

Aus der Klinik für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie  
Campus Benjamin Franklin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung der Genexpression des G-Protein  
gekoppelten Rezeptors LGR5 beim kolorektalen  
Karzinom**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Moritz Robert Siedmann

aus Berlin

Datum der Promotion: 27.02.2015





# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
1.1 Abstrakt.....	6
1.2 Abstract.....	8
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>10</b>
2.1 Das kolorektale Karzinom.....	10
2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	10
2.1.2 Therapie und Prognose .....	13
2.1.3 Molekulare Pathogenese .....	16
2.2 Der Glykoprotein-gekoppelte Rezeptor (GPCR) LGR5.....	18
2.3 Der Wnt-Signaltransduktionsweg .....	20
2.4 Die Krebs-Stammzell Theorie .....	21
<b>3 Ziele der Arbeit</b> .....	<b>24</b>
<b>4 Material</b> .....	<b>26</b>
4.1 Chemikalien .....	26
4.2 Lösungen und Puffer .....	29
4.3 Primer .....	31
4.4 Antikörper .....	32
4.5 Geräte.....	32
4.6 Verbrauchsmaterialien .....	34
4.7 Software .....	35
4.8 Zelllinien.....	35
4.9 Kulturmedien .....	37
<b>5 Methoden und Patienten</b> .....	<b>38</b>
5.1 Zellkultur .....	38
5.2 Patienten .....	38
5.3 Makrodissektion .....	39
5.4 Methoden zur RNA-Analyse.....	40
5.4.1 RNA-Isolierung aus humanem Gewebe und Zelllinien .....	40
5.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure .....	41
5.4.3 Synthese der cDNA .....	41
5.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	42
5.4.5 Real Time PCR (RT-qPCR) .....	43
5.5 Methoden zur Protein-Analyse .....	46

5.5.1	Protein-Isolierung aus humanem Gewebe und Zelllinien .....	46
5.5.2	Photometrische Proteinquantifizierung.....	47
5.5.3	Western Blot-Analyse .....	48
5.5.4	Immunhistochemie (IHC) .....	49
5.5.4.1	Prinzip der immunhistochemischen Färbung.....	49
5.5.4.2	Anfertigung der Schnitte .....	50
5.5.4.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) .....	50
5.5.4.4	Färbung der Schnitte .....	50
<b>5.6</b>	<b>Semiquantitative Bestimmung der Proteinexpression (IHC).....</b>	<b>51</b>
<b>5.7</b>	<b>Statistische Methoden .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>54</b>
<b>6.1</b>	<b>Die Expression von LGR5 in Tumorzelllinien.....</b>	<b>54</b>
6.1.1	RNA-Expression in der RT-PCR.....	54
6.1.2	Protein-Expression im Western Blot .....	55
<b>6.2</b>	<b>Die Expression von LGR5 in Patientengewebe .....</b>	<b>56</b>
6.2.1	Patienten .....	56
6.2.2	RNA-Expression in der RT-qPCR .....	59
6.2.2.1	Schmelzkurvenanalyse und Standardkurve .....	59
6.2.2.2	<i>LGR5</i> -Expression der RT-qPCR in Normal- und Tumorgewebe.....	63
6.2.2.3	Korrelation der <i>LGR5</i> RNA-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern ..	67
6.2.3	Protein-Expression im Western Blot .....	67
6.2.3.1	Berechnung der Proteinkonzentration .....	67
6.2.3.2	<i>LGR5</i> -Expression der Western Blots in Normal- und Tumorgewebe .....	69
6.2.3.3	Korrelation der <i>LGR5</i> Protein-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern .....	72
6.2.4	Korrelationsanalyse von RT-qPCR und Western Blot .....	73
6.2.5	Immunhistochemie.....	74
6.2.5.1	Bewertungsscore der IHC.....	74
6.2.5.2	Differenzielle Expression von <i>LGR5</i> in der IHC .....	75
6.2.5.3	Korrelation der IHC anhand klinisch-pathologischer Parameter .....	78
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>80</b>
<b>7.1</b>	<b>Bewertung des Patientenkollektivs.....</b>	<b>80</b>
<b>7.2</b>	<b>Expression von LGR5 in Tumorzelllinien .....</b>	<b>82</b>
<b>7.3</b>	<b>Expression von LGR5 in Patientengewebe .....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>90</b>
<b>8.1</b>	<b>Deskriptive Statistiken .....</b>	<b>90</b>

8.2	Testergebnisse .....	93
8.3	Aufklärungsbogen über die Studie .....	108
8.4	Einwilligungserklärung zum Forschungsprojekt .....	110
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>118</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>120</b>
<b>12</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>13</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>128</b>
<b>14</b>	<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>130</b>
<b>15</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>132</b>



# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Abstrakt

### Einleitung

Dem transmembranären G-Protein gekoppelten Rezeptor LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5) wird eine bedeutende Rolle im Rahmen der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms (CRC) zugesprochen. Insbesondere dessen Überexpression in malignem Tumorgewebe verschiedener Entitäten qualifiziert LGR5 zu einer potentiellen Zielstruktur neuer molekularer Therapieansätze.

