorhanden
Becherzellen	+	+, teilweise vergrößert	+/- bis -

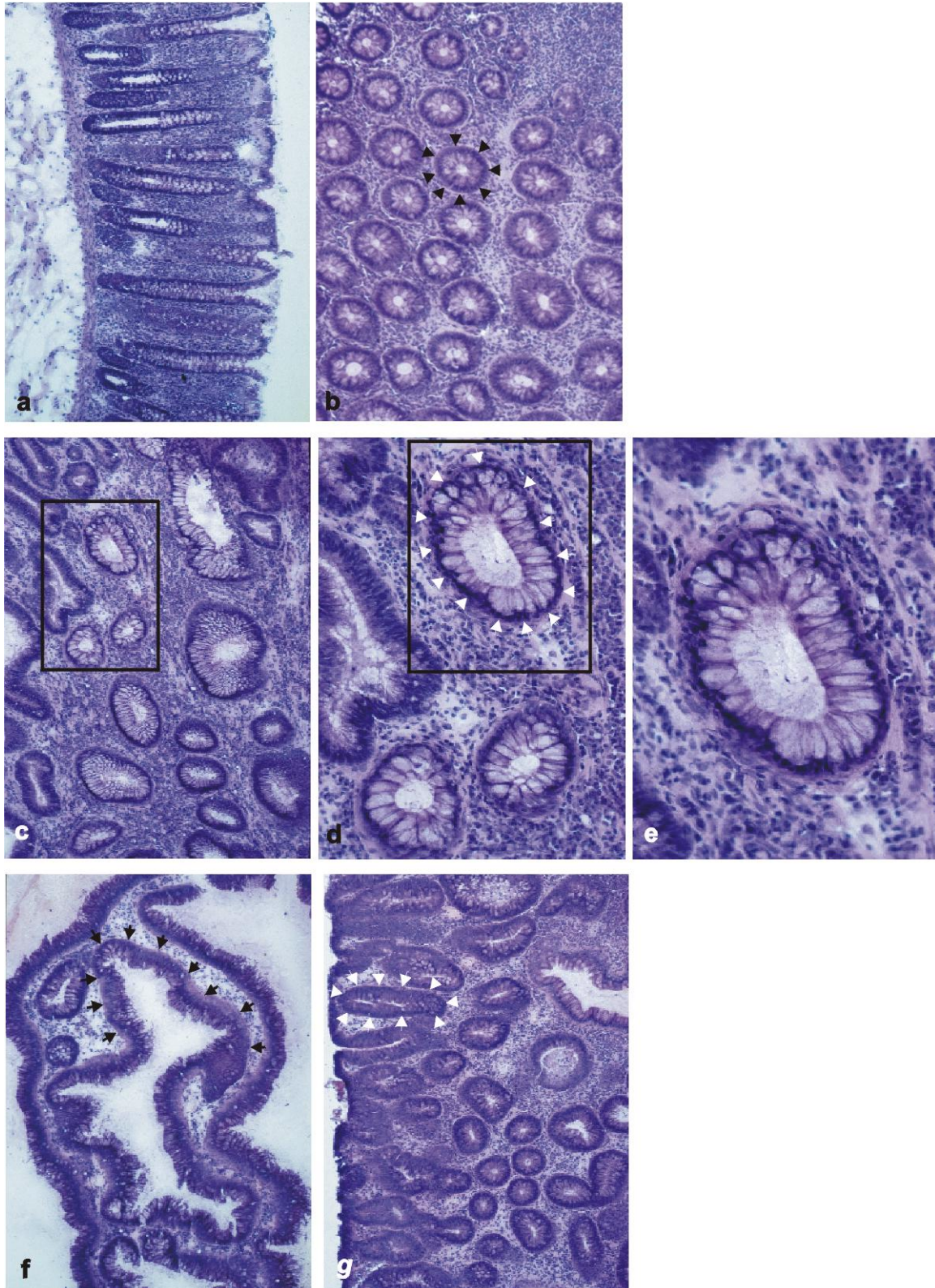


Abbildung 16: HE-gefärbte Schnitte von Kolonmukosa mit normalen längs- (a) und querschnittenen (b), abnormen (c, d, e) und früh-adenomatösen villösen (f) und tubulären (g) Krypten

b, d, f, g: Pfeile markieren jeweils exemplarisch Objekte, die mikrodisseziert wurden
 c, d: Rechtecke markieren die entsprechende Ausschnittsvergrößerung, die in der nachfolgenden Abbildung dargestellt ist (d, e)
 Vergrößerungen: 80-fach (a, b, c, f, g), 200-fach (d), 312,5-fach (e).

4.2 Genexpressionsprofile von frühen Adenomen und aberranten Krypten

4.2.1 Frühe Adenome

Es konnte Laser-mikrodisseziertes Material (normale Krypten und korrespondierend dazu jeweils früh-adenomatöse Krypten) von sechs unterschiedlichen Patienten gewonnen werden. Bei den Adenomen handelte es sich ausschließlich um sehr frühe Stadien mit niedrigem Dysplasiegrad (D1-Stufe); fünf Adenome waren dem tubulären Typ und ein Adenom dem villösen Typ zuzuordnen. Teilweise standen pro Fall mehrere Adenomgewebe zur Verfügung, die jeweils separat in die Analyse eingeschlossen wurden.

Von jedem Fall wurden Genexpressionsprofile von normalen und adenomatösen Krypten unter Zuhilfenahme der neuartigen Kombination von RAP-PCR und cDNA-Expressionsarray (vgl. III.2) erstellt. Dazu wurden AtlasTM human Cancer cDNA Expression Arrays mit 588 unterschiedlichen Genen verwendet. Alle Versuche wurden mindestens zweifach durchgeführt (vom Anfertigen der Kryogewebeschnitte bis cDNA-Expressionsarrays). Damit sollten falsch-positive Ergebnisse minimiert und die Stabilität der Methode demonstriert werden. Zur Auswertung der Arrays wurde die AtlasImageTM 2.0-Software mit globaler Normalisierung verwendet (vgl. III.2.3.2). Pro Fall wurde ein Array von normalen Krypten als Bezugspunkt ausgewählt und alle Expressionsintensitäten auf diesen Array bezogen.

Pro Arrayhybridisierung konnten durchschnittlich 55 bis 120 Hybridisierungssignale von 588 möglichen detektiert werden. Mit Hilfe der AtlasImageTM 2.0-Software konnten diese Signale eindeutig gespotteten cDNAs zugeordnet werden.

Die Auswertung der cDNA-Expressionsarrays aller Fälle ergab die reproduzierbare differenzielle Expression von 68 unterschiedlichen Genen (11,6 % aller 588 Gene). In Anhang 3 ist eine Auflistung der differenziell exprimierten Gene pro Fall zu finden. 7,7 % der Gene waren bei nur einem Fall der sechs analysierten Fälle differenziell exprimiert. Die restlichen 3,9 % der Gene zeigten folgende, in Tabelle 19 dargestellte Verteilung auf identische Dysregulation bei 2, 3 oder 4 Fällen.

Gene, die bei mindestens der Hälfte aller untersuchten Patienten identisch dysreguliert waren, wurden weiter verfolgt (vgl. graue Markierung in Tabelle 19). Um welche Gene es sich dabei handelt, ist Tabelle 20 zu entnehmen. Die Expressions-

intensitäten der Gene in den einzelnen Hybridisierungen sind in Abbildung 17 grafisch dargestellt.

Tabelle 19: Identisch dysregulierte Gene bei 2, 3 und 4 (von insgesamt 6 analysierten) Fällen

Identisch dysregulierte Gene bei ®	2 Fällen	3 Fällen	4 Fällen
Hochregulierung	13 (2,2 %)	2 (0,3 %)	1 (0,2 %)
Herunterregulierung	4 (0,7 %)	3 (0,5 %)	-

Tabelle 20: Auflistung der Gene, die bei 3 bzw. 4 Fällen identisch dysreguliert sind

x-fache Hochregulierung: errechnet aus den Mittelwerten der Signalintensitäten S_N von normalen Krypten und S_A von adenomatösen Krypten jedes einzelnen Falles $\rightarrow S_A/S_N$

x-fache Herunterregulierung: errechnet aus den Mittelwerten der Signalintensitäten S_N von normalen Krypten und S_A von adenomatösen Krypten jedes einzelnen Falles $\rightarrow S_N/S_A$

\underline{M} Median der x-fachen Regulierungen von 3 bzw. 4 Fällen

\uparrow x(6) Hochregulierung in adenomatösen Krypten bei x von 6 Fällen insgesamt

\downarrow x(6) Herunterregulierung in adenomatösen Krypten bei x von 6 Fällen insgesamt

Gen/Genprodukt (Accession Number)	x-fache Hochregulierung	x-fache Herunterregulierung	Häufigkeit
<i>p21-rac1</i> ; Ras-ähnliches Protein TC25 (M29870, M31467)	2,4 3,4 3,0 4,5 ($\underline{M}=3,3$)		\uparrow 4(6)
Mitogen-aktivierte Protein-Kinase p38 α (MAPK p38 α) (L35253, L35263)	2,8 3,3 3,5 ($\underline{M}=3,2$)		\uparrow 3(6)
Interferon γ Rezeptor (IFGR) (A09781)	3,7 4,0 2,8 ($\underline{M}=3,5$)		\uparrow 3(6)
Thrombospondin 2 (TSP2) (L12350)		8,3 8,7 9,8 ($\underline{M}=8,9$)	\downarrow 3(6)
<i>p53</i> , zelluläres Tumor-Antigen (M14694 M14695)		2,5 3,2 28,2 ($\underline{M}=11,3$)	\downarrow 3(6)
Fas-aktivierte Serin/-Threonin Kinase (FAST-Kinase) (X86779)		4,6 9,9 2,5 ($\underline{M}=5,7$)	\downarrow 3(6)

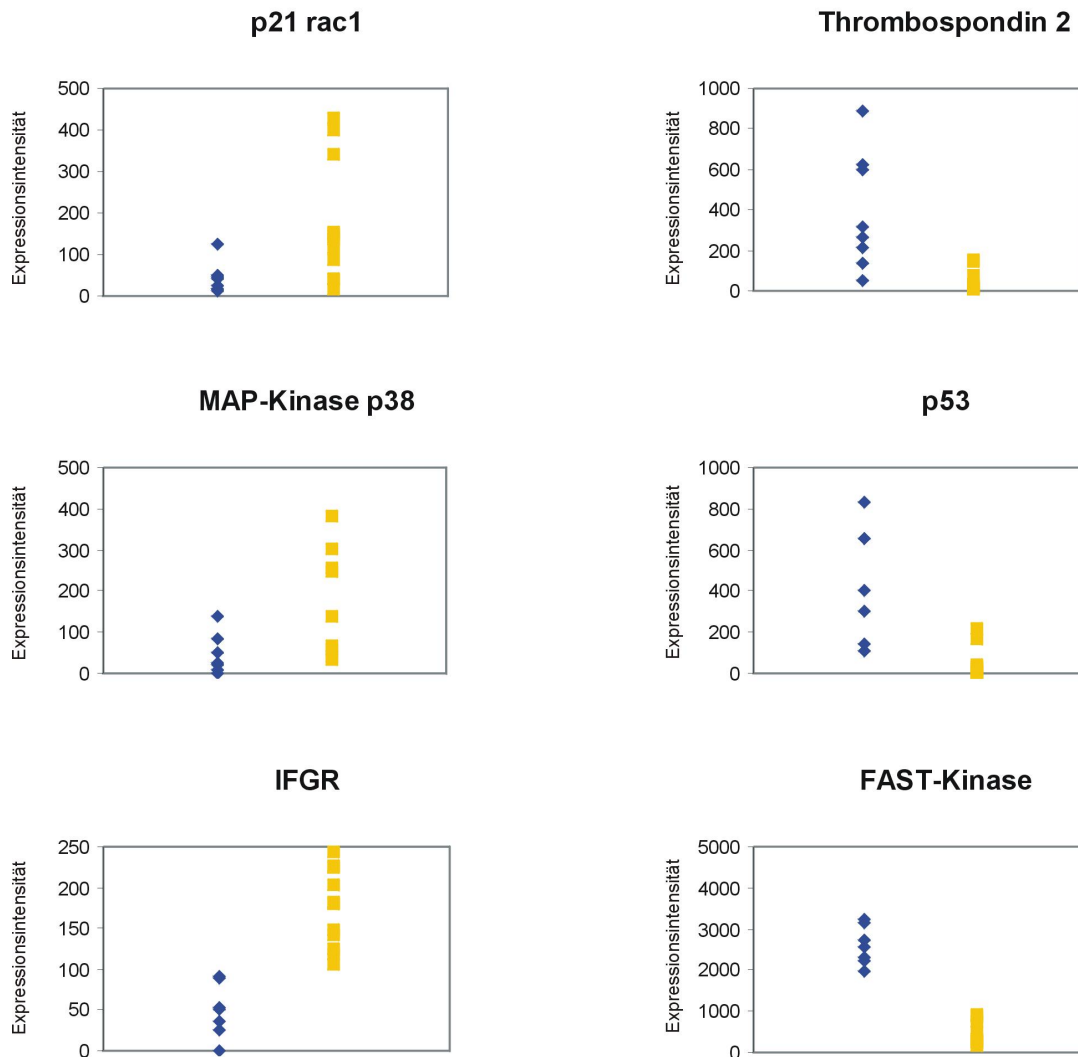


Abbildung 17: Grafische Darstellung der Expressionsintensitäten der Gene für p21-rac1, MAPK p38a, IFGR, TSP2, p53 und FAST-Kinase

Jeder Punkt in der Grafik stellt eine Expressionsintensität in einer Hybridisierung dar. Ein Punkt steht also nicht für einen Fall, sondern für eine Einzelhybridisierung.

◆ N: normale Kolonkrypten

■ A: früh-adenomatöse Kolonkrypten

4.2.2 Aberrante Krypten

Es stand Gewebe mit normalen, aberranten und adenomatösen (Dysplasiegrad D1) Krypten von drei Patienten zur Verfügung, aus dem RAP-PCR- und cDNA-Array-taugliche RNA isoliert werden konnte. Von einem dieser drei Fälle (Fall c, s. Abbildung 19) stand Normalgewebe nur aus unmittelbarer Nachbarschaft zum Adenom zur Verfügung (auf einem Schnitt lokalisiert), von den beiden anderen Fällen

(Fall a und b, s. Abbildung 19) war jeweils Normalgewebe verfügbar, das räumlich entfernt vom Adenom entnommen worden war.

Die Versuchsdurchführung und Auswertung der Experimente wurde wie in III.4.2.1 beschrieben durchgeführt.

Abbildung 18 zeigt exemplarisch cDNA-Expressionsarrays mit RNA-Fingerprints von normalen, aberranten und adenomatösen Krypten eines Patienten (Fall a, s. Abbildung 19).

Besonders auffällig ist für den in Abbildung 18 gezeigten Fall die Hochregulierung der Gene für MAPK p38 α (roter Kreis) sowie für Rac1 (blauer Kreis) und IFGR

(violetter Kreis) in aberranten und adenomatösen Krypten. Die Gene für FAST-Kinase (hellgrüner Kreis) und p53 (dunkelgrüner Kreis) zeigten keine Dysregulation größer als zweifach. Für Thrombospondin 2 (gelber Kreis) wurde in diesem Fall kein Hybridisierungssignal detektiert.

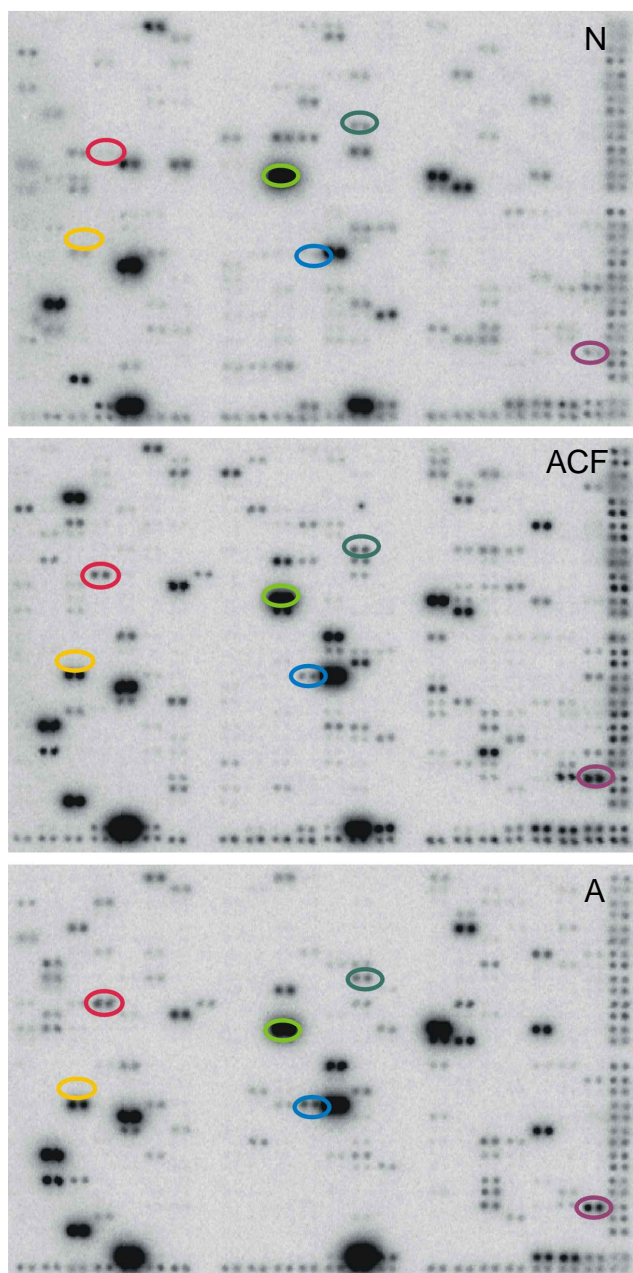


Abbildung 18: cDNA-Expressionsarrays von normalen (N), aberranten (ACF) und adenomatösen (A) Krypten (Fall a, s. Abbildung 19)

Farbig markiert sind die in Tabelle 20 aufgelisteten Gene.