### Methodik

Mittels Real-Time PCR (RT-qPCR), Western Blot Analyse (WB) und Immunhistochemie (IHC) soll die Expression von *LGR5* an Tumorgewebe von humanen kolorektalen Karzinomen (T) und korrespondierendem Normalgewebe (N) untersucht und die Expressionswerte anhand von klinisch-pathologischen Parametern, wie dem Tumorstadium und der Tumorlokalisation, analysiert werden. Dies erfolgte an Gewebe von jeweils 20 Patienten, die wegen eines kolorektalen Karzinoms operiert wurden. RT-qPCR und WB wurden an Gewebe, entnommen vom gleichen Patientenkollektiv, durchgeführt. Für die IHC wurde aus Gründen der Verfügbarkeit auf ein weiteres CRC Patientenkollektiv zurückgegriffen.

### Ergebnisse

Diese Analysen zeigten eine signifikante Überexpression des *LGR5* Rezeptors auf RNA- sowie Proteinebene im kolorektalen Tumorgewebe vs. Normalgewebe (T vs. N) (ct-Mittelwerte T 20,13; N 1,63; mittlere WB-Bandenintensität T 73,38; N 25,96;  $p=0.00$ ).

Die Genexpressionsanalyse in klinisch pathologisch definierten Subgruppen zeigte in der RT-qPCR hinsichtlich des Gradings eine erhöhte relative Expression des *LGR5* Rezeptors im Tumorgewebe bei den High-Grade Karzinomen, verglichen mit den besser differenzierten CRC der low-grade Gruppe (ct-Mittelwert T/N low-grade: 14,45; high grade: 20,97;  $p=0,5$ ). Bei der Lokalisation der CRC zeigte das Expressionsverhältnis der RT-qPCR T vs. N keinen Unterschied von proximal vs. distal gelegenen Tumoren (ct-Mittelwert T/N proximal 18,13; distal 17,90;  $p=0,97$ ).

Die UICC Stadien III und IV wiesen höhere Werte im Verhältnis T/N als die Stadien I und II (ct-Mittelwert T/N UICC III und IV 21,56; UICC I und II 14,5;  $p=0,48$ ) auf. Eine statistische Signifikanz ließ sich jedoch bezüglich der untersuchten Subgruppen nicht nachweisen. Kontrastierend zu den Ergebnissen der RT-qPCR auf RNA-Ebene, zeigten die WBs auf Proteinebene der High-Grade Karzinomen ein niedrigeres Verhältnis von T/N als die low-grade Karzinome (mittlere Bandenintensität T/N high-grade 4,26; low-grade 14,35;  $p=0,55$ ). Die UICC Stadien III und IV wiesen, im Vergleich zu den Stadien I und II, ein niedrigeres Verhältnis auf. (mittlere Bandenintensität T/N UICC III und IV 6,07; UICC I und II 11,53;  $p=0,48$ ). Ein Zusammenhang zwischen dem Grad der *LGR5* Expression und den mit einer schlechteren Prognose einhergehenden High-Grade Karzinomen sowie den fortgeschrittenen Tumorstadien UICC III und IV ist demnach nur auf RNA-Ebene zu vermuten, eine statistische Signifikanz besteht jedoch nicht.

Auch in der IHC ließ sich eine signifikant höhere Intensität des Tumorgewebes und damit eine stärkere Expression des Rezeptors nachweisen (Intensitäts-Mittelwert T 2,29; Normal 1,48;  $p=0,0$ ). Eine intensivere Färbung, und damit einen höheren Gehalt an *LGR5*-Protein wiesen die UICC Stadien III und IV (Intensitäts-Mittelwert T/N UICC III und IV 2; UICC I und II 1,44;  $p=0,096$ ) sowie die Gruppe der High-Grade Karzinome (Intensitäts-Mittelwert T/N high-grade 1,95; low-grade 1,55;  $p=0,17$ ) auf. Der postulierte Zusammenhang zwischen einer hohen *LGR5* Expression auf RNA-Ebene und dem Tumorfortschritt, beziehungsweise dem Differenzierungsgrad, wird demnach von den Ergebnissen der IHC untermauert.

### Schlussfolgerung

Die Überexpression des Rezeptors in Tumorzellen und insbesondere das vermehrte Auftreten des Rezeptors in der RT-qPCR und IHC in fortgeschrittenen und niedrig differenzierten Tumoren lassen eine Rolle von *LGR5* im Rahmen der Karzinogenese der CRC vermuten. Die vorliegende Arbeit liefert demnach durch die weitere Charakterisierung von *LGR5* einen zusätzlichen Baustein für das grundlegende Verständnis der Karzinogenese des CRC.

## 1.2 Abstract

### Introduction

The transmembrane G-Protein coupled Receptor LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5) is told to play a decisive role in carcinogenesis of colorectal cancer (CRC). Especially its overexpression in various tissues showing malignant alterations, qualifies LGR5 as a promising target structure for novel molecular therapies.

### Methods

To evaluate the expression level of *LGR5*, it is analyzed by using real-time PCR (RT-qPCR), western blotting analysis (WB) as well as immunohistological staining (IHC) of colorectal cancer tissue (T) and corresponding normal tissue (N). The received results are then compared according to clinical parameters, such as progress and localisation of the tumor. This examination was performed by analysis of tissue taken from 20 patients who underwent surgery for colorectal tumor ectomy. For RT-qPCR and WB the tissue of the same patient population is used, whereas for IHC-tissue staining samples of a different patient collective are used, due to limited availability.

### Results

Concurrent with expectations, a significant overexpression of the LGR5 receptor could be detected in CRC tumor tissue vs normal tissue (mean cycle threshold T 20,13; N 1,63; mean WB intensity T 73,38; N 25,96;  $p=0.00$ ). In gene expression profiling, according to clinical-pathological parameters, the RT-qPCR showed an increased mean T/N ratio in high-grade-carcinomas (mean cycle threshold T/N low-grade: 14,45; high grade: 20,97;  $p=0,5$ ). The tumors located proximal showed no difference in the T/N-ratio, compared to the distal ones (mean cycle threshold T/N proximal 18,13; distal 17,90;  $p=0,97$ ). The stages UICC III and IV revealed a higher mean T/N ratio than the stages I and II (mean cycle threshold T/N UICC III and IV 21,56; UICC I and II 14,5;  $p=0,48$ ). The RT-qPCR results showed no statistical significance.

Different to the RT-qPCR results, western blot analysis of the high grade carcinomas revealed an increased T/N value of CRC tissue (mean WB Intensity

T/N high-grade 4,26; low-grade 14,35;  $p=0,55$ ). Moreover, the UICC stages III and IV comprised a lower T/N value compared to the stages I and II (mean WB intensity T/N UICC III und IV 6,07; UICC I und II 11,53;  $p=0,48$ ). A correlation of higher *LGR5* expression and tumors with poor prognosis, such as high-grade carcinomas and UICC stages III and IV, can only be assumed on RNA-level, although these results had no statistical significance.

IHC revealed a significant overexpression of the LGR5 receptor in CRC tissue, while adjacent normal colon mucosa (mean intensity IHC T 2,29; Normal 1,48;  $p=0,0$ ) did not. A higher intensity in immunohistological staining and, thus, a higher level of LGR5-protein, could be observed for the UICC stages III and IV (mean intensity IHC T/N UICC III und IV 2; UICC I und II 1,44;  $p=0,096$ ) as well as for the group of high-grade carcinomas (mean intensity T/N high-grade 1,95; low-grade 1,55;  $p=0,17$ ). Therefore, the supposed correlation between tumor progression and the level of differentiation is underlined by the IHC results.