- p21-rac1
- MAPK p38 α
- TSP2
- FAST-Kinase
- IFGR
- p53

Genexpressionsdiagramme wurden für jeden der drei analysierten Fälle erstellt. Dazu wurden die Signalintensitäten (S) von normalen (N), aberranten (ACF) und adenomatösen (A) Krypten für jedes differenziell exprimierte Gen zueinander in Beziehung gestellt und auf einen definierten Abstand normalisiert ($S_N=0$ und $S_A=100$). Den Berechnungen liegt die Formel $S_{ACF^*}=(S_{ACF}-S_N)/((S_A-S_N)/100)$ zugrunde, und das Ergebnis ist in Abbildung 19 grafisch dargestellt.

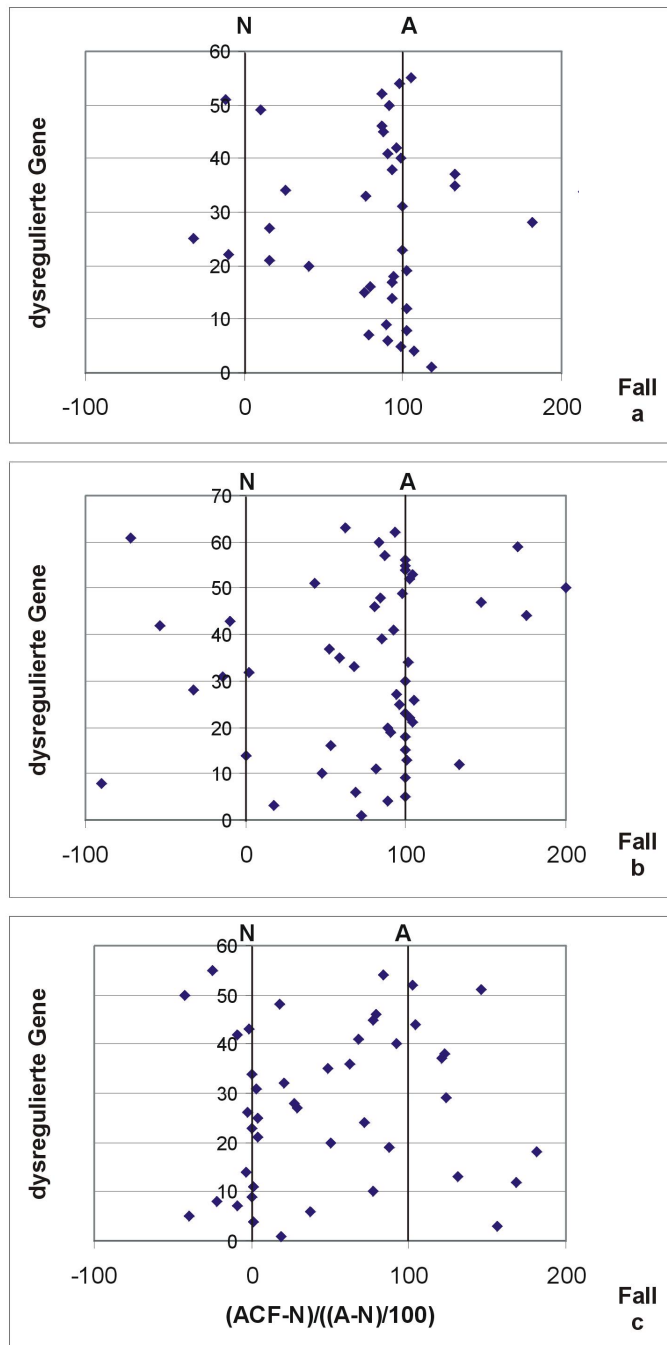


Abbildung 19:

Genexpressionsdiagramme von aberranten Krypten (ACF, Rautensymbol)

Für jedes Gen (auf der y-Achse dargestellt) ist der Abstand der Signalintensität von aberranten Krypten zu normalen (N, normalisiert auf 0) bzw. adenomatösen Krypten (A, normalisiert auf 100) dargestellt. Gezeigt sind alle drei analysierten Fälle (a, b und c).

4.3 Immunhistochemische Färbungen

Zur Bestätigung der differentiellen Expression der Kandidatengene (vgl. III.4.2.1) auf Proteinebene wurde die Methode der Immunhistochemie (s. II.2.5) gewählt. Für IFGR und p21-rac1 konnten spezifische Färbungen erzielt werden und deren vermehrte Expression in adenomatösen Kolonkrypten nachgewiesen werden (s. Abbildung 20b, d, e). Normale Kolonkrypten zeigten sowohl für IFGR als auch für p21-rac1 keine Färbung (s. Abbildung 20a, c). Damit konnte die differentielle Expression dieser zwei Kandidatengene auf mRNA- und Proteinebene demonstriert werden.

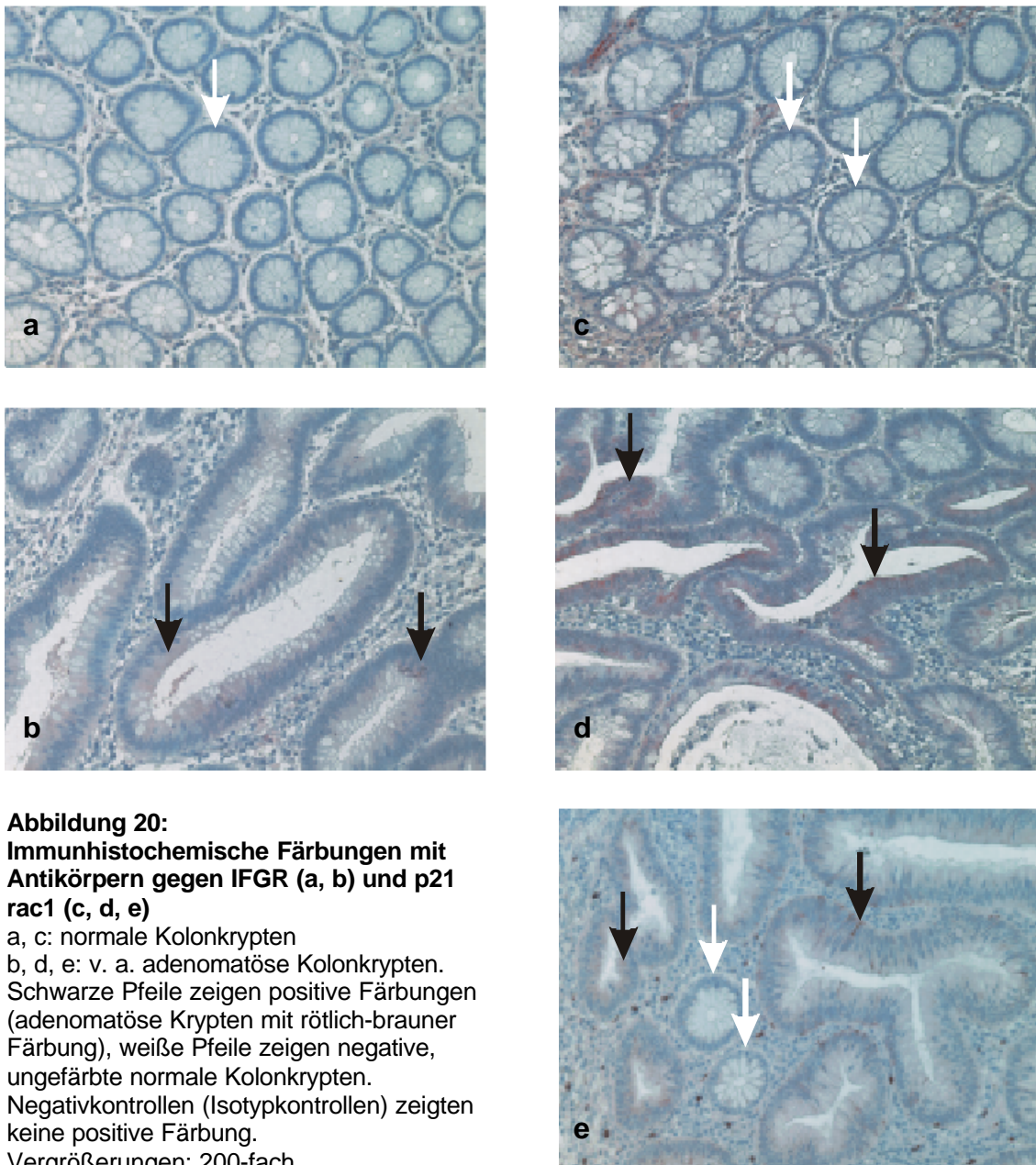


Abbildung 20:
Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen IFGR (a, b) und p21 rac1 (c, d, e)
 a, c: normale Kolonkrypten
 b, d, e: v. a. adenomatöse Kolonkrypten.
 Schwarze Pfeile zeigen positive Färbungen (adenomatöse Krypten mit rötlich-brauner Färbung), weiße Pfeile zeigen negative, ungefärbte normale Kolonkrypten.
 Negativkontrollen (Isotypkontrollen) zeigten keine positive Färbung.
 Vergrößerungen: 200-fach

IV. DISKUSSION

1. Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor-Typ g

PTPR γ ist ein Vertreter der Transmembranformen innerhalb der Gruppe der Protein-Tyrosin-Phosphatasen und ist mit 162 kDa größer als alle bisher bekannten Vertreter. Das Gen *ptprg* besteht aus 30 Exons, ist 780 kb lang und liegt auf dem kurzen Arm des dritten Chromosoms im cytogenetischen Band 3p14.2 (LaForgia *et al.*, 1993; Latif *et al.*, 1993; Barnea *et al.*, 1994).

1.1 Expression im Gewebe

Das Phosphorylierungsniveau einer Zelle ist als Ergebnis eines Gleichgewichts u.a. von Protein-Tyrosin-Kinasen und deren Gegenspielern, den Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs), zu sehen. PTPs vermögen durch Aktivitätsänderungen in die Regulation von Phosphorylierungsmuster und -niveau einzugreifen. Dies kann deutliche Auswirkungen auf die Kontrolle von Zellwachstum und/oder Differenzierung haben (Zusammenfassung bei Hanks *et al.*, 1988; Ullrich und Schlessinger, 1990).

Um die Rolle von *ptprg* in der Pathogenese des Kolonkarzinoms näher zu beleuchten, wurde die Expression dieses Gens in einer Reihe von Normal- und Tumorgewebe untersucht. In 73,7 % der insgesamt 19 analysierten Fälle konnte eine Hochregulierung (1,2- bis 89-fach) der *ptprg*-mRNA im Tumorgewebe nachgewiesen werden (vgl. III.1.1.2, Abbildung 6). Dabei konnte keine Beziehung zwischen *ptprg*-Expressionsniveau und Mikrosatellitenstatus der Tumore hergestellt werden. Ebenso zeigten Kolonkarzinome mit herunterregulierter *ptprg*-mRNA-Expression im Vergleich zu solchen mit hochregulierter Expression keine besonderen Auffälligkeiten in der makro- oder histopathologischen Beurteilung.

Die Hochregulierung der *ptprg*-mRNA steht auch nicht im Einklang mit dem bisherigen Stand der Forschung. *Ptprg* wird als Kandidaten-Tumorsuppressorgen in der Nieren- und Lungenkarzinogenese sowie in der Brust- oder Eierstockkarzinogenese betrachtet (LaForgia *et al.*, 1991; Panagopoulos *et al.*, 1996; van Niekerk und Poels, 1999). Für einige dieser Karzinome konnte jedoch eine reduzierte Expression von *ptprg* gezeigt werden (van Niekerk und Poels, 1999). Ein Kennzeichen von Tumorsuppressorgen ist ihre Deletion oder Inaktivierung im Tumorgewebe und der damit verbundene Beitrag zum malignen Phänotyp. Für *ptprg* konnten bisher keine

spezifischen Mutationen nachgewiesen werden, die eine Inaktivierung zur Folge hätten. Studien zu dem gut untersuchten Tumorsuppressor p53 haben gezeigt, dass neben der meist vorliegenden Herunterregulierung im Tumor auch eine Hochregulierung möglich sein kann. Bei dem hochregulierten Transkript handelt es sich dann allerdings um ein fehlerhaftes Transkript, das kein funktionstüchtiges Protein liefert (Purdie *et al.*, 1991; Bell *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1994).

Ob die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Überexpression im Tumorgewebe (s. III.1.1.2 Abbildung 6) auch auf Proteinebene zum Tragen kommt und wenn ja, ob es sich bei dem im Tumorgewebe hochregulierten PTPR γ auch um ein funktionelles PTPR γ handelt, blieb im Rahmen dieser Arbeit ungeklärt. Es stand weder ein spezifischer Antikörper für immunhistochemische Analysen noch ein Funktions- oder Aktivitätstest zur Verfügung.

1.2 Überexpression

Man weiß bis heute wenig über spezifische Signaltransduktionswege und die biologische Rolle der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Nur bei wenigen Vertretern dieser Enzymklasse sind Liganden bekannt (Barnea *et al.*, 1994; Peles *et al.*, 1995; Zondag *et al.*, 1995). Tenascin und Contactin konnten als spezifische Liganden für PTPR ζ , nicht aber für PTPR γ identifiziert werden (Peles *et al.*, 1995). Einzig CD45 konnte bisher eine spezifische physiologische Rolle zugeordnet werden. CD45 ist für die Reifung von Thymocyten unabdingbar (Kishihara *et al.*, 1993; Trowbridge und Thomas, 1994). Von mPTPR σ und PTPR γ ist lediglich bekannt, dass sie in hematopoetischen Geweben sehr stark exprimiert sind. Vermutet wird eine bisher nicht näher definierte Beteiligung an Differenzierungs- und Aktivierungsprozessen (Barnea *et al.*, 1993; Ogata *et al.*, 1994).

Einen Hinweis zur biologischen Funktion von PTPR γ sollten Überexpressionsexperimente in einer *ptprg*-mRNA-negativen Zelllinie (HT-29, vgl. dazu III.1.2.1, Abbildung 7) liefern. Diese erwiesen sich als schwierig, da mit Standardtransfektionsmethoden nur sehr niedrige Transfektionsraten von ca. 5 % erzielt werden konnten (vgl. III.1.2.2.1). Aus diesem Grund wurden erste Selektionsversuche durchgeführt und eine Strategie zur Selektion *ptprg*-exprimierender Klone erarbeitet

(vgl. III.1.2.2.2). Dabei handelt es sich um eine zeitaufwendige Strategie mit hohem Screening-Aufwand.

Eine *ptprg*-positive HT-29 Zelllinie kann dann in Untersuchungen zur differentiellen Genexpression mittels cDNA-Expressionsarrays eingesetzt werden. Ein Vergleich von *ptprg*-exprimierenden und nicht-exprimierenden HT-29-Klonen soll erste Hinweise auf beteiligte, von der Überexpression modulierte Stoffwechselwege liefern. *Ptprg*-exprimierende und nicht-exprimierende HT-29-Klone könnten auch durch vergleichende Analysen bezüglich ihrer Fähigkeit, das Tumorwachstum und/oder Metastasierungsverhalten im Tiermodell (z. B. SCID-Maus-Modell) zu fördern oder zu hemmen, charakterisiert werden. Dies würde weitere Schlüsse auf die mögliche Bedeutung von *ptprg* für die Kolonkarzinogenese zulassen.

2. Erstellen von Genexpressionsmustern

Die Charakterisierung von molekularen Veränderungen in der Entstehung des kolorektalen Karzinoms aus frühen präneoplastischen Läsionen war Hauptziel der Arbeit. Dazu war es nötig, eine neuartige methodische Strategie mit neuen molekularbiologischen Methoden zu etablieren und deren Durchführung auf niedrigem Zellzahlniveau zu optimieren.

Mit dieser Methode wurde ein Genscreening von histologisch exakt definierten Gewebeproben ermöglicht. Erstmals konnten kleinste Gewebeproben hinsichtlich ihres mRNA-Expressionsmusters untersucht werden: Lasergesteuerte Mikrodissektion erlaubte die Isolierung von exakt definierten, mikroskopisch kleinen Bereichen eines Gewebeschnittes. Eine Optimierung von RNA-Isolierung, anschließender Amplifikation der RNA *via* nested RAP-PCR und Hybridisierung der RAP-PCR-Produkte mit cDNA-Expressionsarrays ermöglichte das Erstellen von spezifischen Genexpressionsprofilen für die mittels lasergesteuerter Mikrodissektion isolierten Gewebeproben.

Mit der neuartigen methodischen Strategie war die Voraussetzung zur Charakterisierung von genetischen Veränderungen in der Entstehung des Kolonkarzinoms an kleinsten Zellverbänden geschaffen.

2.1 Methodische Überlegungen

2.1.1 Lasergesteuerte Mikrodissektion und RAP-PCR

Bis vor kurzem waren Studien zur Genexpression in Gewebeproben meist durch gemischte Zellpopulationen limitiert. Das Problem der Zell-Heterogenität hat sich als signifikante Barriere für die molekulare Analyse von normalem und „krankem“ Gewebe erwiesen. Lasergesteuerte Mikrodissektion bietet die Möglichkeit, exakt definierte, mikroskopisch kleine Gewebebereiche zu isolieren (Emmert-Buck *et al.*, 1996; Bonner *et al.*, 1997; Simone *et al.*, 1998; Schutze und Lahr, 1998; Suarez-Quian *et al.*, 1999) und dadurch die Limitierung der Zell-Heterogenität zu überwinden. Eingehende pathologische Begutachtung der Gewebeschnitte vorausgesetzt, wird bei der lasergesteuerten Mikrodissektion eine Homogenität der Zellpopulation von annähernd 100 % erreicht (Bonner *et al.*, 1997; Schutze und Lahr, 1998; Fend *et al.*, 1999). Auch gegenüber Kontaminationen von außen zeigte sich die lasergesteuerte Mikrodissektion relativ sicher, da die „ausgeschnittenen“ Zellen sofort, ohne manuelle Manipulation, durch *laser pressure catapulting* in das Lysepuffer-enthaltende RG überführt werden. Durch die Laserbehandlung werden nachfolgende DNA- (Emmert-Buck *et al.*, 1996; Cerroni *et al.*, 1997; Tam *et al.*, 1999), RNA- (Emmert-Buck *et al.*, 1996; Fend *et al.*, 1999; Goldsworthy *et al.*, 1999) oder Proteinanalysen (Emmert-Buck *et al.*, 1996; Emmert-Buck *et al.*, 2000a) nicht beeinflusst.

Die Anzahl an Zellen, die nach lasergesteuerter Mikrodissektion zur Verfügung stand, war sehr gering, und die daraus resultierende kleine RNA-Menge erlaubte kein unmittelbares Screening der exprimierten Transkripte. Alle etablierten Techniken, die der Untersuchung der differenziellen Genexpression dienen, wie z.B. SAGE (*serial analysis of gene expression*, Velculescu *et al.*, 1995), subtraktives Screening (Davis *et al.*, 1987; Duguid *et al.*, 1988; Diatchenko *et al.*, 1996) oder cDNA-Expressionsarrays (Schena *et al.*, 1995; DeRisi *et al.*, 1996), waren dadurch limitiert, dass große Mengen an intakter, DNA-freier RNA (bis zu 5 µg) als Ausgangsmaterial benötigt wurden.

Trenkle *et al.* (1998) haben gezeigt, dass das Screening mittels cDNA-Arrays beträchtlich verbessert werden kann, wenn die Beteiligung von seltenen Transkripten an der Hybridisierungssonde systematisch vergrößert wird. Dies wurde durch den Einsatz von RAP-PCR (Welsh *et al.*, 1992; McClelland *et al.*, 1995) zur Generierung

der Hybridisierungssonden erreicht. Somit konnte die Eignung von RAP-PCR zur Hybridisierung gegen cDNA-Arrays erstmals unter Beweis gestellt werden (Trenkle *et al.*, 1998; Trenkle *et al.*, 1999). Zudem haben verschiedene Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe (Neumann *et al.*, 2001; Lechner *et al.*, 2001) gezeigt, dass RAP-PCR eine geeignete Methode ist, um Hybridisierungssonden für cDNA-Expressionsarrays zu gewinnen und somit Genexpressionsprofile auch aus sehr kleinen RNA-Mengen zu erstellen.

Ein Vorteil von RAP-PCR gegenüber anderen RNA-Amplifizierungsmethoden (z.B. Differential Display oder SMART-PCR) liegt darin, dass RAP-PCR einen höheren Anteil an kodierenden mRNA-Sequenzen liefert, da schon bei der reversen Transkription arbiträre Primer eingesetzt werden, die mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit innerhalb von Leserahmen liegen, d.h. innerhalb von Sequenzen, die für Gene kodieren (McClelland *et al.*, 1995). Die Verwendung von sogenannten „verankerten“ Oligo-dT-Primern in der reversen Transkription beim Differential Display (Liang und Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1994) führt hingegen zu einer vermehrten Amplifikation 3'-untranslatierter Bereiche, die einen geringeren Informationsgehalt aufgrund der größeren Variabilität aufweisen.

Weitere Vorteile von RAP-PCR gegenüber anderen Screening-Techniken sind: eine Identifizierung von seltenen Transkripten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit (Mathieu-Daude *et al.*, 1996) und eine relative Unempfindlichkeit gegenüber DNA-Verunreinigungen sowie Variationen in der RNA-Konzentration (Tortola *et al.*, 1998).

2.1.2 cDNA-Expressionsarray

Im Allgemeinen ist die Technik der cDNA-Arrayhybridisierung anwendbar, wenn zwei biologische Konditionen verglichen werden (Usui *et al.*, 1996). In der Onkologie werden cDNA-Expressionsarrays häufig eingesetzt, um Expressionsmuster von Normal- und Tumorgewebe miteinander zu vergleichen (DeRisi *et al.*, 1996; Heller *et al.*, 1997; Oh *et al.*, 1999). Dabei können hunderte von Genen in einer einzigen Hybridisierungsprozedur untersucht werden (DeRisi *et al.*, 1996; Trenkle *et al.*, 1998; Sehgal *et al.*, 1998). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die cDNA-Arraymethode die Evaluierung von Veränderungen in der Genexpression mit einer relativ hohen Genauigkeit erlaubt (Backert *et al.*, 1999). cDNA-Arrayhybridisierungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten, dass *mch4* und *c-jun* mRNA überwiegend in luminalen Kryptenabschnitten exprimiert werden (vgl. III.3.2). Dies

wurde anhand von RT-PCR (vgl. III.3.3.1) und immunhistochemischen Färbungen (vgl. III.3.3.2) überprüft und bestätigt, wodurch die Zuverlässigkeit der neuartigen methodischen Strategie demonstriert werden konnte. Die gute Korrelation zwischen cDNA-Array- und RT-PCR-Daten konnte auch in anderen Studien gezeigt werden (Sgroi *et al.*, 1999; Iyer *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 2001). Um die Spezifität von cDNA-Expressionsarrays weiter zu maximieren, wurden alle Hybridisierungen zweimal mit ein und derselben RNA durchgeführt. Zudem wurden für jeden Patienten alle Experimente von „Anfertigen von Kryogewebeschnitten“ bis „cDNA-Expressionsarray“ wiederholt.

cDNA-Expressionsarrays zeigen eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass im Gegensatz zu anderen Screening-Methoden (z.B. subtraktives Screening) weniger stark exprimierte mRNAs nicht identifiziert werden können, wenn das Hybridisierungssignal den Hintergrundwert nicht überschreitet.

Die geringe Anzahl an Hybridisierungssignalen der ersten Versuche (normale Kolonkrypten, vgl. III.3.2 Abbildung 13) kann zum einen auf die geringe eingesetzte RNA-Menge und zum anderen auf die Komplexität der „nested“ RAP-PCR zur Herstellung der Hybridisierungssonden zurück geführt werden. Wenn ein erweitertes Screening der Genexpression erwünscht ist, können andere Primerkombinationen zur Herstellung weiterer Hybridisierungssonden zusätzliche, andere Hybridisierungssignale liefern (vgl. III.2.2.1 Tabelle 16). Unter Berücksichtigung der genannten Einwände kann man festhalten, dass ohne Amplifizierung keine Arrayhybridisierung mit derartig geringen RNA-Mengen nach lasergesteuerter Mikrodisektion möglich wäre.

2.2 Anforderungen an Gewebeproben

Um intakte RNA aus Darmgewebe isolieren zu können, muß das Gewebe möglichst sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren werden. Auch sollten alle Gewebe, die in eine vergleichende Analyse einbezogen werden, annähernd gleich behandelt werden, um zu verhindern, dass ungleiche Mengen an Transkripten durch Abbauprozesse verloren gehen (Emmert-Buck *et al.*, 2000b).

Im Rahmen dieser Arbeit gewonnene Erfahrungen haben gezeigt, dass die Dauer der Lagerung der Gewebelöcke bei -80°C wenig Einfluß auf die Qualität der RNA hat, wohl aber die Häufigkeit der Temperaturwechsel von -80°C auf -20°C , die durch das Anfertigen von Kryogewebeschnitten bedingt sind.

Eine Dehydrierung der Gewebeschnitte nach erfolgtem Schneiden sollte RNasen, die in Darmgewebe gehäuft vorkommen, unschädlich machen. In einer Versuchsreihe, in der unterschiedliche Fixierungsparameter getestet wurden, konnte eine für RNA-Qualität optimale Dehydrierung des Gewebes durch ein Ethanol-Eisessig-Gemisch (Verhältnis 20/1) ermittelt werden (vgl. III.2.1.1, Tabelle 14). Durch Zugabe von Eisessig wurde eine Ansäuerung der Fixierungslösung erreicht und ein Milieu geschaffen, in dem Proteine (besonders unerwünschte RNasen) funktionsunfähig werden.

2.3 Auswertung von Arraydaten

Zur Auswertung der Daten aus den cDNA-Arrayhybridisierungen wurde die AtlasImage™ 2.0-Software von Clontech benützt, die speziell für die Auswertung von Atlas Arrays entwickelt wurde. Die Software erleichtert einige wesentliche Punkte: Jeder einzelne Spot kann unmissverständlich dem entsprechenden Gen zugeordnet werden, und die Intensität jedes Signals kann objektiv ermittelt werden. Dem Anwender überlassen ist jedoch die Wahl der Normalisierung. Wie Abbildung 10 und Tabelle 16 (s. III.2.3.2) zeigen, kann durch diese Wahl ein großer Einfluß auf die Ergebnisse ausgeübt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Auswertung der Arraydaten globale Normalisierung verwendet. Dabei werden die Signalintensitäten aller Spots mit dem Hintergrundwert verrechnet und ergeben den Normalisierungskoeffizienten. Vergleicht man nun Arrays mit unterschiedlichen Hintergrundwerten und unterschiedlichen Hybridisierungsstärken, werden diese Unterschiede im Normalisierungskoeffizienten berücksichtigt. Dies ist nicht der Fall, wenn gegen ein oder mehrere Haushaltsgene abgeglichen wird. Zudem ist bekannt, dass Haushaltsgene oft in Tumor- und Normalgewebe dysreguliert sind und sich somit nicht zur Normalisierung eignen (Bhatia *et al.*, 1994; Savonet *et al.*, 1997).

Die Ergebnisse der cDNA-Expressionsarrays, die bei Auswertung mit globaler Normalisierung erhalten wurden, konnten auch problemlos mit anderen Methoden (genspezifische RT-PCR und z.T. immunhistochemische Färbungen) nachvollzogen werden (vgl. III.3.3.1, III.3.3.2). Dies spricht auch für die Verwendung der globalen Normalisierung. Zudem konnte die mit globaler Normalisierung ermittelte Dysregulierung von Genen auch visuell durch Betrachten und Vergleichen der Signalintensitäten nachvollzogen werden, während dieser optische Eindruck bei

anderen Normalisierungsmethoden häufig nicht mit den errechneten Ergebnissen in Einklang zu bringen war.

Die Auswertung von cDNA-Arrays erfordert einen großen Zeitaufwand, da alle durch die Software gewonnen Ergebnisse auch manuell nachkontrolliert werden müssen. Dies ist nötig, da starke Expressionssignale z.T. andere, benachbarte Signale überstrahlen können und es somit zu falschen Signalwerten kommen kann. Vergleicht man mehr als zwei cDNA-Arrays miteinander, müssen Array1 mit Array2, Array1 mit Array3, Array1 mit Array4, usw. verglichen werden, da mittels Software immer nur zwei Populationen miteinander verglichen werden können. Das Bilden einer Schnittmenge der Einzelergebnisse muß anschließend manuell durch den Auswerter erfolgen.

Als problematisch hat sich die statistische Analyse der gewonnen Daten erwiesen. Aufgrund der langen methodischen Prozedur von lasergesteuerter Mikrodisektion, RNA-Isolierung, nested RAP-PCR bis cDNA-Arrayhybridisierung inklusive Auswertung konnten in dieser Arbeit die für statistische Analysen notwendigen Fallzahlen nicht erreicht werden.

Zudem trat das Problem auf, dass sich die Genexpressionsprofile der normalen Krypten beim Vergleich der einzelnen Patienten bereits sehr stark unterschieden haben. Die Frage, ob es sich dabei um realistische interindividuelle Schwankungen, also um einen tatsächlichen biologischen Unterschied, oder um eine Schwäche in der methodischen Strategie handelt, kann nur spekulativ behandelt werden. Es bleibt festzuhalten, dass das normale Darmmukosagewebe jeweils in keinem fest definierten Abstand zum Adenom entnommen wurde; teilweise stammten die normalen Kolonkrypten aus unmittelbarer Nachbarschaft des Adenoms (normal und adenomatös auf ein und demselben Schnitt lokalisiert) und teilweise stammte die normale Mukosa von Gewebeproben, die weit vom Adenom entfernt genommen worden waren (normal und adenomatös auf unterschiedlichen Schnitten lokalisiert). Weiterhin ist es eine Eigenschaft der RAP-PCR, Unterschiede zwischen zwei Populationen zu detektieren. Eventuell kommt dies besonders bei nur wenig RNA als Ausgangsmaterial zum Tragen.

Eine Variabilität in der Genexpression innerhalb der einzelnen, zu vergleichenden Gruppen wurde für das Kolonkarzinom auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Notterman *et al.*, 2001; Tsunoda *et al.*, 2001): Während Tsunoda *et al.* (2001) beim Vergleich von zwei Patienten generell sehr große Unterschiede im

Genexpressionsmuster und keine identisch dysregulierten Gene finden, diskutieren Notterman *et al.* (2001) dieses Phänomen als Neben aspekt und präsentieren 2,7 % identisch dysregulierte Gene beim Vergleich von 22 Normal- und Tumorgeweben. Diese beiden Studien stützen sich aber nicht auf mikrodissiziertes Gewebematerial, sondern auf Gesamt-Normal- und Gesamt-Tumorgewebe.

2.4 Anwendung der neu etablierten Methode zur Analyse von differenzieller Genexpression

2.4.1 Normale Kolonkrypten

Die neu entwickelte Strategie ermöglichte eine Genexpressionsanalyse entlang der Basis-Lumen-Achse innerhalb einer normalen Kolonkrypte. Die physiologische Regeneration des Kolonepithels wird durch ein Gleichgewicht von Proliferation an der Kryptenbasis und Zelltod an der Lumenoberfläche aufrechterhalten (Potten *et al.*, 1997a). Unterschiede im Genexpressionsmuster von basalen und luminalen Kryptenabschnitten sollten helfen, Einblicke in die komplexen molekularen Mechanismen innerhalb einer normalen Kolonkrypte zu gewinnen. Desweiteren sollte die neu etablierte und optimierte Methode an einem einfachen System getestet werden und durch Bestätigung der differenziellen Expression mit anderen Methoden ihre Zuverlässigkeit demonstriert werden.

Es konnten zwei Gene identifiziert werden, die überwiegend in basalen Kryptenabschnitten exprimiert werden: das Zellzyklus-assoziierte Gen für den multifunktionalen Transkriptionsfaktor E2F1, der an den Retinoblastoma-Tumorsuppressor bindet (Helin *et al.*, 1992), und das Mismatch-Reparatur-assoziierte Gen *p58/HHR23B* für das XP-C Reparatur-komplementierende Protein (Masutani *et al.*, 1994). Sowohl Reparatur- als auch Transkription-assoziierte Gene fördern den proliferativen Phänotyp der Epithelzellen an der Basis der Krypte und passen somit in das physiologische Konzept einer normalen Kolonkrypte. Johnston *et al.* (1989) konnten die Expression anderer Proliferationsmarker wie z.B. *ki-61* in basalen Kryptenabschnitten zeigen.

Die Expression von *c-jun* und *mch4* in den luminalen Kryptenabschnitten illustriert die hohe Apoptoserate von Epithelzellen in dieser Region der Krypte. Das nukleäre Proto-Onkogen *c-jun* kann als Induktor der Apoptose fungieren (Pandey und Wang, 1995; Leppä *et al.*, 1998). *Mch4* kodiert für eine apoptotische Cysteinprotease, einen

Vorläufer von Caspase 10, die als Ausführer des Zelltod-Programms bezeichnet wird (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Ng *et al.*, 1999). Auch die Expression anderer Apoptose-assoziiierter Gene, wie z.B. *bax* oder *bak*, konnte schon in luminalen Kryptenabschnitten gezeigt werden (Potten *et al.*, 1997a). Die Expression all dieser Gene weist auf frühe molekulare Apoptose-Ereignisse in luminalen Kryptenabschnitten hin, die für den Turnover von Epithelzellen notwendig sind. Die Aufrechterhaltung des Gewebes, seine ständige Regeneration hängt sowohl von Zelltod (luminaler Kryptenabschnitte) als auch von Zellproliferation (basale Kryptenabschnitte) ab.

Die mit der neuartigen methodischen Strategie gefundene differenzielle Expression der Gene für c-Jun, Mch4, p58/HHR23B und E2F1 konnte mit anderen Methoden (RT-PCR und Immunhistochemie) bestätigt werden (s. III.3.3). Dies stellte eindeutig die Authentizität der neu entwickelten methodischen Strategie unter Beweis.

2.4.2 Früh-adenomatöse Kolonkrypten

Mit der neu etablierten Methode sollten Veränderungen in der Entstehung des kolorektalen Karzinoms aus frühen präneoplastischen Läsionen untersucht werden. Deshalb wurden Genexpressionsmuster von normalen, aberranten und früh-adenomatösen Kolonkrypten erstellt. Aberrante und früh-adenomatöse Kolonkrypten stellen (sehr) frühe präneoplastische Veränderungen in der Entstehung des kolorektalen Karzinoms dar.

Die neu entwickelte Strategie der lasergesteuerten Mikrodissektion in Kombination mit RAP-PCR und cDNA-Expressionsarrays lieferte eine Flut an neuen Daten. Nach Analyse von sechs individuellen Adenomfällen sind deutliche Trends bei den Veränderungen in der Genexpression von normalen *versus* früh-adenomatösen Kolonkrypten erkennbar. Proliferations-assoziierte Gene (z. B. *p21-rac1*, *p38a*) sind vermehrt in früh-adenomatösen Krypten exprimiert, während Apoptose-assoziierte Gene (z. B. Gen für FAST-Kinase, *p53*) verringert exprimiert sind.