### Conclusion

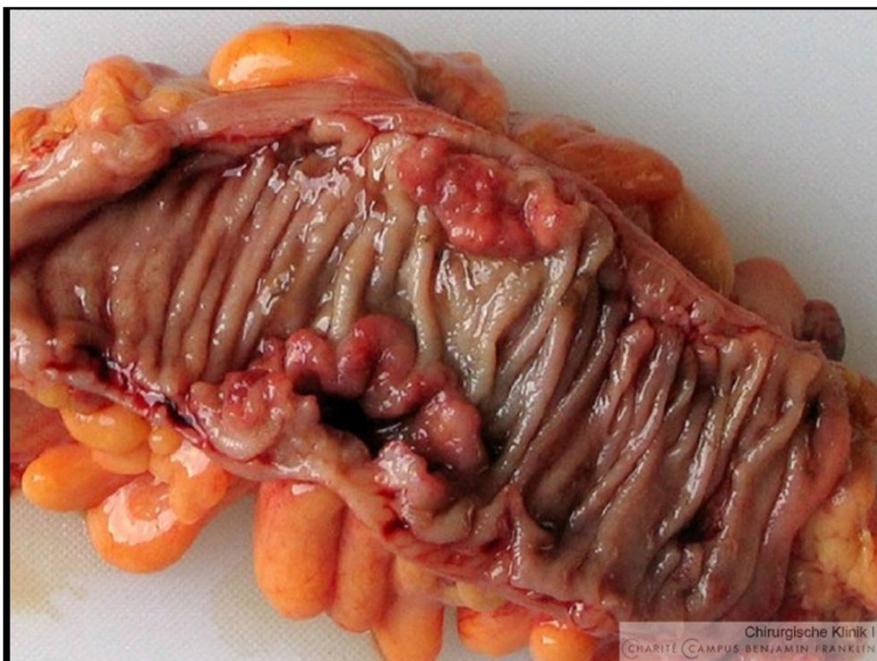
This thesis suggests that overexpression of LGR5 in advanced and less differentiated tumors has a prominent impact on the carcinogenesis of CRC. Thus, these results provide an additional insight contributing to a deeper understanding of CRC carcinogenesis.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das kolorektale Karzinom

#### 2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist in der Bundesrepublik Deutschland bei Frauen und Männern die zweithäufigste Krebserkrankung sowie krebisbedingte Todesursache. Mehr als sechs Prozent aller Deutschen erkranken im Laufe ihres Lebens an diesem Tumorleiden. Hierbei zeigt sich, dass das Risiko, an einem CRC zu erkranken, mit steigendem Alter zunimmt – so erkranken Frauen im Mittel mit 75, Männer mit 69 Jahren (Schmiegel, Pox et al. 2005). Sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität zeigen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (Parkin, Pisani et al. 1999). Weltweit, basierend auf Daten aus dem Jahre 2008, rangiert CRC auf Platz 4 der krebisbedingten Mortalitäten, hinter Lungen-, Magen- und Leberkrebs (Ferlay et al. 2008).



**Abbildung 1: Kolorektales Karzinom.** Ausgeschnittenes Resektat eines Kolonkarzinoms des Colon ascendens. Zu erkennen ist das exophytisch, zirkulär wachsende Karzinom, das polypös in die Kolonmukosa ragt.

Zu den wichtigsten allgemeinen Risikofaktoren eines CRCs zählen der vermehrte Verzehr von „rotem Fleisch“, fehlende körperliche Ertüchtigung sowie Adipositas.

Diese exogenen Risikofaktoren werden durch die mit ihnen assoziierten genetischen Alterationen für die Genese der sporadischen CRC mitverantwortlich gemacht (Norat, Bingham et al. 2005) Hingegen gilt eine ballaststoffreiche Ernährung, wie obst- und gemüsereiche Kost, als risikomindernd (Bingham, Day et al. 2003).

Zwar können Blut- und Schleimauflagerungen beim Stuhlgang, sowie jede Stuhlunregelmäßigkeit ab dem vierzigsten Lebensjahr auf eine mögliche Erkrankung hinweisen, ein entstehendes CRC bleibt jedoch häufig klinisch stumm (Mezger, Locherbach et al. 1997). Insbesondere sind die frühe Diagnose und die systematische Entfernung von prämaligen adenomatösen Vorläuferläsionen für einen Rückgang der Inzidenz und Mortalität des CRC von entscheidender Bedeutung (Truninger and Blum 2000). Ein Zusammenspiel aus Umwelteinflüssen mit dadurch bedingten genetischen Alterationen auf molekularer Ebene, sowie ein individuelles Risiko aufgrund genetischer Prädisposition, konnten als Ursache für die Mehrzahl der CRC identifiziert werden.

Etwa 20 % der CRC treten mit familiärer Häufung auf, auf genetische Ursachen der Erkrankung lässt sich daher schließen (Fuchs, Giovannucci et al. 1994). Vor allem bei einem frühzeitigen Auftreten (vor dem 40. Lebensjahr) des CRC, spielen genetische Prädispositionen eine entscheidende Rolle – dies spiegelt sich auch in einer erhöhten familiären Belastung wider. Eine positive Familienanamnese für das in 80 % sporadisch auftretende CRC, erhöht das mittlere Erkrankungsrisiko Verwandter ersten Grades um das 2- bis 3-fache. Dieses Risiko steigt um das 3- bis 4-fache, wenn das CRC bei einem Verwandten ersten Grades vor dem 60. Lebensjahr aufgetreten ist. Verwandte 2. Grades hingegen haben ein leicht erhöhtes, jene 3. Grades kein nachweisbar erhöhtes Risiko. Hereditäre CRC treten in etwa 5 % der Fälle auf. Tabelle 1 zeigt die häufigsten familiären Syndrome, einhergehend mit einem erhöhten relativen Erkrankungsrisiko (Johns and Houlston 2001).

**Tabelle 1: Hereditäre Syndrome beim CRC.** Modifiziert nach Moslein (Moslein 2003).

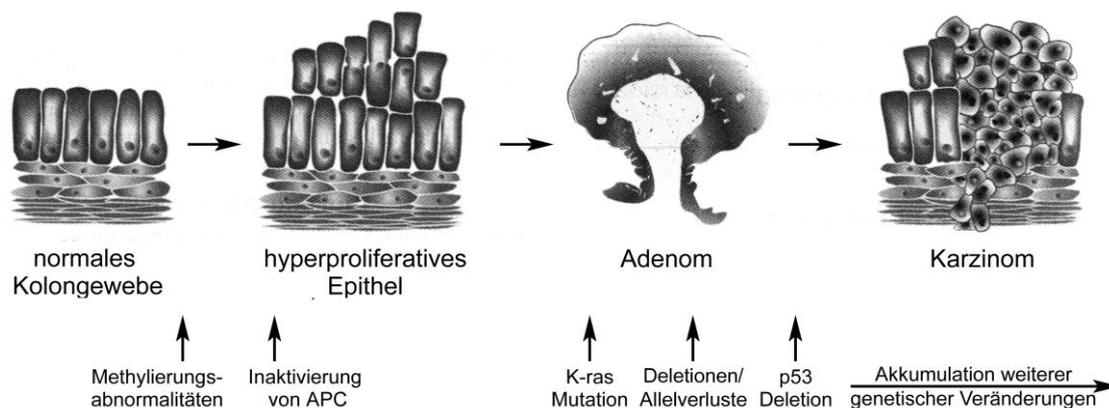
Syndrom		Genet. Defekt	Risiko
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis	Defekt des APC Gens auf Chr. 5q21-q22	100%
AAPC	Attenuierte Familiäre Adenomatöse Polyposis	Mutation APC-Gen und MUTHY-Gen	ca. 80%
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Coli Carcinoma	Defekt DNA Reparatur System, MSI	ca. 60-80%
PJS	Peutz-Jeghers-Syndrom	Mutation STK11/LKB1 auf Chr. 19p13.3	ca. 40%
FJP	Familiäre Juvenile Polyposis Coli	Mutation MADH4-Gen	ca. 20-70%

Im Gegensatz zu sporadisch auftretenden CRC, ohne identifizierten genetisch prädisponierenden Faktor, zeigen familiäre adenomatöse Polyposen (FAP) mit autosomal-dominantem Erbgang jenen auf. Diese Mutation auf dem APC-Gen gilt als obligate Präkanzerose, die zu 100 % zur Entstehung eines CRC führt. Ursächlich für die FAP, bei der multiple Polypen im Kolon entstehen, ist eine Störung des Zellzyklus – jene beruht auf einer Mutation des APC-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 5. Jährliche Koloskopien ab dem 10. Lebensjahr, sowie eine totale Kolektomie vor dem zwanzigsten Lebensjahr zur Vermeidung eines CRC, werden empfohlen (Laukoetter et al. 2010). In 80 % der CRC-Fälle liegt eine Mutation des APC Gens auf beiden Allelen vor, resultierend in einer funktionslosen, verkürzten Version des Tumorsuppressorgens. Ebenfalls bekannt sind Mutationen des  $\beta$ -Catenin kodierenden Gens CTNNB1, die, wie auch APC-Mutationen, zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin führen. Es kommt somit zur konstitutiven Expressierung des unter 2.3 beschriebenen Wnt-Signalwegs, dem auch das in dieser Arbeit charakterisierte Protein LGR5 angehört (Morin, Sparks et al. 1997).

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, wie Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn, stellen für Patienten ebenfalls ein erhöhtes Risiko dar, ein CRC zu entwickeln. Im Besonderen Patienten mit Colitis Ulcerosa weisen nach längerer Erkrankungszeit und ausgedehntem Krankheitsverlauf eine erhöhte Wahrscheinlichkeit eine maligne Entartung zu entwickeln, auf – sie gilt daher als fakultative Präkanzerose. Das maligne Entartungsrisiko bei Morbus Crohn ist geringer, jedoch nach wie vor unzureichend charakterisiert (Fornaro, Frascio et al. 2009).