Es handelt sich hierbei um Tendenzen, für eindeutige Aussagen über Häufigkeit oder Maß an Dysregulation müßte eine größere Anzahl an Fällen analysiert werden. Diese ersten Anwendungen der neuartigen methodischen Strategie haben aber gezeigt, dass sich diese Methode sehr gut eignet, Kandidatengene zu finden und Tendenzen in der Genexpression zu erkennen. Für eine exakte Aussage können die Kandidatengene mit anderen Methoden bestätigt werden und dann einzeln an einer

größeren Anzahl an Fällen untersucht werden. Nachfolgende Kandidatengene bzw. involvierte Stoffwechselwege konnten identifiziert werden:

2.4.2.1 RAS-/MAPK-Weg

Einer der aktivierten Stoffwechselwege ist der RAS-/MAPK-Weg (MAPK = mitogen-aktivierte Proteinkinase), der eine wichtige Rolle in Proliferations- und Transformationsprozessen spielt. Am Ende der MAPK-Signalkaskade steht die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. von ATF2, c-Jun, c-Fos, CHOP/GADD153, Max oder MEF2 (vgl. Zusammenfassung bei Kyriakis und Avruch, 2001). Folgende an diesem Stoffwechselweg beteiligte Gene konnten in den Genexpressionsanalysen in frühen Adenomen als hochreguliert identifiziert werden (s. III.4.2.1, vgl. Anhang): *p21-rac1* (bei 4 von 6 Fällen), MAPK *p38a* (bei 3 von 6 Fällen), rho-GDP Dissoziationshemmer 2 (RHO GDI2, bei 2 von 6 Fällen), p21-aktivierte Kinase α (PAK1, bei 2 von 6 Fällen) und MAPK6 (extrazelluläre signalregulierte Kinase 3, ERK3, bei 1 von 6 Fällen).

P21-rac1 gehört zur RAS-Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine, ist mit der Plasmamembran assoziiert und an der Regulation von Zellwachstum (G2/M Transition), der Organisation des Cytoskeletts (Aktin-Filamente) und der Aktivierung von Proteinkinasen (z.B. c-Jun N-terminale Kinasen (JNK), stressaktivierte Proteinkinasen (SAPK) und mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) p38) beteiligt. Bindepartner von p21-rac1 sind RHO GDI und PAK1 (zusammengefasst bei Kyriakis und Avruch, 2001).

MAPK p38a ist ein Mitglied der Familie der stressinduzierten, mitogenaktivierten Proteinkinasen. Bisher sind vier verschiedene MAPK p38 bekannt (p38 α , p38 β , p38 δ , p38 γ). P38 α kann unterschiedliche Transkriptionsfaktoren aktivieren: CHOP/GADD153 vermittelt teilweise einen Zellzyklusstopp (G1/S1) als Konsequenz von DNA-Schäden, um eine DNA-Reparatur vor der Replikation zu ermöglichen. MAX, das mit p38 α einen Komplex bildet, interagiert mit dem Transkriptionsfaktor c-Myc, einem Schlüsselregulator von Proliferation, Differenzierung und Apoptose (zusammengefasst bei Kyriakis und Avruch, 2001).

Die Aktivierung dieses Stoffwechselweges in sehr frühen Stadien der Kolonkarzinogenese (Hochregulation in frühen Adenomen mit D1-Dysplasie) stellt wahrscheinlich ein sehr frühes Ereignis in der Kolonkarzinogenese dar, denn in sehr

späten Stadien (Karzinome) konnte eine Herunterregulierung von MAPK p38, ERK1 und 2 und JNK festgestellt werden (Wang *et al.*, 2000).

2.4.2.2 Thrombospondine

Thrombospondine (TSPs) sind kleine Glykoproteine, die sekretiert werden und Bestandteil der extrazellulären Matrix sind. TSP1 und TSP2 bilden Trimere, während TSP3-5 Pentamere bilden. TSP2 interagiert mit Zell-Oberflächen-Rezeptoren wie Integrin $\alpha_v\beta_3$, *low-density lipoprotein-related receptor protein* oder Heparansulfat-Proteoglycanen. Bisher sind wenig Daten über Signaltransduktionswege verfügbar; bekannt ist allerdings, dass TSP1 und TSP2 Zellfunktionen dadurch beeinflussen, dass sie Interaktionen der extrazellulären Matrix modulieren: TSP1 und TSP2 wirken chemotaktisch, angioinhibitorisch und gegen Tumorbildung (s. Zusammenfassung bei Bornstein, 2001).

In vivo Experimente haben gezeigt, dass TSP1- und TSP2-Überexpression das Tumorwachstum verringern. Dies geschieht nicht durch eine Beeinflussung der Zellproliferation sondern der Angiogenese (Streit *et al.*, 1999). Bei TSP2-defizienten Mäusen konnte ein schnelleres Tumorwachstum im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Die TSP2-Defizienz äußert sich nicht in einem veränderten Proliferations- oder Differenzierungsverhalten, sondern in einer reduzierten Apoptoserate der Tumorzellen (Hawighorst *et al.*, 2001). Untersuchungen am Kolonkarzinom haben eine TSP2-Expression in 62 % der Fälle zu Tage gefördert, verbunden mit einem reduzierten Vorkommen von Lebermetastasen. Eine fehlende TSP2 Expression in Kolontumoren führt dagegen zu einem gehäuften Auftreten von Lebermetastasen (Tokunaga *et al.*, 1999).

Allgemein wird einer **TSP2** Expression eine Tumor-Abwehrfunktion zugeschrieben, es wird auch von einem „angiogenischen Switch“ gesprochen, der in frühen Stadien der Tumorbildung vermutet wird (Hawighorst *et al.*, 2001).

Neben der Herunterregulierung der TSP2-mRNA in 3 von 6 Adenomfällen konnten folgende an diesem Stoffwechselweg beteiligte Gene in den Genexpressionsanalysen in frühen Adenomen als dysreguliert identifiziert werden (s. III.4.2.1, Anhang): Gene für *low-density lipoprotein-related receptor protein* (bei 1 von 6 Fällen) und die Integrin-Rezeptoren Integrin α_2 (bei 1 von 6 Fällen) sowie Integrin α_6 (bei 2 von 6 Fällen). Aufgrund von nicht zur Verfügung stehenden klinischen Daten über das Vorkommen von Lebermetastasen in den analysierten Fällen konnte bisher

keine Korrelation zur TSP2 Expression hergestellt werden (es handelte sich meist um Patienten mit Adenomen, Karzinome waren meist nicht vorhanden).

2.4.2.3 Interferon γ Rezeptor

Der **Interferon γ Rezeptor** (IFGR) wirkt über den JAK-/STAT-Signaltransduktionsweg (JAK = Janus Kinase, STAT = *signal transducers and activators of transcription*). Der Ligand von IFGR, Interferon γ (IFN γ) vermittelt einen anti-proliferativen Effekt (Raitano und Korc, 1993) und stimuliert die Expression von MHC Klasse I Molekülen, was einer Stimulation der Immunabwehr gegen Tumorzellen entspricht (Haus, 2000). Eine Hochregulierung von IFGR könnte also als ein Versuch interpretiert werden, unkontrolliertem Tumorwachstum entgegenzusteuern.

2.4.3 Aberrante Krypten

Obwohl sie dem Aussehen nach eher normalen Krypten gleichen, sind aberrante Krypten in ihrem Genexpressionsprofil adenomatösen Krypten ähnlicher als normalen Krypten (s. III.4.2.2, Abbildung 19). Ihre Epithelschicht zeigt sich kaum verdickt, Becherzellen sind noch vorhanden (s. III.4.1, Tabelle 19). Dabei ist es aber offensichtlich wichtig, in welcher Entfernung zum Adenom das Normalgewebe entnommen wurde. Nahe am Adenom und in unmittelbarer Nähe von aberranten Krypten lokalisierte normale Krypten zeigen nämlich ein dem der aberranten Krypten ähnlicheres Genexpressionsprofil (s. III.4.2.2, Abbildung 19c). Dieser Befund wirft die Frage auf, ob optisch und histologisch normale Krypten, die in direkter Nachbarschaft von aberranten und adenomatösen Krypten liegen, noch als „normal“ einzustufen sind. Sie zeigen eventuell schon genetische Veränderungen, die histologisch jedoch noch nicht zum Tragen kommen.

Es muß wohl von einem fließenden Übergang im Genexpressionsmuster von Normal- zu Adenomgewebe ausgegangen werden. Je näher am Adenom „normale“ Krypten liegen, desto ähnlicher wird ihr Genexpressionsprofil dem von aberranten Krypten, die am Rande eines Adenoms lokalisiert sind.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei aberranten Krypten um Vorläuferstadien von Adenomen handelt. Das Genexpressionsmuster von aberranten Krypten zeigt deutliche Ähnlichkeiten mit dem von

früh-adenomatösen Krypten, wenn als Referenz eindeutig normale Krypten mit entsprechender Entfernung zum Adenom verwendet werden.

Die Frage, ob aberrante Krypten tatsächliche Vorläuferstadien von Adenomen sind, wurde bisher immer kontrovers diskutiert. Es gibt zahlreiche Indizien, die für echte Vorläuferstadien sprechen, aber ein schlüssiger Beweis liegt bisher nicht vor. Shpitz *et al.* (1998) sehen aberrante Krypten als echte präneoplastische Läsionen und führen folgende Argumente dafür auf: die teilweise dysplastische Morphologie von aberranten Krypten, das Vorkommen von somatischen *APC*- und *k-ras*-Mutationen sowie von genomischer Instabilität (Pretlow *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1994; Heinen *et al.*, 1996; Augenlicht *et al.*, 1996; Polyak *et al.*, 1996). Bouzourene *et al.* (1999) weisen jedoch auf die vielfältige Morphologie von aberranten Krypten hin. Sie stellen die Hypothese auf, dass nur eine kleine Gruppe aller aberranten Krypten mit Dysplasie in Verbindung gebracht werden kann. Nur diese stellten dann ein frühes Stadium in der Kolonkarzinogenese dar. Gegen diese auf rein histologischen Daten basierende Hypothese spricht allerdings die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass visuell klassifizierte, morphologisch normale Krypten genetisch nicht mehr als „normal“ einzustufen sind, wenn sie in unmittelbarer Nähe eines Adenoms lokalisiert sind (s. oben).

Bei einer Tumorentwicklung spielen sicherlich viele Faktoren eine Rolle; sowohl genetische als auch Umweltfaktoren vermögen das Schicksal einer Kolonkrypte zu beeinflussen. Mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Methode gelang es erstmals, Genexpressionsprofile von normalen, aberranten und früh-adenomatösen Kolonkrypten zu erstellen, zu vergleichen und somit einen ersten Einblick in sehr frühe Ereignisse in der Kolonkarzinogenese zu erhalten. Dabei konnte eine Reihe von möglichen Kandidatengenen identifiziert werden, deren weitere Untersuchungen einen Beitrag zur Aufklärung von frühen Mechanismen in der Entstehung von Kolonkarzinomen leisten können.

Anhand der vorliegenden Untersuchungen konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die hier entwickelte, neuartige Strategie der lasergesteuerten Mikrodisektion in Kombination mit RAP-PCR und cDNA-Array, die Untersuchung mikroskopisch kleiner, exakt definierter Gewebebereiche auf mRNA-Ebene ermöglicht.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung der Rolle der Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor-Typ γ (PTPR γ) in der Kolonkarzinogenese im Mittelpunkt. *Ptprg* war in Experimenten zur differentiellen Genexpression als mögliches Kandidatengenes für das Kolonkarzinom identifiziert worden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Hochregulierung der *pptrg*-mRNA in 73,7 % der analysierten Kolontumoren ermittelt werden, wobei die Hochregulierung sich zwischen 1,2- und 89-fach bewegte. 26,3 % der analysierten Kolontumoren zeigten eine Herunterregulierung (1,1- bis 23,1-fach) der *pptrg*-mRNA im Vergleich zu normaler Kolonmukosa. Es konnte kein Zusammenhang zwischen *pptrg*-Expression und Mikrosatellitenstatus der Tumoren hergestellt werden.

Die Ausarbeitung eines Transfektions- und Selektionsprotokolls für eine *pptrg*-mRNA negative Zelllinie (HT-29) zur Überexpression von *pptrg* konnte erreicht werden.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Charakterisierung von frühen präneoplastischen Läsionen in der Entstehung des Kolonkarzinoms hinsichtlich molekularer Veränderungen. Dazu war es erforderlich neue methodische Wege zu beschreiten und durch Optimierung eine Anpassung dieser Methoden an ein sehr niedriges Zellzahlniveau zu erreichen.

Es wurde eine neuartige methodische Strategie für das Erstellen von Genexpressionsprofilen aus frühen präneoplastischen Läsionen erarbeitet. Exakt definierte, mikroskopisch kleine Gewebebereiche (normale, aberrante oder frühadenomatöse Kolonkrypten) wurden *via* lasergesteuerter Mikrodissektion aus Gewebeschnitten isoliert und daraus RNA gewonnen. Für die Gewebeschnitte wurde ein für RNA-Isolierung aus Darmgewebe optimiertes Fixierungsprotokoll erarbeitet. Eine 10minütige Dehydrierung des Gewebes mit einem Ethanol-Eisessig-Gemisch (20/1) bei -20°C erwies sich für RNA-Qualität sowie -quantität als optimal. Durch eine Amplifizierung der Transkripte in einer zweistufigen RNA arbitrarily primed PCR („nested“ RAP-PCR) und Hybridisierung dieser RAP-PCR-Reaktion mit cDNA-Expressionsarrays konnten Genexpressionsmuster erstellt werden. Die Versuchstrategie wurde an einem physiologisch gut beschriebenen, aber hinsichtlich Genexpression kaum untersuchten System (normale Kolonkrypte) erfolgreich getestet. Gene, die in basalen bzw. luminalen Kryptenabschnitten als differentiell

reguliert identifiziert werden konnten, ließen sich mit anderen Methoden (genspezifische RT-PCR und teilweise Immunhistochemie) bestätigen.

Die Analyse der Genexpressionsprofile von sechs unterschiedlichen Fällen mit normalen *versus* früh-adenomatösen Kolonkrypten mit D1-Dysplasie ergab eine Dysregulation folgender Gene bei mindestens 50 % der analysierten Fälle: p21-rac1 (bei 4 von 6 Fällen hochreguliert), Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 α (MAPK p38 α , bei 3 von 6 Fällen hochreguliert), Interferon γ Rezeptor (IFGR, bei 3 von 6 Fällen hochreguliert), Thrombospondin 2 (TSP2, bei 3 von 6 Fällen herunterreguliert), Fas-aktivierte Serin-Threonin-Kinase (FAST-Kinase, bei 3 von 6 Fällen herunterreguliert) und p53 (bei 3 von 6 Fällen herunterreguliert). Die Dysregulation wurde exemplarisch für p21-rac1 und IFGR mittels immunhistochemischer Färbungen bestätigt.

Eine Analyse der Genexpressionsprofile von normalen, aberranten und früh-adenomatösen Krypten ergab eine Ähnlichkeit der Profile von aberranten und früh-adenomatösen Krypten, wenn das Normalgewebe in Abstand zum Adenom entnommen wurde.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Methode gelang es erstmals, Genexpressionsprofile von normalen, aberranten und früh-adenomatösen Kolonkrypten zu erstellen, zu vergleichen und somit einen ersten Einblick in sehr frühe Ereignisse in der Kolonkarzinogenese zu erhalten.

VI. ABKÜRZUNGEN

abs	absolut
ACF	<i>Aberrant Crypt Foci</i>
AEC	3-amino-9-ethylcarbazol
AK	Antikörper
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	kompletäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CIN	chromosomale Instabilität, chromosomal instabil
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
D1-/D2-/D3-Dysplasie	niedrig-/mittel-/hochgradige Dysplasie
DCC	<i>deleted in colon carcinoma</i>
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest	destilliert
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
(E)RG	(Eppendorf-)Reaktionsgefäß(e)
f	vorwärts
FAP	familiäre adenomatöse Polypose
FCS	fötales Kälberserum
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxilin/Eosin
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HNPCC	erbliches nicht-polypöses Kolonkarzinom
IFGR	Interferon γ Rezeptor
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
KRK	kolorektale(s) Karzinom(e)
LB	Luria-Bertani-(Medium)
LGM	lasergesteuerte Mikrodisektion
LOH	<i>loss of heterozygosity</i> , Allelverlust
LPC	<i>laser pressure catapulting</i>
M	molar

<u>M</u>	Median
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
min	Minute(n)
MIN	Mikrosatelliteninstabilität, mikrosatelliteninstabil
mRNA	Botenribonukleinsäure
MS	Mikrosatellit(en)
NEAS	nicht-essentielle Aminosäuren
n.u.	nicht untersucht
n.v.	nicht veröffentlicht
<i>p.a.</i>	zur Analyse
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PTPR γ /ptprg	Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor-Typ γ
PVA	Polyvinylalkohol
r	rückwärts
RAP-PCR	RNA arbitrarily primed PCR
RER	<i>replication error</i>
(r)RNA	(ribosomale) Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
s	Sekunde(n)
S	Signalintensität
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Citrat-gepufferte Salzlösung
T _{ann}	Primer-Annealing-Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSP	Thrombospondin
tuba1	Tubulin alpha 1
u	Einheiten
ÜK	Übernachtskultur(en)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
v	Volumenanteil
X-Gal	5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D ⁻ galactosid
Xx g	X-fache Erdbeschleunigung
w	Gewichtsanteil

VII. LITERATUR

- AALTONEN, L.A., PELTOMAKI, P., LEACH, F.S., SISTONEN, P., PYLKKANEN, L., MECKLIN, J.P., JARVINEN, H., POWELL, S.M., JEN, J. UND HAMILTON, S.R.** (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* **260**, 812-816.
- AALTONEN, L.A., PELTOMAKI, P., MECKLIN, J.P., JARVINEN, H., JASS, J.R., GREEN, J.S., LYNCH, H.T., WATSON, P., TALLQVIST, G. UND JUHOLA, M.** (1994) Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **54**, 1645-1648.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. UND LIPMAN, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- AUGENLICHT, L.H., RICHARDS, C., CORNER, G. UND PRETLOW, T.P.** (1996) Evidence for genomic instability in human colonic aberrant crypt foci. *Oncogene* **12**, 1767-1772.
- BACKERT, S., GELOS, M., KOBALZ, U., HANSKI, M.L., BOHM, C., MANN, B., LOVIN, N., GRATCHEV, A., MANSMANN, U., MOYER, M.P., RIECKEN, E.O. UND HANSKI, C.** (1999) Differential gene expression in colon carcinoma cells and tissues detected with a cDNA array. *Int. J. Cancer* **82**, 868-874.
- BAKER, S.J., FEARON, E.R., NIGRO, J.M., HAMILTON, S.R., PREISINGER, A.C., JESSUP, J.M., VANTUINEN, P., LEDBETTER, D.H., BARKER, D.F. UND NAKAMURA, Y.** (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**, 217-221.
- BARNEA, G., GRUMET, M., MILEV, P., SILVENNOINEN, O., LEVY, J., SAP, J. UND SCHLESSINGER, J.** (1994) Receptor-tyrosine-phosphatase β is expressed in the form of proteoglycan and binds to the extracellular matrix protein tenascin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14349-14352.
- BARNEA, G., SILVENNOINEN, O., SHAANAN, B., HONEGGER, A., CANOLL, P., D'EUSTACHIO, P., MORSE, B., LEVY, J., LAFORGIA, S., HUEBNER, K., MUSACCHIO, J., SAP, J. UND SCHLESSINGER, J.** (1993) Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. *Mol. Cell Biol.* **13**, 1497-1506.
- BASORA, N., DESLOGES, N., CHANG, Q., BOUATROUSS, Y., GOSSELIN, J., POISSON, J., SHEPPARD, D. UND BEAULIEU, J.F.** (1998) Expression of the alpha9beta1 integrin in human colonic epithelial cells: resurgence of the fetal phenotype in a subset of colon cancers and adenocarcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* **75**, 738-743.
- BEDI, A., PASRICHA, P.J., AKHTAR, A.J., BARBER, J.P., BEDI, G.C., GIARDIELLO, F.M., ZEHNBAUER, B.A., HAMILTON, S.R. UND JONES, R.J.** (1995) Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res.* **55**, 1811-1816.

- BELL, S.M., SCOTT, N., CROSS, D., SAGAR, P., LEWIS, F.A., BLAIR, G.E., TAYLOR, G.R., DIXON, M.F. UND QUIRKE, P.** (1993) Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology* **104**, 57-64.
- BHATIA, P., TAYLOR, W.R., GREENBERG, A.H. UND WRIGHT, J.A.** (1994) Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S- ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal. Biochem.* **216**, 223-226.
- BIASCO, G., PAGANELLI, G.M., MIGLIOLI, M. UND BARBARA, L.** (1992) Cell proliferation biomarkers in the gastrointestinal tract. *J. Cell Biochem. Suppl.* **16G**, 73-78.
- BIRD, R.P.** (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* **37**, 147-151.
- BISHOP, J.M.** (1987) The molecular genetics of cancer. *Science* **235**, 305-311.
- BOLAND, C.R.** (1996) Roles of the DNA mismatch repair genes in colorectal tumorigenesis. *Int. J. Cancer* **69**, 47-49.
- BONNER, R.F., EMMERT-BUCK, M., COLE, K., POHIDA, T., CHUAQUI, R., GOLDSTEIN, S. UND LIOTTA, L.A.** (1997) Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* **278**, 1481-1483.
- BORNSTEIN, P.** (2001) Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J. Clin. Invest.* **107**, 929-934.
- BOS, J.L., FEARON, E.R., HAMILTON, S.R., VERLAAN-DE VRIES, M., VAN BOOM, J.H., VAN DER EB, A.J. UND VOGELSTEIN, B.** (1987) Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* **327**, 293-297.
- BOUZOURENE, H., CHAUBERT, P., SEELENTAG, W., BOSMAN, F.T. UND SARAGA, E.** (1999) Aberrant crypt foci in patients with neoplastic and nonneoplastic colonic disease. *Hum. Pathol.* **30**, 66-71.
- BRADFORD, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- CAHILL, D.P., LENGAUER, C., YU, J., RIGGINS, G.J., WILLSON, J.K., MARKOWITZ, S.D., KINZLER, K.W. UND VOGELSTEIN, B.** (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**, 300-303.
- CAVENEY, W.K., DRYJA, T.P., PHILLIPS, R.A., BENEDICT, W.F., GODBOUT, R., GALLIE, B.L., MURPHREE, A.L., STRONG, L.C. UND WHITE, R.L.** (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* **305**, 779-784.

- CERRONI, L., MINKUS, G., PUTZ, B., HOFER, H. UND KERL, H.** (1997) Laser beam microdissection in the diagnosis of cutaneous B-cell lymphoma. *Br. J. Dermatol.* **136**, 743-746.
- CUNNINGHAM, C. UND DUNLOP, M.G.** (1994) Genetics of colorectal cancer. *Br. Med. Bull.* **50**, 640-655.
- DAVIS, R.L., WEINTRAUB, H. UND LASSAR, A.B.** (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000.
- DELATTRE, O., OLSCHWANG, S., LAW, D.J., MELOT, T., REMVIKOS, Y., SALMON, R.J., SASTRE, X., VALIDIRE, P., FEINBERG, A.P. UND THOMAS, G.** (1989) Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* **2**, 353-356.
- DENIJN, M., DE WEGER, R.A., BERENDS, M.J., COMPIER-SPIES, P.I., JANSZ, H., VAN UNNIK, J.A. UND LIPS, C.J.** (1990) Detection of calcitonin-encoding mRNA by radioactive and non-radioactive in situ hybridization: improved colorimetric detection and cellular localization of mRNA in thyroid sections. *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 351-358.
- DERISI, J., PENLAND, L., BROWN, P.O., BITTNER, M.L., MELTZER, P.S., RAY, M., CHEN, Y., SU, Y.A. UND TRENT, J.M.** (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat. Genet.* **14**, 457-460.
- DIATCHENKO, L., LAU, Y.-F., CAMPBELL, A.P., CHENCHIK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, S., LUKYANOV, K., GURSKAYA, N., SVERDLOV, E.D. UND SIEBERT, P.D.** (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6025-6030.
- DI GREGORIO, C., LOSI, L., FANTE, R., MODICA, S., GHIDONI, M., PEDRONI, M., TAMASSIA, M.G., GAFA, L., PONZ, D.L. UND RONCUCCI, L.** (1997) Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology* **30**, 328-334.
- DODGE, G.R., KOVALSZKY, I., HASSELL, J.R. UND IOZZO, R.V.** (1990) Transforming growth factor beta alters the expression of heparan sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 18023-18029.
- DORRIES, U., BARTSCH, U., NOLTE, C., ROTH, J. UND SCHACHNER, M.** (1993) Adaptation of a non-radioactive in situ hybridization method to electron microscopy: detection of tenascin mRNAs in mouse cerebellum with digoxigenin-labelled probes and gold-labelled antibodies. *Histochemistry* **99**, 251-262.
- DRUCK, T., KASTURY, K., HADACZEK, P., PODOLSKI, J., TOLOCZKO, A., SKORSKI, A., OHTA, M., LAFORGIA, S., LASOTA, J., MCCUE, P., LUBINSKI, J. UND HUEBNER, K.** (1995) Loss of Heterozygosity at the Familial RCC t(3;8) Locus in most Clear Cell Renal Carcinomas. *Cancer Res.* **55**, 5348-5353.

- DUGUID, J.R., ROHWER, R.G. UND SEED, B. (1988) Isolation of cDNAs of scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5738-5742.
- DUVAL, A., GAYET, J., ZHOU, X.P., IACOPETTA, B., THOMAS, G. UND HAMELIN, R. (1999) Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* **59**, 4213-4215.
- EMMERT-BUCK, M.R., BONNER, R.F., SMITH, P.D., CHUAQUI, R.F., ZHUANG, Z., GOLDSTEIN, S.R., WEISS, R.A. UND LIOTTA, L.A. (1996) Laser capture microdissection. *Science* **274**, 998-1001.
- EMMERT-BUCK, M.R., GILLESPIE, J.W., PAWELETZ, C.P., ORNSTEIN, D.K., BASRUR, V., APPELLA, E., WANG, Q.H., HUANG, J., HU, N., TAYLOR, P. UND PETRICOIN, E.F. (2000a) An approach to proteomic analysis of human tumors. *Mol. Carcinog.* **27**, 158-165.
- EMMERT-BUCK, M., STRAUSBERG, R.L., KRIZMAN, D.B., BONALDO, M.F., BONNER, R.F., BOSTWICK, D.G., BROWN, M.R., BUETOW, K.H., CHUAQUI, R.F., COLE, K., DURAY, P.H., ENGLERT, C.R., GILLESPIE, J.W., GREENHUT, S., GROUSE, L., HILLIER, L.W., KATZ, K.S., KLAUSNER, R.D., KUZNETZOV, V., LASH, A.E., LENNON, G., LINEHAN, W.M., LIOTTA, L.A., MARRA, M.A., MUNSON, P.J., ORNSTEIN, D.K., PRABHU, V.V., PRANGE, C., SCHULER, G.D., SAORES, M.B., TOLSTOSHEV, C.M., VOCKE, C.D. UND WATERSTON, R.H. (2000b) Molecular profiling of clinical tissue specimens. *J. Mol. Diagnostics* **2**, 60-66.
- FEARON, E.R., CHO, K.R., NGRO, J.M., KERN, S.E., SIMONS, J.W., RUPPERT, J.M., HAMILTON, S.R., PREISINGER, A.C., THOMAS, G. UND KINZLER, K.W. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* **247**, 49-56.
- FEARON, E.R. UND VOGELSTEIN, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767.
- FELDMANN, M. AND BOLAND, C. R. (2000) Gastroenterology and hepatology; The comprehensive visual reference; Volume 2; Colon, rectum, and anus.
- FEND, F., EMMERT-BUCK, M.R., CHUAQUI, R., COLE, K., LEE, J., LIOTTA, L.A. UND RAFFELD, M. (1999) Immuno-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. *Am. J. Pathol.* **154**, 61-66.
- FERNANDES-ALNEMRI, T.F., ARMSTRONG, R.C., KREBS, J., SRINIVASULA, S.M., WANG, L., BULLRICH, F., FRITZ, L.C., TRAPANI, J.A., TOMASELLI, K.J., LITWACK, G. UND ALNEMRI, E.S. (1996) In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7464-7469.
- FIALKOW, P.J. (1974) The origin and development of human tumors studied with cell markers. *N. Engl. J. Med.* **291**, 26-35.

- FIALKOW, P.J.** (1979) Clonal origin of human tumors. *Annu. Rev. Med.* **30**, 135-143.
- FISCHER, E., CHARBONNEAU, H. UND TONKS, N.** (1991) Protein tyrosine phosphatases: a diverse of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* **253**, 401-406.
- FORRESTER, K., ALMOGUERA, C., HAN, K., GRIZZLE, W.E. UND PERUCHO, M.** (1987) Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* **327**, 298-303.
- FRANK, T.S.** (2001) Hereditary cancer syndromes. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **125**, 85-90.
- FRIEND, S.H., DRYJA, T.P. UND WEINBERG, R.A.** (1988) Oncogenes and tumor-suppressing genes. *N. Engl. J. Med.* **318**, 618-622.
- FULLWOOD, P., MARCHINI, S., RADER, J.S., MARTINEZ, A., MACARTNEY, D., BROGGINI, M., MORELLI, C., BARBANTI-BRODANO, G., MAHER, E.R. UND LATIF, F.** (1999) Detailed genetic and physical mapping of tumor suppressor loci on chromosome 3p in ovarian cancer. *Cancer Res.* **59**, 4662-4667.
- GIAID, A., HAMID, Q., ADAMS, C., SPRINGALL, D.R., TERENCEHI, G. UND POLAK, J.M.** (1989) Non-isotopic RNA probes. Comparison between different labels and detection systems. *Histochemistry* **93**, 191-196.
- GOLDSWORTHY, S.M., STOCKTON, P.S., TREMPUS, C.S., FOLEY, J.F. UND MARONPOT, R.R.** (1999) Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol. Carcinog.* **25**, 86-91.
- HAMELIN, R., LAURENT-PUIG, P., OLSCHWANG, S., JEGO, N., ASSELAIN, B., REMVIKOS, Y., GIRODET, J., SALMON, R.J. UND THOMAS, G.** (1994) Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* **106**, 42-48.
- HANKS, S., QUINN, A. UND HUNTER, T.** (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52.
- HANSEN, M.F. UND CAVENEE, W.K.** (1987) Genetics of cancer predisposition. *Cancer Res.* **47**, 5518-5527.
- HANSEN, M.F. UND CAVENEE, W.K.** (1988) Retinoblastoma and the progression of tumor genetics. *Trends Genet.* **4**, 125-128.
- HAO, X.P., PRETLOW, T.G., RAO, J.S. UND PRETLOW, T.P.** (2001) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is expressed similarly in multiple aberrant crypt foci and colorectal tumors from the same patients. *Cancer Res.* **61**, 419-422.
- HAO, X.P., WILLIS, J.E., PRETLOW, T.G., RAO, J.S., MACLENNAN, G.T., TALBOT, I.C. UND PRETLOW, T.P.** (2000) Loss of fragile histidine triad expression in colorectal carcinomas and premalignant lesions. *Cancer Res.* **60**, 18-21.

- HARTWELL, L.** (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* **71**, 543-546.
- HAUS, O.** (2000) The genes of interferons and interferon-related factors: localization and relationships with chromosome aberrations in cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **48**, 95-100.
- HAWIGHORST, T., VELASCO, P., STREIT, M., HONG, Y.K., KYRIAKIDES, T.R., BROWN, L.F., BORNSTEIN, P. UND DETMAR, M.** (2001) Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO J.* **20**, 2631-2640.
- HEINEN, C.D., SHIVAPURKAR, N., TANG, Z., GRODEN, J. UND ALABASTER, O.** (1996) Microsatellite instability in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res.* **56**, 5339-5341.
- HELIN, K., LEES, J.A., VIDAL, M., DYSON, N.J., HARLOW, E. UND FATTAEY, A.** (1992) A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell* **70**, 337-350.
- HELLER, R.A., SCHENA, M., CHAI, A., SHALON, D., BEDILION, T., GILMORE, J., WOOLLEY, D.E. UND DAVIS, R.W.** (1997) Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2150-2155.
- HER, C. UND DOGGETT, N.A.** (1998) Cloning, structural characterization, and chromosomal localization of the human orthologue of *Saccharomyces cerevisiae* MSH5 gene. *Genomics* **52**, 50-61.
- HERSKOWITZ, I.** (1987) Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* **329**, 219-222.
- HOFFMAN, S. UND EDELMAN, G.M.** (1983) Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5762-5766.
- HUNTER, N.** (1989) Protein-Tyrosine Phosphatases: The other side of the coin. *Cell* **58**, 1013-1016.
- IINO, H., FUKAYAMA, M., MAEDA, Y., KOIKE, M., MORI, T., TAKAHASHI, T., KIKUCHI-YANOSHITA, R., MIYAKI, M., MIZUNO, S. UND WATANABE, S.** (1994) Molecular genetics for clinical management of colorectal carcinoma. 17p, 18q, and 22q loss of heterozygosity and decreased DCC expression are correlated with the metastatic potential. *Cancer* **73**, 1324-1331.
- IYER, V.R., ESEN, M.B., ROSS, D.T., SCHULER, G., MOORE, T., LEE, J.C.F., TRENT, J.M., STAUDT, L.M., HUDSON, J., BOGUSKI, M.S., LASHKARI, D., SHALON, D., BOTSTEIN, D. UND BROWN, P.O.** (1999) The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* **283**, 83-87.

- JEN, J., KIM, H., PIANTADOSI, S., LIU, Z.F., LEVITT, R.C., SISTONEN, P., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B. UND HAMILTON, S.R.** (1994a) Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **331**, 213-221.
- JEN, J., POWELL, S.M., PAPADOPOULOS, N., SMITH, K.J., HAMILTON, S.R., VOGELSTEIN, B. UND KINZLER, K.W.** (1994b) Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res.* **54**, 5523-5526.
- JOHNSTON, P.G., O'BRIEN, M.J., DERVAN, P.A. UND CARNEY, D.N.** (1989) Immunohistochemical analysis of cell kinetic parameters in colonic adenocarcinomas, adenomas, and normal mucosa. *Hum. Pathol.* **20**, 696-700.
- KAPLAN, R., MORSE, B., HUEBNER, K., CROCE, C., HOWK, R., RAVERA, M., RICCA, G., JAYE, M. UND SCHLESSINGER, J.** (1990) Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7000-7004.
- KIM, H., JEN, J., VOGELSTEIN, B. UND HAMILTON, S.R.** (1994) Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am. J. Pathol.* **145**, 148-156.
- KINZLER, K.W., NIBERT, M.C., SU, L.K., VOGELSTEIN, B., BRYAN, T.M., LEVY, D.B., SMITH, K.J., PREISINGER, A.C., HEDGE, P. UND McKECHNIE, D.** (1991) Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* **253**, 661-665.
- KISHIHARA, K., PENNINGER, J., WALLACE, V.A., KUNDIG, T.M., KAWAI, K., WAKEHAM, A., TIMMS, E., PFEFFER, K., OHASHI, P.S. UND THOMAS, M.L.** (1993) Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45- exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* **74**, 143-156.
- KNUDSON, A.G.** (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 820-823.
- KNUDSON, A.G.** (1985) Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.* **45**, 1437-1443.
- KNUDSON, A.G.** (1993) Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10914-10921.
- KOMMINOTH, P.** (1992) Digoxigenin as an alternative probe labeling for in situ hybridization. *Diagn. Mol. Pathol.* **1**, 142-150.
- KONSTANTAKOS, A.K., SU, I.M., PRETLOW, T.G., STELLATO, T.A. UND PRETLOW, T.P.** (1996) Human aberrant crypt foci with carcinoma in situ from a patient with sporadic colon cancer. *Gastroenterology* **111**, 772-777.
- KULLMANN, F., BOCKER, T., SCHÖLMERICH, J. UND RÜSCHOFF, J.** (1996) Microsatellite instability - new aspects in genetics and molecular biology of hereditary nonpolyposis and sporadic colorectal tumors. *Z. Gastroenterol.* **34**, 813-822.