Molekularbiologisch lässt sich das Entstehen eines CRC am anschaulichsten mit der Theorie eines Mehrstufenmodells erklären. Durch Veränderung in der Signaltransduktion kommt es hier zu einer Aktivierung von Onkogenen, beziehungsweise zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Bereits 1989

ordneten Fearon und Vogelstein der histologischen Entwicklung einer Neoplasie eine Mutation von Genen zu. Als Folge einer Anhäufung dieser genetischen Veränderung entwickelt sich das CRC aus gesundem Kolongewebe über adenomatöse Polypen zum Karzinom. Das kumulative Risiko der Entstehung eines CRC aus einem Adenom beträgt für einen Beobachtungszeitraum von 5 Jahren 2,5 %, von 10 Jahre 7,5 % und von 20 Jahre 25 % (Fearon and Vogelstein 1990). Der amerikanische Krebsforscher Bert Vogelstein war durch diese Entdeckung im Zeitraum von 1994 bis 2004 laut dem „Institute for Scientific Information“ der meistzitierte klinische Mediziner weltweit.



**Abbildung 2: Mehrstufenmodell der Karzinogenese.** Modifiziert nach Vogelstein (Fearon and Vogelstein 1990).

### 2.1.2 Therapie und Prognose

Eine therapeutische Intervention des CRC wird basierend auf Tumorlokalisierung und -stadium festgelegt. Jedoch stellt die chirurgisch-onkologische Therapie bislang das einzige potentiell kurative Behandlungskonzept dar – eine vollständige operative Entfernung des tumortragenden Darmabschnittes mit regionärem Lymphabflussgebiet wird angestrebt. Das chirurgische Konzept beinhaltet dabei sowohl die Resektion des befallenen Darmabschnitts, die Ligatur der versorgenden Arterien und Venen, sowie die En bloc-Entfernung des entsprechenden Lymphabflussgebietes (Schmiegel et al. 2010).

Bis vor etwa 40 Jahren war die Behandlung des CRCs, wie auch anderer solider Tumore, ein monomodales Therapiekonzept. Mit dem Nachweis einer verbesserten Überlebensrate von Patienten mit diagnostiziertem Kolonkarzinom oder Rektumkarzinom aufgrund einer adjuvanten Chemotherapie bzw. adjuvant

kombinierten Radiochemotherapie, etablierten sich multimodale Ansätze des CRCs (Fisher et al. 1988). Ferner führte die Entwicklung moderner Chemotherapeutika zu einer besseren Verträglichkeit, sowie einer forcierten 5-Jahresüberlebensrate der Patienten mit Kolon- und Rektumkarzinom. Hinzukommend konnte durch die Entwicklung einer neoadjuvanten Radiochemotherapie das hohe Risiko von lokalen Rezidiven im kleinen Becken nach Resektionen von Rektumkarzinomen verringert werden (Sauer et al. 2004).

Die Klassifikation der Patienten, nach pathologischen Kriterien und klinischer Ausbreitung, ermöglicht es dem behandelnden Arzt, die Wahrscheinlichkeit eines Tumorrezidivs einzuschätzen, sowie die mögliche Indikation für eine adjuvante Therapie zu prüfen. Die Einteilung des CRCs erfolgt nach international einheitlichen Maßstäben. Das TNM-System stellt dabei, wie auch die seit 1950 von der "Union internationale contre le cancer" (UICC) weitergeführte UICC-Klassifikation, die Grundlage dar. Die Tabellen 2 und 3 zeigen diese auf. (Wittekind and Oberschmid 2010).

**Tabelle 2: TNM Klassifikation des CRC.** (Wittekind and Oberschmid 2010).

<b>T-Kategorien</b>	<b>Primärtumor</b>
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
T4a	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen
<b>N-Kategorien</b>	<b>Regionäre Lymphknoten</b>
N0	Kein Anhalt für Befall regionärer Lymphknoten
N1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
N1a	Metastase in 1 regionären Lymphknoten
N1b	Metastase in 2-3 regionären Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
N2a	Metastasen in 4 - 6 regionären Lymphknoten
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>M-Kategorien</b>	<b>Fernmetastasen</b>
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
M1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nicht regionäre Lymphknoten)
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum
MX	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

**Tabelle 3: UICC Stadienteilung des CRC.** (Wittekind and Oberschmid 2010).

<b>UICC-Stadium</b>	<b>T-Kategorie</b>	<b>N-Kategorie</b>	<b>M-Kategorie</b>
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	jedes T	N1-2	M0
IIIA	T1, T2	N1a	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4b	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
IVA	jedes T	jedes N	M1a
IVB	jedes T	jedes N	M1b

Die postoperative TNM-Formel der UICC beinhaltet die Infiltrationstiefe in die Darmwand bzw. die Infiltration in angrenzende Strukturen (T), die Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M).

Die Lokalisation des CRC liegt zu 69 % im Kolon, im Rektum zu 31 %. Innerhalb des Kolons verteilen sich die Karzinome zu 35 % auf das Sigmoid, 22 % auf das Coecum, 12 % auf Colon ascendens, das Colon transversum und Colon descendens weisen jeweils noch 10 % bzw. 7 % auf (Coates, Greenberg et al. 1995).

Der wichtigste prognostische Faktor des CRCs liegt in der anatomischen Ausbreitung des Tumors. In 40 % der Fälle ist der Tumor auf die Darmwand beschränkt (UICC I und II), was mit einer guten Prognose einhergeht. Bereits nachgewiesene Lymphknotenmetastasen (UICC III) kommen in 32 % der Fälle vor, während bereits bestehende Fernmetastasen (UICC IV) bei 28 % zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vorliegen und daher eine prognostisch ungünstige Situation darstellen. Dies spiegelt sich auch in der 5-Jahresüberlebensrate wider. Bei einem

CRC klassifiziert als UICC Stadium IV beträgt diese weniger als 30 %. Im UICC Stadium I hingegen 80-100 %, im Stadium II 60-80 %, mit Lymphknotenbefall in Stadium III 30-60 % (Buhr HJ 2006).

### **2.1.3 Molekulare Pathogenese**

Die Karzinogenese von gesundem Darmpithel über adenomatöse Polypen, fortschreitend zu einem Adenom mit intraepithelialer Neoplasie (Dysplasie), bis hin zum invasiven CRC wurde erstmals in den 1950er Jahren beschrieben und galt lange Zeit, für die Mehrheit der CRC, als Progressions-Modell (Jackman and Mayo 1951). Eine Aktivierung als auch Inaktivierung verschiedener Gene im Rahmen von Tumorentstehung und -progression führt zu einer Veränderung der jeweiligen Genexpression, welche zu den charakteristischen malignen Eigenschaften von Zellen (erhöhte Mitoserate, invasives Wachstum und verminderter Apoptoserate) führt. Durch eine Mutation von Protoonko- und Tumorsuppressorgenen entstehen Onkogene, die eine abnorm gesteigerte Zellproliferation, mit autonomem Wachstum der Zelle, induzieren. Bereits charakterisierte Mutationen die zur Tumorentstehung führen, betreffen unter anderem die Tumorsuppressorgene p53, DCC (Deleted in colon cancer), APC (Adenomatous Polyposis coli) und MCC (Methylcrotonoyl-Coenzym A-Carboxylase) (Lengauer, Kinzler et al. 1998).

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Adenome über eine Inaktivierung des APC-Gens initiiert und die Tumorentstehung durch molekulare Alterationen vorangetrieben wird (Vogelstein, Fearon et al. 1988). Das APC-Gen wurde als Tumorsuppressorgen, sowohl bei sporadisch auftretenden Karzinomen als auch bei der FAP, nachgewiesen. Die Mutation des APC-Gens, welches über Vermittlung des Abbaus von  $\beta$ -Catenin maßgeblich dessen intrazelluläre Konzentration reguliert, ist ein frühes Ereignis in der Dysplasie-Karzinom-Sequenz. Dieser Ablauf, der aufgrund seiner Schutzfunktion für den Zellzyklus auch als Gatekeeper Pathway bezeichnet wird, findet bei etwa 90 % der sporadischen CRC statt. Ferner ist jener bei den hereditären CRC für die autosomal-dominant vererbte FAP verantwortlich, bei der eine Keimbahnmutation des APC-Gens zugrunde liegt (Munemitsu, Albert et al. 1995).

Eines der bekanntesten Onkogene ist K-ras, bereits einzelne Punktmutationen

führen zu einer veränderten Konfiguration des Proteins. Dadurch können wachstumsstimulierende Signale auf die mutierte Zelle einwirken, die Aktivität des Proteins kann so fortbestehen. So zeigen nur etwa 10 % der kleinen Adenome (<1 cm) Mutationen des K-ras-Gens, während etwa 50 % der größeren Adenome (>1 cm) 60 % der CRC K-ras-Mutationen aufweisen (Vogelstein et al. 1988) (Fukushima and Takenoshita 2001).