- KULLMANN, F., LECHNER, S., MÜLLER-LADNER, U., BENZING, C. UND SCHÖLMERICH, J.** (1999) Identification of receptor-type protein tyrosine phosphatase γ , a potential tumor suppressor gene differentially expressed in colon cancer. *Gastroenterology Suppl.* **114**, G1951.
- KYRIAKIS, J.M. UND AVRUCH, J.** (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**, 807-869.
- LÄMMLI, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LAFORGIA, S., LASOTA, J., LATIF, F., BOGHOSIAN-SELL, L., KASTURY, K., OHTA, M., DRUCK, T., ATCHISON, L., CANNIZZARO, L.A., BARNEA, G., SCHLESSINGER, J., MODI, W., KUZIMIN, I., TORY, K., ZBAR, B., CROCE, C., LERMAN, M. UND HUEBNER, K.** (1993) Detailed genetic and physical map of the 3p chromosome region surrounding the familial renal cell carcinoma chromosome translocation, t(3;8)(p14.2;q24.1). *Cancer Res.* **53**, 3118-3124.
- LAFORGIA, S., MORSE, B., LEVY, J., BARNEA, G., CANNIZZARO, L.A., LI, F., NOWELL, P., BOGHOSIAN-SELL, L., GLICK, J., WESTON, A., HARRIS, C., DRABKIN, H., PATTERSON, D., CROCE, C., SCHLESSINGER, J. UND HUEBNER, K.** (1991) Receptor protein-tyrosine phosphatase γ is a candidate tumor suppressor gene at human chromosome region 3p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5036-5040.
- LATIF, F., TORY, K., MODI, W., GEIL, L., LAFORGIA, S., HUEBNER, K., ZBAR, B. UND LERMAN, M.** (1993) A MspI polymorphism and linkage mapping of the human protein-tyrosine phosphatase γ (PTPRG) gene. *Hum. Mol. Genetics* **2**, 91.
- LAURENT-PUIG, P., OLSCHWANG, S., DELATTRE, O., REMVIKOS, Y., ASSELAIN, B., MELOT, T., VALIDIRE, P., MULERIS, M., GRODET, J. UND SALMON, R.J.** (1992) Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology* **102**, 1136-1141.
- LECHNER, S., MÜLLER-LADNER, U., NEUMANN, E., DIETMAIER, W., WELSH, J., SCHÖLMERICH, J., RÜSCHOFF, J. UND KULLMANN, F.** (2001) Use of simplified transcriptors for the analysis of gene expression profiles in laser-microdissected cell populations. *Lab. Invest.* **81**, 1233-1242.
- LEE, W.H., BOOKSTEIN, R., HONG, F., YOUNG, L.J., SHEW, J.Y. UND LEE, E.Y.** (1987) Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* **235**, 1394-1399.
- LENGAUER, C., KINZLER, K.W. UND VOGELSTEIN, B.** (1998) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**, 623-627.
- LEPPÄ, S., SAFFRICH, R., ANSORGE, W. UND BOHMANN, D.** (1998) Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J.* **17**, 4404-4413.

- LIANG, P. UND PARDEE, A.B.** (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.
- LIANG, P., ZHU, W., ZHANG, X., GUO, Z., O'CONNELL, R.P., AVERBOUKH, L., WANG, F. UND PARDEE, A.B.** (1994) Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5763-5764.
- LIPKIN, M.** (1988) Biomarkers of increased susceptibility to gastrointestinal cancer: new application to studies of cancer prevention in human subjects. *Cancer Res.* **48**, 235-245.
- LIPKIN, M. UND HIGGINS, P.** (1988) Biological markers of cell proliferation and differentiation in human gastrointestinal diseases. *Adv. Cancer Res.* **50**, 1-24.
- LIPKIN, S.M., WANG, V., JACOBY, R., BANERJEE-BASU, S., BAXEVANIS, A.D., LYNCH, H.T., ELLIOTT, R.M. UND COLLINS, F.S.** (2000) MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat. Genet.* **24**, 27-35.
- LIU, B., PARSONS, R., PAPADOPOULOS, N., NICOLAIDES, N.C., LYNCH, H.T., WATSON, P., JASS, J.R., DUNLOP, M., WYLLIE, A., PELTOMAKI, P., DE LA CHAPELLE, C.A., HAMILTON, S.R., VOGELSTEIN, B. UND KINZLER, K.W.** (1996) Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat. Med.* **2**, 169-174.
- LOEB, L.A.** (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* **51**, 3075-3079.
- LOSI, L., RONCUCCI, L., DI GREGORIO, C., DE LEON, M.P. UND BENHATTAR, J.** (1996) K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J. Pathol.* **178**, 259-263.
- LUO, L., SALUNGA, R.C., GUO, H., BITTNER, A., JOY, K.C., GALINDO, J.E., XIAO, H., ROGERS, K.E., WAN, J.S., JACKSON, M.R. UND ERLANDER, M.G.** (1999) Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nature Medicine* **1**, 117-122.
- LYNCH, H.T. UND DE LA CHAPELLE, A.** (1999) Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J. Med. Genet.* **36**, 801-818.
- LYNCH, H.T., WATSON, P., LANSPA, S.J., MARCUS, J., SMYRK, T., FITZGIBBONS, R.J., KRIEGLER, M. UND LYNCH, J.F.** (1988) Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis. Colon Rectum* **31**, 439-444.
- MALKHOSYAN, S., RAMPINO, N., YAMAMOTO, H. UND PERUCHO, M.** (1996) Frameshift mutator mutations. *Nature* **382**, 499-500.
- MARKOWITZ, S., WANG, J., MYEROFF, L., PARSONS, R., SUN, L., LUTTERBAUGH, J., FAN, R.S., ZBOROWSKA, E., KINZLER, K.W. UND VOGELSTEIN, B.** (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* **268**, 1336-1338.

- MARSHALL, C.J.** (1991) Tumor suppressor genes. *Cell* **64**, 313-326.
- MARTIN, L., ASSEM, M. UND PIARD, F.** (1999) Are there several types of colorectal carcinomas? Correlations with genetic data. *Eur. J. Cancer Prev.* **8**, 13-20.
- MASUTANI, C., SUGASAWA, K., YANAGISAWA, J., SONOYAMA, T., UI, M., ENOMOTO, T., TAKIO, K., TANAKA, K., SPEK, P.V., BOOTSMA, D., HOEIJMAKERS, J.H. UND HANAOKA, F.** (1994) Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *EMBO J.* **13**, 1831-1843.
- MATHIEU-DAUDE, F., WELSH, J., VOGT, T. UND MCCLELLAND, M.** (1996) DNA rehybridization during PCR: the 'Cot effect' and its consequences. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2080-2086.
- MCCLELLAND, M., CHADA, K., WELSH, J. UND RALPH, D.** (1993) in: Pena, S.D., Charkraborty, R., Epplen, J.T. und Jeffereys, A.J. (eds.), DNA fingerprinting: state of the science. Birkhauser Verlag, Basel.
- MCCLELLAND, M., HONEYCUTT, R., MATHIEU-DAUDE, F., VOGT, T. UND WELSH, J.** (1997) Fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *Methods Mol. Biol.* **85**, 13-24.
- MCCLELLAND, M., MATHIEU-DAUDE, F. UND WELSH, J.** (1995) RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet.* **11**, 242-246.
- MCCLELLAND, M. UND WELSH, J.** (1994) RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *PCR Methods Appl.* **4**, S66-S81.
- MIYOSHI, Y., NAGASE, H., ANDO, H., HORII, A., ICHII, S., NAKATSURU, S., AOKI, T., MIKI, Y., MORI, T. UND NAKAMURA, Y.** (1992) Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 229-233.
- MUTO, T., BUSSEY, H.J. UND MORSON, B.C.** (1975) The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* **36**, 2251-2270.
- NEUMANN, E., KULLMANN, F., JUDEX, M., JÜSTEN, H.P., WESSINGHAGE, D., GAY, S., SCHÖLMECH, J. UND MÜLLER-LADNER, U.** (2001) Identification of differentially expressed genes in rheumatoid arthritis by a combination of cDNA array and RAP-PCR. *Arthritis Rheum.* (in press).
- NG, P.W., PORTER, A.G. UND JANICKE, R.U.** (1999) Molecular cloning and characterization of two novel pro-apoptotic isoforms of caspase-10. *J. Biol. Chem.* **274**, 10301-10308.
- NOTTERMAN, D.A., ALON, U., SIERK, A.J. UND LEVINE, A.J.** (2001) Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res.* **61**, 3124-3130.
- NOWELL, P.C.** (1986) Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* **46**, 2203-2207.

- NUCCI, M.R., ROBINSON, C.R., LONGO, P., CAMPBELL, P. UND HAMILTON, S.R.** (1997) Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum. Pathol.* **28**, 1396-1407.
- OGATA, M., SAWADA, M., KOSUGI, A. UND HAMAOKA, T.** (1994) Developmentally regulated expression of a murine receptor-type protein tyrosine phosphatase in the thymus. *J. Immunol.* **153**, 4478-4487.
- OH, J.J., GROSSHANS, D.R., WONG, S.G. UND SLAMON, D.J.** (1999) Identification of differentially expressed genes associated with HER-2/neu overexpression in human breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4008-4017.
- OTORI, K., KONISHI, M., SUGIYAMA, K., HASEBE, T., SHIMODA, T., KIKUCHI-YANOSHITA, R., MUKAI, K., FUKUSHIMA, S., MIYAKI, M. UND ESUMI, H.** (1998) Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. *Cancer* **83**, 896-900.
- OTORI, K., SUGIYAMA, K., HASEBE, T., FUKUSHIMA, S. UND ESUMI, H.** (1995) Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. *Cancer Res.* **55**, 4743-4746.
- PANAGOPOULOS, I., PANDIS, N., THELIN, S., PETERSSON, C., MERTENS, F., BORG, A., KRISTOFFERSSON, U., MITELMAN, F. UND AMAN, P.** (1996) The FHIT and PTPRG genes are deleted in benign proliferative breast disease associated with familial breast cancer and cytogenetic rearrangements of chromosome band 3p14. *Cancer Res.* **56**, 4871-4875.
- PANDEY, S. UND WANG, E.** (1995) Cells en route to apoptosis are characterized by the upregulation of c-fos, c-myc, c-jun, cdc2, and RB phosphorylation, resembling events of early cell-cycle traverse. *J. Cell Biol.* **58**, 135-150.
- PAULSEN, J.E., STEFFENSEN, I.L., NAMORK, E. UND ALEXANDER, J.** (1994) Scanning electron microscopy of aberrant crypt foci in rat colon. *Carcinogenesis* **15**, 2371-2373.
- PELES, E., NATIV, M., CAMPBELL, P.L., SAKURAI, T., MARTINEZ, R., LEV, S., QLARY, D.O., SCHILLING, J., BARNEA, G. UND PLOWMAN, G.D.** (1995) The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell* **82**, 251-260.
- PERREAULT, N., VACHON, P.H. UND BEAULIEU, J.F.** (1995) Appearance and distribution of laminin A chain isoforms and integrin alpha 2, alpha 3, alpha 6, beta 1, and beta 4 subunits in the developing human small intestinal mucosa. *Anat. Rec.* **242**, 242-250.
- PERUCHO, M.** (1996) Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *J. Biol. Chem.* **377**, 675-684.
- PITTERLE, D.M., JOLICOEUR, E.M. UND BEPLER, G.** (1998) Hot spots for molecular genetic alterations in lung cancer. *In Vivo* **12**, 643-658.

- POLYAK, K., HAMILTON, S.R., VOGELSTEIN, B. UND KINZLER, K.W.** (1996) Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. *Am. J. Pathol.* **149**, 381-387.
- POTTEN, C.S.** (1998) Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **353**, 821-830.
- POTTEN, C.S. UND ALLEN, T.D.** (1977) Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa. *J. Ultrastruct. Res.* **60**, 272-277.
- POTTEN, C.S., BOOTH, C. UND PRITCHARD, D.M.** (1997b) The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int. J. Exp. Pathol.* **78**, 219-243.
- POTTEN, C.S., WILSON, J.W. UND BOOTH, C.** (1997a) Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells* **15**, 82-93.
- PRETLOW, T.P.** (1995) Aberrant crypt foci and K-ras mutations: earliest recognized players or innocent bystanders in colon carcinogenesis? *Gastroenterology* **108**, 600-603.
- PRETLOW, T.P., BARROW, B.J., ASHTON, W.S., O'RIORDAN, M.A., PRETLOW, T.G., JURCISEK, J.A. UND STELLATO, T.A.** (1991) Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.* **51**, 1564-1567.
- PRETLOW, T.P., BRASITUS, T.A., FULTON, N.C., CHEYER, C. UND KAPLAN, E.L.** (1993) K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 2004-2007.
- PRETLOW, T.P., O'RIORDAN, M.A., PRETLOW, T.G. UND STELLATO, T.A.** (1992) Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions. *J. Cell Biochem. Suppl.* **16G**, 55-62.
- PRETLOW, T.P., ROUKHADZE, E.V., O'RIORDAN, M.A., CHAN, J.C., AMINI, S.B. UND STELLATO, T.A.** (1994) Carcinoembryonic antigen in human colonic aberrant crypt foci. *Gastroenterology* **107**, 1719-1725.
- PURDIE, C.A., O'GRADY, J., PIRIS, J., WYLLIE, A.H. UND BIRD, C.C.** (1991) p53 expression in colorectal tumors. *Am. J. Pathol.* **138**, 807-813.
- RAITANO, A.B. UND KORC, M.** (1993) Growth inhibition of a human colorectal carcinoma cell line by interleukin 1 is associated with enhanced expression of gamma- interferon receptors. *Cancer Res.* **53**, 636-640.
- RALPH, D., WELSH, J. UND MCCLELLAND, M.** (1993) RNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR identifies differentially regulated RNAs in mink lung (Mv1Lu) cells growth arrested by transforming growth factor beta 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10710-10714.

- RAMPINO, N., YAMAMOTO, H., IONOV, Y., LI, Y., SAWAI, H., REED, J.C. UND PERUCHO, M. (1997) Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275**, 967-969.
- RONCUCCI, L., MODICA, S., PEDRONI, M., TAMASSIA, M.G., GHIDONI, M., LOSI, L., FANTE, R., DI GREGORIO, C., MANENTI, A., GAFA, L. UND PONZ, D.L. (1998) Aberrant crypt foci in patients with colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **77**, 2343-2348.
- RONCUCCI, L., PEDRONI, M., FANTE, R., DI GREGORIO, C. UND PONZ, D.L. (1993) Cell kinetic evaluation of human colonic aberrant crypts. *Cancer Res.* **53**, 3726-3729.
- RONCUCCI, L., STAMP, D., MEDLINE, A., CULLEN, J.B. UND BRUCE, W.R. (1991) Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum. Pathol.* **22**, 287-294.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. UND ERLICH, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S.J., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. UND ARNHEIM, N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- SALINOVICH, O. UND MONTELARO, R.C. (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **156**, 341-347.
- SANGER, F., NICKLEN, S. UND COULSON, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- SAVONET, V., MAENHAUT, C., MOT, F. UND PIRSON, I. (1997) Pitfalls in the use of several "housekeeping" genes as standards for quantitation of mRNA: the example of thyroid cells. *Anal. Biochem.* **247**, 165-167.
- SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R.W. UND BROWN, P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
- SCHMIEGEL, W., ADLER, G., FRÜHMORGEN, P., FÖLSCH, U., GRAEVEN, U., LAYER, P., PETRASCH, S., PORSCHEN, R., FOX, C., SAUERBRUCH, T., SCHMOLL, H.-P. UND ZEITZ, M. (1999) Das kolorektale Karzinom: Prävention, Diagnostik, Nachsorge und medikamentöse Therapie - Ergebnisse einer interdisziplinären Konsensuskonferenz, Bochum, Januar 1999. *Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten / Arbeitsgemeinschaft für Gastroenterologische Onkologie*.
- SCHUTZE, K. UND LAHR, G. (1998) Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells. *Nat. Biotechnol.* **16**, 737-742.

- SCHWARTZ, S., YAMAMOTO, H., NAVARRO, M., MAESTRO, M., REVENTOS, J. UND PERUCHO, M.** (1999) Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res.* **59**, 2995-3002.
- SEHGAL, A., BOYNTON, A.L., YOUNG, R.F., VERMEULEN, S.S., YONEMURA, K.S., KOHLER, E.P., ALDAPE, H.C., SIMRELL, C.R. UND MURPHY, G.P.** (1998) Application of the differential hybridization of Atlas Human expression arrays technique in the identification of differentially expressed genes in human glioblastoma multiforme tumor tissue. *J. Surg. Oncol.* **67**, 234-241.
- SGROI, D.C., TENG, S., ROBINSON, G., LEVANGIE, R., HUDSON, J.R. UND ELKAHLOUN, A.G.** (1999) In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res.* **59**, 5656-5661.
- SHAMSUDDIN, A.K., WEISS, L., PHELPS, P.C. UND TRUMP, B.F.** (1981) Colon epithelium. IV. Human colon carcinogenesis. Changes in human colon mucosa adjacent to and remote from carcinomas of the colon. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 413-419.
- SHANMUGATHASAN, M. UND JOTHY, S.** (2000) Apoptosis, anoikis and their relevance to the pathobiology of colon cancer. *Pathol. Int.* **50**, 273-279.
- SHIVAPURKAR, N., HUANG, L., RUGGERI, B., SWALSKY, P.A., BAKKER, A., FINKELSTEIN, S., FROST, A. UND SILVERBERG, S.** (1997) K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett.* **115**, 39-46.
- SHPITZ, B., BOMSTEIN, Y., MEKORI, Y., COHEN, R., KAUFMAN, Z., GRANKIN, M. UND BERNHEIM, J.** (1997) Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci, hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon. *Am. J. Surg.* **174**, 425-430.
- SHPITZ, B., BOMSTEIN, Y., MEKORI, Y., COHEN, R., KAUFMAN, Z., NEUFELD, D., GALKIN, M. UND BERNHEIM, J.** (1998) Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics. *Hum. Pathol.* **29**, 469-475.
- SIMONE, N.L., BONNER, R.F., GILLESPIE, J.W., EMMERT-BUCK, M.R. UND LIOTTA, L.A.** (1998) Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet.* **14**, 272-276.
- SIU, I.M., PRETLOW, T.G., AMINI, S.B. UND PRETLOW, T.P.** (1997) Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. *Am. J. Pathol.* **150**, 1805-1813.
- SIU, I.M., ROBINSON, D.R., SCHWARTZ, S., KUNG, H.J., PRETLOW, T.G., PETERSEN, R.B. UND PRETLOW, T.P.** (1999) The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci. *Cancer Res.* **59**, 63-66.
- SMITH, A.J., STERN, H.S., PENNER, M., HAY, K., MITRI, A., BAPAT, B.V. UND GALLINGER, S.** (1994) Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res.* **54**, 5527-5530.

- SOUZA, R.F., APPEL, R., YIN, J., WANG, S., SMOLINSKI, K.N., ABRAHAM, J.M., ZOU, T.T., SHI, Y.Q., LEI, J., COTTRELL, J., CYMES, K., BIDEN, K., SIMMS, L., LEGGETT, B., LYNCH, P.M., FRAZIER, M., POWELL, S.M., HARPAZ, N., SUGIMURA, H., YOUNG, J. UND MELTZER, S.J.** (1996) Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat. Genet.* **14**, 255-257.
- SPARKES, R.S., SPARKES, M.C., WILSON, M.G., TOWNER, J.W., BENEDICT, W., MURPHREE, A.L. UND YUNIS, J.J.** (1980) Regional assignment of genes for human esterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14. *Science* **208**, 1042-1044.
- SRINIVASAN, R.** (1986) Ablation of polymers and biological tissue by ultraviolet lasers. *Science* **234**, 559-565.
- STREIT, M., RICCARDI, L., VELASCO, P., BROWN, L.F., HAWIGHORST, T., BORNSTEIN, P. UND DETMAR, M.** (1999) Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14888-14893.
- SUAREZ-QUIAN, C.A., GOLDSTEIN, S.R., POHIDA, T., SMITH, P.D., PETERSON, J.I., WELLNER, E., GHANY, M. UND BONNER, R.F.** (1999) Laser capture microdissection of single cells from complex tissues. *Biotechniques* **26**, 328-335.
- SUGARBAKER, J.P., GUNDERSON, L.L. UND WITTES, R.E.** (1985) Colorectal cancer. In: DeVita VT, Hellman S und Rosenberg SA (eds.), *Cancer: Principles and Practices of Oncology*. Lippincott, Philadelphia, 800-883.
- SUTHERLAND, F., HAINE, L. UND QUIRKE, P.** (1998) Molecular approaches to colorectal cancer: a review. *Current Diagnostic Pathology* **5**, 34-43.
- TAKAYAMA, T., KATSUKI, S., TAKAHASHI, Y., OHI, M., NOJIRI, S., SAKAMAKI, S., KATO, J., KOGAWA, K., MIYAKE, H. UND NIITSU, Y.** (1998) Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1277-1284.
- TAM, A.S., FOLEY, J.F., DEVEREUX, T.R., MARONPOT, R.R. UND MASSEY, T.E.** (1999) High frequency and heterogeneous distribution of p53 mutations in aflatoxin B1-induced mouse lung tumors. *Cancer Res.* **59**, 3634-3640.
- TANAKA, M., OMURA, K., WATANABE, Y., ODA, Y. UND NAKANISHI, I.** (1994) Prognostic factors of colorectal cancer: K-ras mutation, overexpression of the p53 protein, and cell proliferative activity. *J. Surg. Oncol.* **57**, 57-64.
- TOKUNAGA, T., NAKAMURA, M., OSHIKA, Y., ABE, Y., OZEKI, Y., FUKUSHIMA, Y., HATANAKA, H., SADAHIRO, S., KIJIMA, H., TSUCHIDA, T., YAMAZAKI, H., TAMAOKI, N. UND UEYAMA, Y.** (1999) Thrombospondin 2 expression is correlated with inhibition of angiogenesis and metastasis of colon cancer. *Br. J. Cancer* **79**, 354-359.
- TONKS, N. UND NEEL, B.G.** (1996) From Form to Function: Signaling by Protein Tyrosine Phosphatases. *Cell* **87**, 365-368.

- TORTOLA, S., CAPELLA, G., MARCUELLO, E., GUNTHER, K., AZA, G., MASRAMON, L., REYMOND, M.A. UND PEINADO, M.A.** (1998) Analysis of differential gene expression in human colorectal tumor tissues by RNA arbitrarily primed-PCR: a technical assessment. *Lab. Invest.* **78**, 309-317.
- TRENKLE, T., WELSH, J., JUNG, B., MATHIEU-DAUDE, F. UND MCCLELLAND, M.** (1998) Non-stoichiometric reduced complexity probes for cDNA arrays. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3883-3891.
- TRENKLE, T., WELSH, J. UND MCCLELLAND, M.** (1999) Differential display probes for cDNA arrays. *Biotechniques* **27**, 554-60, 562, 564.
- TROWBRIDGE, I.S. UND THOMAS, M.L.** (1994) CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 85-116.
- TSUNODA, T., NAKAMURA, T., ISHIMOTO, K., YAMAUE, H., TANIMURA, H., SAIJO, N. UND NISHIO, K.** (2001) Upregulated expression of angiogenesis genes and down regulation of cell cycle genes in human colorectal cancer tissue determined by cDNA macroarray. *Anticancer Res.* **21**, 137-143.
- TUDEK, B., BIRD, R.P. UND BRUCE, W.R.** (1989) Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res.* **49**, 1236-1240.
- ULLRICH, A. UND SCHLESSINGER, J.** (1990) Signal Transduction by Receptors with Tyrosine Kinase Activity. *Cell* **61**, 203-212.
- UMAR, A., BOYER, J.C., THOMAS, D.C., NGUYEN, D.C., RISINGER, J.I., BOYD, J., IONOV, Y., PERUCHO, M. UND KUNKEL, T.A.** (1994) Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability. *J. Biol. Chem.* **269**, 14367-14370.
- USUI, H., ICHIKAWA, T., MIYAZAKI, Y., NAGAI, S. UND KUMANISHI, T.** (1996) Isolation of cDNA clones of the rat mRNAs expressed preferentially in the prenatal stages of brain development. *Dev. Brain Res.* **97**, 185-193.
- VAN NIEKERK, C.C. UND POELS, L.G.** (1999) Reduced expression of protein tyrosine phosphatase gamma in lung and ovarian tumors. *Cancer Lett.* **137**, 61-73.
- VASEN, H.F.** (1994) What is hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Anticancer Res.* **14**, 1613-1615.
- VELCULESCU, V.E., ZHANG, L., VOGELSTEIN, B. UND KINZLER, K.W.** (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484-487.
- VOGELSTEIN, B., FEARON, E.R., HAMILTON, S.R., KERN, S.E., PREISINGER, A.C., LEPPERT, M., NAKAMURA, Y., WHITE, R., SMITS, A.M. UND BOS, J.L.** (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* **319**, 525-532.

- WANG, Q., DING, Q., DONG, Z., EHLERS, R.A. UND EVERS, B.M.** (2000) Downregulation of mitogen-activated protein kinases in human colon cancers. *Anticancer Res.* **20**, 75-83.
- WELSH, J., CHADA, K., DALAL, S.S., CHENG, R., RALPH, D. UND MCCLELLAND, M.** (1992) Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4965-4970.
- WELSH, J. UND MCCLELLAND, M.** (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213-7218.
- WICKING, C., SIMMS, L.A., EVANS, T., WALSH, M., CHAWENSAKSOPHAK, K., BECK, F., CHENEVIX-TRENCH, G., YOUNG, J., JASS, J., LEGGETT, B. UND WAINWRIGHT, B.** (1998) CDX2, a human homologue of *Drosophila* caudal, is mutated in both alleles in a replication error positive colorectal cancer. *Oncogene* **17**, 657-659.
- WONG, W.M. UND WRIGHT, N.A.** (1999) Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. *J. Clin. Pathol.* **52**, 321-333.
- WYSCHKONY, I.** (2000) Untersuchung der Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor-Typ γ in der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms. *Zulassungsarbeit*, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universität Regensburg.
- YAMASHITA, N., MINAMOTO, T., OCHIAI, A., ONDA, M. UND ESUMI, H.** (1995a) Frequent and characteristic K-ras activation and absence of p53 protein accumulation in aberrant crypt foci of the colon. *Gastroenterology* **108**, 434-440.
- YAMASHITA, N., MINAMOTO, T., OCHIAI, A., ONDA, M. UND ESUMI, H.** (1995b) Frequent and characteristic K-ras activation in aberrant crypt foci of colon. Is there preference among K-ras mutants for malignant progression? *Cancer* **75**, 1527-1533.
- YOSHITAKA, T., MATSUBARA, N., KEDA, M., TANINO, M., HANAFUSA, H., TANAKA, N. UND SHIMIZU, K.** (1996) Mutations of E2F-4 trinucleotide repeats in colorectal cancer with microsatellite instability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**, 553-557.
- ZONDAG, G.C., KONINGSTEIN, G.M., JIANG, Y.P., SAP, J., MOOLENAAR, W.H. UND GEBBINK, M.F.** (1995) Homophilic interactions mediated by receptor tyrosine phosphatases mu and kappa. A critical role for the novel extracellular MAM domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 14247-14250.
- ZOR, T. UND SELIGER, Z.** (1996) Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* **236**, 302-308.

Anhang 1:**Publikationen/Originalarbeiten:**

Lechner, S., Müller-Ladner, U., Neumann, E., Dietmaier, W., Welsh, J., Schölmerich, J., Rüschoff, J. und Kullmann, F. (2001) Use of simplified transcriptors for the analysis of gene expression profiles in laser-microdissected cell populations. *Lab. Invest.* **81**, 1233-1242.

Kullmann, F., Judex, M., Edelmann, I., Lechner, S., Jüsten, H.P., Green, D.R., Wessinghage, D., Firestein, G.S., Gay, S., Schölmerich, J. und Müller-Ladner, U. (2001) Analysis of the *p53* tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis (RA) synovial fibroblasts. *Rev. Series Rheumatol.* **1**, 18-20.

Maurice, M.M., Nakamura, H., Gringhuis, S., Okamoto, T., Yoshida, S., Kullmann, F., Lechner, S., van der Voort, E.A., Leow, A., Versendaal, J., Müller-Ladner, U., Yodoi, J., Tak, P.P., Breedveld, F.C. und Verweij, C.L. (1999) Expression of the thioredoxin-thioredoxin reductase system in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **42**, 2430-2439.

Kullmann, F., Judex, M., Neudecker, I., Lechner, S., Jüsten, H.P., Green, D.R., Wessinghage, D., Firestein, G.S., Gay, S., Schölmerich, J. und Müller-Ladner, U. (1999) Analysis of the *p53* tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **42**, 1594-1600.

Lechner, S., Müller-Ladner, U., Schlottmann, K., Jung, B., Benzing, C., McClelland, M., Rüschoff, J., Welsh, J., Schölmerich, J. und Kullmann, F. Bile acids mimic oxidative stress-induced upregulation of thioredoxin-reductase in gastric and colon cancer cells. *Carcinogenesis* (in Revision).

Kullmann, F. und Lechner, S., Müller-Ladner, U., Spöttl, T., Schlottmann, K., Rüschoff, J. und Schölmerich, J. Thioredoxin reductase expression in colon cancer: discrepancy between *in vivo* and *in vitro* findings. *Oncogene* (eingereicht).

Neumann, E. und Lechner, S., Kullmann, F., Gay, S., Rüschoff, J., Renke, B., Schölmerich, J., Müller-Ladner, U. (2001) Evaluation of differentially expressed genes by a combination of cDNA array and RAP-PCR using the AtlasImageTM 2.0 software. *BioTechniques* (eingereicht)

Lechner, S., Müller-Ladner, U., Renke, B., Rüschoff, J., Schölmerich, J. und Kullmann, F. Gene expression profiling of preneoplastic lesions in colon carcinogenesis. (Manuskript in Vorbereitung).

Lechner, S., Müller-Ladner, U., Renke, B., Rüschoff, J., Schölmerich, J. und Kullmann, F. Identification of protein-tyrosine-phosphatase receptor-type gamma as a candidate gene in colon carcinogenesis. (Manuskript in Vorbereitung).

Posterbeiträge auf Kongressen 2001:

Lechner, S., Müller-Ladner, U., Neumann, E., Welsh, J., Schölmerich, J., Rüschoff, J. und Kullmann, F. (2001) Identification of differentially expressed genes along the normal colonic crypt – the basis to understand malignant transformation. UEGW, Amsterdam 2001, Book of Abstracts.

Lechner, S., Müller-Ladner, U., Judex, M., Renke, B., Schölmerich, J., Rüschoff, J. und Kullmann, F. (2001) Expression des Zentromer-assoziierten Protein E (CENP-E) in mikrosatellitenstabilen und -instabilen kolorektalen Karzinomen. 56. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, September 2001, Münster.

Lechner, S., Müller-Ladner, U., Renke, B., Rüschoff, J., Schölmerich, J. und Kullmann, F. (2001) Identifizierung der differentiell exprimierten Rezeptor-Typ-Protein-Tyrosin-Phosphatase-Gamma beim kolorektalen Karzinom. 56. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, September 2001, Münster.

Kullmann, F., Lechner, S., Müller-Ladner, U., Neumann, E., Rüschoff, J. und Schölmerich, J. (2001) Identifikation des Genexpressionsmusters innerhalb der normalen Kolonkrypte – die Basis um maligne Transformation zu verstehen. 13. AGO Winterkurs, 2001, Halle, Book of Abstracts.

Posterbeiträge auf Kongressen 2000:

Lechner, S., Ballhorn, W., Müller-Ladner, U., Benzing, C., Schölmerich, J., Rüschoff, J. und Kullmann, F. (2000) Localization of thioredoxin reductase mRNA in colorectal cancer tissue by *in situ* hybridization. 6. AGO Winterkurs, 11.-12. Februar 2000, Regensburg, *Z. Gastroenterol.* **38**, 519.

Lechner, S., Benzing, C., Müller-Ladner, U., Welsh, J., McClelland, M., Schölmerich, J., Rüschoff, J. und Kullmann, F. (2000) Identification and isolation of differentially expressed genes from very few cells or small colonic tissue samples by RNA fingerprinting (RAP-PCR) combined with laser-capture microdissection. 6. AGO Winterkurs, 11.-12. Februar 2000, Regensburg, *Z. Gastroenterol.* **38**, 519.

Lechner, S., Wyschkony, I., Müller-Ladner, U., Benzing, C., Rüschoff, J., Schölmerich, J. und Kullmann, F. (2000) Identifizierung der differentiell exprimierten Rezeptor-Typ-Protein-Tyrosin-Phosphatase-Gamma: ein potentielles Tumorsuppressorgen bei Kolontumoren. 106. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 29. April – 3. Mai 2000, Wiesbaden, *Med. Klinik*, **95** (Suppl. 1), 70.

Lechner, S., Benzing, C., Müller-Ladner, U., Welsh, J., McClelland, M., Schölmerich, J., Rüschoff, J. und Kullmann, F. (2000) Identification and isolation of differentially expressed genes from very few cells or small colonic tissue samples by RNA fingerprinting (RAP-PCR) combined with laser-capture microdissection. 101st Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, 21.-24. Mai 2000, *Gastroenterology*, **118** (Suppl. 2), A278.

Lechner, S., Ballhorn, W., Müller-Ladner, U., Benzing, C., Schölmerich, J., Bataille, J., Rüschoff, J. und Kullmann, F. (2000) Localization of thioredoxin reductase mRNA in colorectal cancer tissue by *in situ* hybridization. 101st Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, 21.-24. Mai 2000, *Gastroenterology*, **118** (Suppl. 2), A1396.

Kullmann, F., Lechner, S., Schlottmann, K., Müller-Ladner, U. und Schölmerich, J. (2000) Secondary bile salts modulate expression of thioredoxin reductase in response to oxidative stress in colonic epithelial cells. 101st Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, 21.-24. Mai 2000, *Gastroenterology*, **118** (Suppl. 2), A1395.

Wyschkony, I., Lechner, S., Müller-Ladner, U., Benzing, C., Schölmerich, J., Rüschoff, J. und Kullmann, F. (2000) Protein-tyrosine phosphatase receptor-type gamma mRNA is absent in colon and gastric cancer cell lines. 6. AGO Winterkurs, 11.-12. Februar 2000, Regensburg, *Z. Gastroenterol.* **38**, 519.

Wyschkony, I., Lechner, S., Müller-Ladner, U., Benzing, C., Schölmerich, J., Rüschoff, J. und Kullmann, F. (2000) Protein-tyrosine phosphatase receptor-type gamma mRNA is absent in colon and gastric cancer cell lines. 101st Annual Meeting of the American Gastroenterological Association, 21.-24. Mai 2000, *Gastroenterology*, **118** (Suppl. 2), A278.

Posterbeiträge auf Kongressen 1999:

- Lechner, S., Müller-Ladner, U., Schlottmann, K., Jung, B., Benzing, C., McClelland, M., Welsh, J., Schölmerich, J. und Kullmann, F. (1999) Bile acids mimic oxidative stress-induced upregulation of thioredoxin-reductase in gastric and colon cancer cells. 100th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association (AGA), 16.-19. Mai 1999, Orlando, Florida. *Gastroenterology* **114** (Suppl.), G1952.
- Lechner, S., Müller-Ladner, U., McClelland, M., Welsh, J., Schölmerich, J. und Kullmann, F. (1999) Gallensäure-induzierte Hochregulierung der Thioredoxinreduktase in Magen- und Kolonkarzinomzellen. 54. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 22.-25. September 1999, Leipzig, *Z. Gastroenterol.* **37**, A916.
- Kullmann, F., Lechner, S., Müller-Ladner, U., Benzing, C. und Schölmerich, J. (1999) Identification of receptor-type protein tyrosine phosphatase γ , a potential tumor suppressor gene differentially expressed in colon cancer. *Gastroenterology* **114** (Suppl.), G1951.
- Judex, M., Lechner, S., Neumann, E., Jüsten, H.-P., Wessinghage, D., Gay, S., Firestein, G.S., Schölmerich, J., Kullmann, F. und Müller-Ladner, U. (1999) Analyse des *p53* Tumor Suppressor Gens in synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Regionaltagung der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 16.-18. September 1999, Rostock. *Z. Rheumatol.* **58** (Suppl. 1), 40.
- Judex, M., Kullmann, F., Lechner, S., Neumann, E., Jüsten, H.-P., Gay, S., Wessinghage, D., Schölmerich, J. und Müller-Ladner, U. (1999) Expression und Regulation von CENP-E in Synovium und synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Regionaltagung der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 16.-18. September 1999, Rostock. *Z. Rheumatol.* **58** (Suppl. 1), 42.
- Müller-Ladner, U., Kullmann, F., Lechner, S., Judex, M., Ballhorn, W., Gay, S., Breedveld, J., Schölmerich, J. und Verweij, C.L. (1999) Das Thioredoxin-Thioredoxinreduktase-System im Synovium und synovialen Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Regionaltagung der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 16.-18. September 1999, Rostock. *Z. Rheumatol.* **58** (Suppl. 1), 33.

Anhang 2:

Charakteristika der Kolontumoren (inklusive der Gewebebezeichnungen von Normal und Tumor), die für *ptprg*-Expressionsuntersuchungen zur Verfügung standen. Die Reihenfolge entspricht der in Abbildung 6.

Probenbezeichnung (N-T)	Mikrosatellitenstatus
13-8	MIN (erblich)
22-38	MIN (erblich?)
14-11	MIN (sporadisch)
18-1	MIN (sporadisch?)
16-9	MSS mit LOH im APC-Gen
29-45	MSS mit LOH im APC-Gen
37-53	MSS
17-2	MSS
23-39	MSS
19-7	MSS
20-3	MSS
24-40	MSS
21-4	MSS
25-41	MSS
26-42	MSS
30-46	MSS
31-47	MSS
32-48	MSS
36-52	MSS

Anhang 3: Dysregulierte Gene: normale (N) versus D1-adenomatöse (A) Kolonkrypten

Patient 1 (11037)

	Code	N Mittelwert	SD	A Mittelwert	SD	Protein/Gen
Hochregulierung	A4d	5,5	2,5	44	1	CDC37 homolog
	A4k	37	13	103,5	35,5	mitogen-activated protein kinase p38 (MAP kinase p38); cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein; MAX-interacting protein 2
	B6h	26,5	6,5	121	16	met proto-oncogene; hepatocyte growth factor receptor precursor
	C1a	36,5	17,5	160,5	54,5	DNA-dependent protein kinase + DNA-PK catalytic subunit
	C1n	32,5	1,5	84	8	DNA topoisomerase II alpha
	C5a	4	3	60	7	5T4 oncofetal antigen precursor
	D2h	76	3	332,5	99,5	laminin beta 1 subunit precursor
	D3j	9	0	55,5	4,5	platelet membrane glycoprotein IA precursor; collagen receptor; integrin alpha 2; very late antigen-2 alpha subunit; CD49B antigen
	D3n	437	3	985	88	integrin alpha 6 precursor; VLA6; CD49F antigen
	D6d	13,5	1,5	77,5	0,5	semaphorin III
	E4d	17	1	41,5	1,5	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; p21-rac1; ras-like protein TC25
	E6c	191	4	413	35	beta catenin
	F1f	1	1	69	1	BIGH3
	F3l	36,5	11,5	103	32	hepatoma-derived growth factor
F6a	9,5	1,5	153,5	12,5	glia-derived neurite-promoting factor	
Herunterregulierung	A2f	109	31	7,5	1,5	cell division protein kinase 9 (CDK9); serine/threonine protein kinase PITALRE
	A7c	49,5	4,5	11,5	2,5	type I cytoskeletal 19 keratin; cytokeratin 19
	B6k	428,5	161,5	79	11	BRCA1-associated ring domain protein
	D3d	237,5	25,5	28,5	2,5	thrombospondin 2 precursor
	E2m	87	8	34	0	urokinase-type plasminogen activator receptor GPI-anchored form precursor; monocyte activation antigen MO3; CD87 antigen

Patient 2 (2954)

Anmerkung: Array mit normalen Kolonkrypten mit nur wenigen Hybridisierungsereignissen

	Code	N Mittelwert	SD	A Mittelwert	SD	Protein/Gen
	E4d	29,5	11,5	133,3	11,6	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; p21-rac1; ras-like protein TC25
	F7l	69,5	19,5	196,3	41,1	interferon gamma receptor (IFNGR)
	C1m	881,5	37,5	710,3	720,3	DNA topoisomerase I (TOP1)

Patient 3 (22499)

	Code	N Mittelwert	SD	A Mittelwert	SD	Protein/Gen
Hochregulierung	A2h	10,7	7,9	569,2	691,8	cdc2-related protein kinase PISSLRE
	A4k	74,3	55,9	245	116,4	mitogen-activated protein kinase p38 (MAP kinase p38); cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein; MAX-interacting protein 2
	A6a	4,7	6,6	139,6	51,3	p33ING1
	B6k	28,7	31,8	74,4	51,4	BRCA1-associated ring domain protein
	E4d	74,3	37,3	255,2	169,4	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; p21-rac1; ras-like protein TC25
	E5a	488,7	475,3	432,8	284,0	rho GDP dissociation inhibitor 2
	E7b	91,7	129,6	53,2	38,1	desmocollin 3A/3B precursor + desmocollin 4
Herrunterregulierung	A7l	284,7	203,9	117,4	71,4	type II cytoskeletal 8 keratin (KRT8); cytokeratin 8 (K8; CK8)
	B6i	496,3	356,8	195,4	186,2	p53 cellular tumor antigen
	D3d	702,7	130,6	80,6	57,9	thrombospondin 2 precursor (THBS2; TSP2)
	E3d	212,7	87,1	54,2	31,5	alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein precursor (alpha-2-MRAP; A2MRAP); low density lipoprotein receptor-related protein- associated protein 1 (LRPAP1)

Patient 4 (23)

	Code	N Mittelwert	SD	A Mittelwert	SD	Protein/Gen
Hochregulierung	A1f	19	11	129,5	5,5	cell division protein kinase 6 (CDK6); serine/threonine protein kinase PLSTIRE
	A3e	5	3	147,5	41,5	cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A); melanoma differentiation-associated protein 6; CDK-interacting protein 1 (CIP1); WAF1
	A4d	5	3	102	29	CDC37 homolog
	A4g	1,5	1,5	50	0	extracellular signal-regulated kinase 3 (ERK3); MAP kinase 3 (MAPK3; p97-MAPK); PRKM5
	B6k	1	1	40,5	0,5	BRCA1-associated ring domain protein (BARD1)
	C1a	0	0	32,5	4,5	DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) + DNA-PK catalytic subunit (DNA-PKCS)
	C1m	6,5	0,5	42	0	DNA topoisomerase I (TOP1)
	C1n	0,5	0,5	57,5	8,5	DNA topoisomerase II alpha (TOP2A)
	C5g	1	1	66,5	9,5	epidermal growth factor receptor kinase substrate EPS8
	E4d	20	7	151,5	1,5	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; p21-rac1; ras-like protein TC25
	E5c	52	6	157	3	p21-activated kinase alpha (PAK-alpha; PAK1)
	E6c	10	4	276	8	beta catenin (CTNNB)
	E6g	14,5	1,5	46,5	0,5	EB1 protein

	Code	N Mittelwert	SD	A Mittelwert	SD	Protein/Gen
Herunterregulierung	B3m	2857,5	288,5	627	130	Fas-activated serine/threonine (FAST) kinase
	B6i	124,5	16,5	39	2	p53 cellular tumor antigen
	C2d	194	16	53,5	1,5	xeroderma pigmentosum group G complementing protein (XPG); DNA excision repair protein ERCC5
	D3n	1737,5	853,5	592,5	259,5	integrin alpha 6 precursor (ITGA6); VLA6; CD49F antigen
	E2m	86,5	11,5	3,5	0,5	urokinase-type plasminogen activator receptor GPI-anchored form precursor (U-PAR); monocyte activation antigen MO3; CD87 antigen
	F3l	67,5	2,5	9	0	hepatoma-derived growth factor (HDGF)

Patient 5 (3418)

	Code	N Mittelwert	SD	A Mittelwert	SD	Protein/Gen
Hochregulierung	A1f	2,3	2,1	28,0	13,6	cell division protein kinase 6 (CDK6); serine/threonine protein kinase PLSTIRE
	C2n	6,3	5,8	57,2	13,2	activator 1 40-kDa subunit; replication factor C 40-kDa subunit (RFC40); RFC2
	C5m	11,3	4,5	151,3	47,2	ERBB-3 receptor protein-tyrosine kinase precursor; epidermal growth factor receptor
	D2h	17,0	14,4	94,0	27,4	laminin beta 1 subunit precursor (laminin B1; LAMB1)
	D3n	4,7	3,3	241,0	82,6	integrin alpha 6 precursor (ITGA6); VLA6; CD49F antigen
	D5e	610,0	859,1	253,7	65,7	cytohesin-1; Sec7p-like protein
	D5f	10,0	12,1	93,7	29,9	CD9 antigen; p24; leukocyte antigen MIC3; motility-related protein (MRP-1)
	E5d	9,3	10,4	387,3	171,0	p21-activated kinase gamma (PAK-gamma; PAK2); PAK65; S6/H4 kinase
	F7l	48,0	37,3	176,3	42,5	interferon gamma receptor (IFNGR)
Herunterregulierung	A6a	314,0	37,2	33,2	9,5	p33ING1
	A7l	191,3	142,0	57,3	24,4	type II cytoskeletal 8 keratin (KRT8); cytokeratin 8 (K8; CK8)
	B3j	100,7	45,3	19,5	10,3	caspase-10 precursor (CASP10); ICE-LIKE apoptotic protease 4 (ICE-LAP4); apoptotic protease MCH4
	B3m	2631,3	519,0	265,3	62,1	Fas-activated serine/threonine (FAST) kinase
	B6i	234,0	170,8	8,3	7,8	p53 cellular tumor antigen
	D3d	170,7	110,5	17,5	7,1	thrombospondin 2 precursor (THBS2; TSP2)
	E6h	124,7	62,9	7,3	4,5	protocadherin 42 precursor (PCDH42)
	E6i	9,3	4,9	1,5	1,7	protocadherin 43 precursor (PCDH43)

Patient 6 (37467)

	Code	N Mittelwert	SD	A Mittelwert	SD	Protein/Gen
Hochregulierung	A3e	0,5	0,5	42,5	7,5	cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A); melanoma differentiation-associated protein 6 (MDA6); CDK-interacting protein 1 (CIP1); WAF1
	A4k	14,5	4,5	51	8	mitogen-activated protein kinase p38 (MAP kinase p38); cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein (CSAID binding protein; CSBP)
	C2k	2,5	1,5	38,5	4,5	replication factor C 36-kDa subunit (RFC36); activator 1 36-kDa subunit
	C5m	58,5	4,5	233,5	71,5	ERBB-3 receptor protein-tyrosine kinase precursor; epidermal growth factor receptor
	D2j	47	1	220,5	45,5	40S ribosomal protein SA (RPSA); 34/67-kDa laminin receptor (LAMR1); colon carcinoma laminin-binding protein; NEM/1CHD4
	E5a	8,5	2,5	204	25	rho GDP dissociation inhibitor 2 (RHO GDI2; RHO-GDI beta); LY-GDI; ARHGDI; GDID4
	F3l	6	1	47	14	hepatoma-derived growth factor (HDGF)
	F5f	24,5	5,5	169,5	22,5	interleukin-14 precursor (IL-14); high molecular weight B-cell growth factor (HMW-BCGF)
	F7l	31,5	5,5	127,5	21,5	interferon gamma receptor (IFNGR)
Herunterregulierung	A3m	32,5	3,5	2	0	NEDD5 protein homolog; DIFF6; KIAA0158
	A3n	56	9	1,5	0,5	CDC10 protein homolog
	A5l	263	74	5	1	transcription factor DP2 (Humdp2); E2F dimerization partner 2
	A6a	212	5	38	3	p33ING1
	B1j	57	21	1	0	BCL-2 binding athanogene-1 (BAG-1); glucocorticoid receptor-associated protein RAP46
	B3m	2255	42	902,5	38,5	Fas-activated serine/threonine (FAST) kinase
	B4g	69,5	16,5	6	1	death receptor 5 (DR5); cytotoxic TRAIL receptor 2
	B4j	76,5	9,5	1	0	RATS1
	B5b	67	2	0	0	glutathione-S-transferase (GST) homolog
	B6e	32,5	10,5	0	0	DNA mismatch repair protein MSH2
	B6k	137	29	18,5	5,5	BRCA1-associated ring domain protein (BARD1)
	E3m	58,5	14,5	0	0	rhoC (H9); small GTPase (rhoC)
	E6b	55	11	3	0	alpha-catenin related protein (CAPR); alpha 2 catenin (CTNNA2); alpha N-catenin
	E7b	33,5	5,5	0	0	desmocollin 3A/3B precursor + desmocollin 4
	E7i	154	16	14,5	4,5	ephrin type-A receptor 2 precursor; epithelial cell kinase (ECK); tyrosine-protein kinase receptor ECK
	F1j	40	1	0	0	bone morphogenetic protein 3B precursor (BMP3B); growth differentiation factor 10 (GDF10); bone inducing protein (BIP)
	F2k	49,5	8,5	0	0	fibroblast growth factor 3 (FGF3) ; INT2 proto-oncogene protein precursor; HBGF3
F4a	27,5	0,5	0	0	competitive hepatocyte growth factor antagonist (HGF antagonist)	
F6g	22	3	0,5	0,5	SDF1A; pre-B cell stimulating factor homolog	
F7g	58	8	1,5	0,5	interferon regulatory factor 1 (IRF1)	

BEDANKEN MÖCHTE ICH MICH BEI ...

... Herrn PD Dr. Frank Kullmann für die Betreuung der Arbeit. Seine zahlreichen Anregungen und seine Diskussionsbereitschaft waren mir stets eine große Hilfe. Motivierend war vor allem seine Begeisterungsfähigkeit für gelungene Experimente, sprich „wunderschöne“ Arrays. Danke für das Vertrauen in mich!

... Herrn PD Dr. Ulf Müller-Ladner für die herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die ständige Vermittlung seines immerwährenden Optimismus und seine Begeisterung für alles rund ums Labor.

... Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I erstellen zu können und die Möglichkeit, an zahlreichen Kongressen teilnehmen zu können.

... Herrn Prof. Dr. Stefan Schneuwly für die Bereitschaft, die fakultätsinterne Betreuung und Vertretung dieser Arbeit zu übernehmen.

... Herrn Prof. Dr. Werner Falk und Herrn Prof. Dr. Rainer Straub für so manch kritische Diskussion meiner Methoden und Ergebnisse in den Laborseminaren.

... Herrn Prof. Dr. Josef Rüschoff und seinen Laborleitern Dr. Birgit Renke und Dr. Kurt Beyser für die Bereitstellung von Geweben und RNAs sowie für die Möglichkeit in Kassel tage- und nächtelang zu lasern bis meine Augen viereckig waren.

... Olga, Chris und Georg für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

... Elena für viele gemeinsame Stunden im „heißesten“ Raum des Fobaus und so manch aufregende Hetzjagd nach Personalausweisen bzw. die einzigartige Gelegenheit eine Wohnung guten Gewissens zu verwüsten. Danke auch für das Korrekturlesen aller Abstrakte und Originalarbeiten.

... der A8-Labor-Crew András, André, Birgit, Christina, Dagmar, Gabi, Jörg, Martin F., Martin J., Rotraud, Sabine und Wibke für die gemeinsame Zeit in Raum 28 und die freundschaftliche Verbundenheit im stetigen Gezeitenwechsel zwischen Lust und Frust, Lastern und Lästern. Die fortwährenden Gefechte um den Platz an „Martins“ Computer (☺☺☺), die zünftigen Kaffee- und Teestunden, die vielen offenen Ohren für kleine und große Sorgen sowie so manche außerlaborliche Vergnügung (Kochen, Badminton, Cocktails, Einkaufen, ...) werden mir stets in Erinnerung bleiben.

... allen Mitarbeitern der Inneren Medizin I für die freundliche Aufnahme, die stete Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen, die ich mir holen durfte.

... Irith, Holger, Alex und der restlichen Badminton-Truppe für viele unvergessliche Freizeitvergnügungen und Eure Freundschaft.

... meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums, ihre Geduld mit mir und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

... Joschi, der meiner Karriere als „wissenschaftlicher Erlebniserzähler“ ein jähes Ende gesetzt hat (hihi!) und mich nun in den hohen Norden verpflanzen will. Danke für die wunderschöne gemeinsame Zeit in Regensburg! Und: Ich würde Dir ohne Bedenken eine Kachel aus meinem Ofen schenken!! HDSSL!