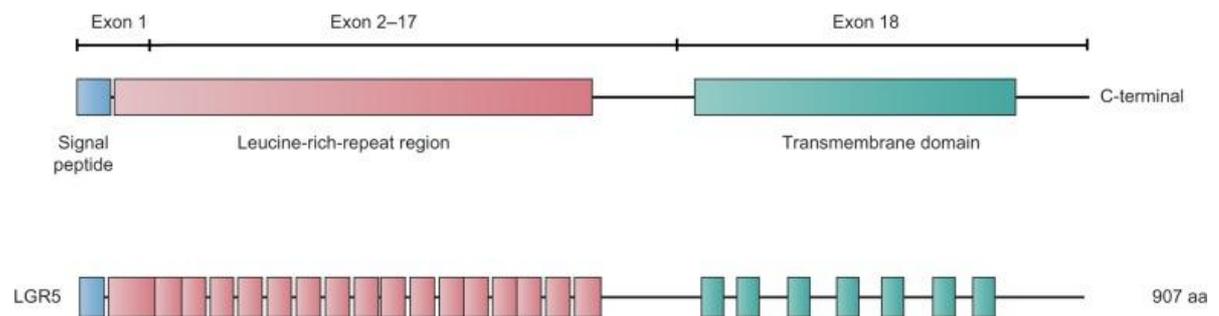
Neben dem Gatekeeper Pathway entstehen etwa 10 % aller sporadischen CRC durch einen alternativen Mechanismus der Tumorgenese, dem sogenannten Caretaker Pathway. Mutationen (häufig MSH2, MLH1, MSH6) führen dabei zu Funktionsstörungen von DNA-Reparaturenzymen, die sonst entstandene Basenfehlpaarungen korrigieren können. Diese Mutationen in den sogenannten Mismatch-Repair-Genen (MMR) können spontan, wie im Fall des sporadischen CRC, auftreten oder auch autosomal dominant – dieser Erbgang wurde etwa beim HNPCC-Syndrom beobachtet (Kinzler and Vogelstein 1997). Neben den resultierenden Mutationen innerhalb kodierender Sequenzen, kommt es charakteristischerweise auch zu Veränderungen repetitiver Sequenzelemente nichttranskribierter Bereiche des Genoms. Diese sogenannten Mikrosatelliten machen etwa 10 % des humanen Genoms aus. Die Alterationen zeigen sich in der DNA von Tumorzellen als Veränderung der Länge der repetitiven Sequenz. Eine solche Längendifferenz wird auch als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet. Dieses auch als MSI-Phänotyp bezeichnete Charakteristikum wird beim HNPCC-Syndrom (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer) in 80-90 %, aber auch in 10-15 % der sporadischen CRC beschrieben (de la Chapelle and Hampel 2010). 20-30 % der sporadischen CRC weisen Veränderungen des DNA Methylierungsmusters auf. Durch Hypermethylierung kommt es zu einer Inhibierung (Silencing) der Transkription betroffener Gene – dies führt im Falle von MMR-Genen zum Auftreten von MSI. Der gekennzeichnete Phänotyp wird als CIMP („CpG island methylator phenotype“) bezeichnet. CIMP-positive Karzinome scheinen unterschiedliche genotypische, phänotypische und prognostische Eigenschaften zu besitzen. Hierzu zählen Mutationen von BRAF, K-ras und p53, Mikrosatelliteninstabilität sowie Lokalisation und Histologie des Tumors, das Alter und Geschlecht des Patienten (Booth 2007).

Darüber hinaus werden auch alternative Wege der Karzinogenese diskutiert, wie

etwa der sogenannte „serrated pathway“, dem die Entstehung von etwa 7 % aller CRC zugesprochen wird. Er unterscheidet sich sowohl pathohistologisch als auch molekular vom klassischen Adenom und führt durch frühe genetische Veränderungen von BRAF, oder seltener von K-ras, zur verminderten p53-abhängigen Apoptose (Makinen, George et al. 2001).

## 2.2 Der Glykoprotein-gekoppelte Rezeptor (GPCR) LGR5

Durch die vollständige Sequenzierung des menschlichen Genoms im Jahr 2003 wurde die Existenz von etwa 140 unbekanntenen Glykoprotein-gekoppelten Rezeptoren offen gelegt, denen bislang weder ein natürlicher Ligand noch eine physiologische Funktion zugeordnet werden konnte (Gregory, Barlow et al. 2006). Sie werden daher als Rezeptorwaisen, im Englischen „orphan-receptors“, bezeichnet (Civelli, Saito et al. 2006).

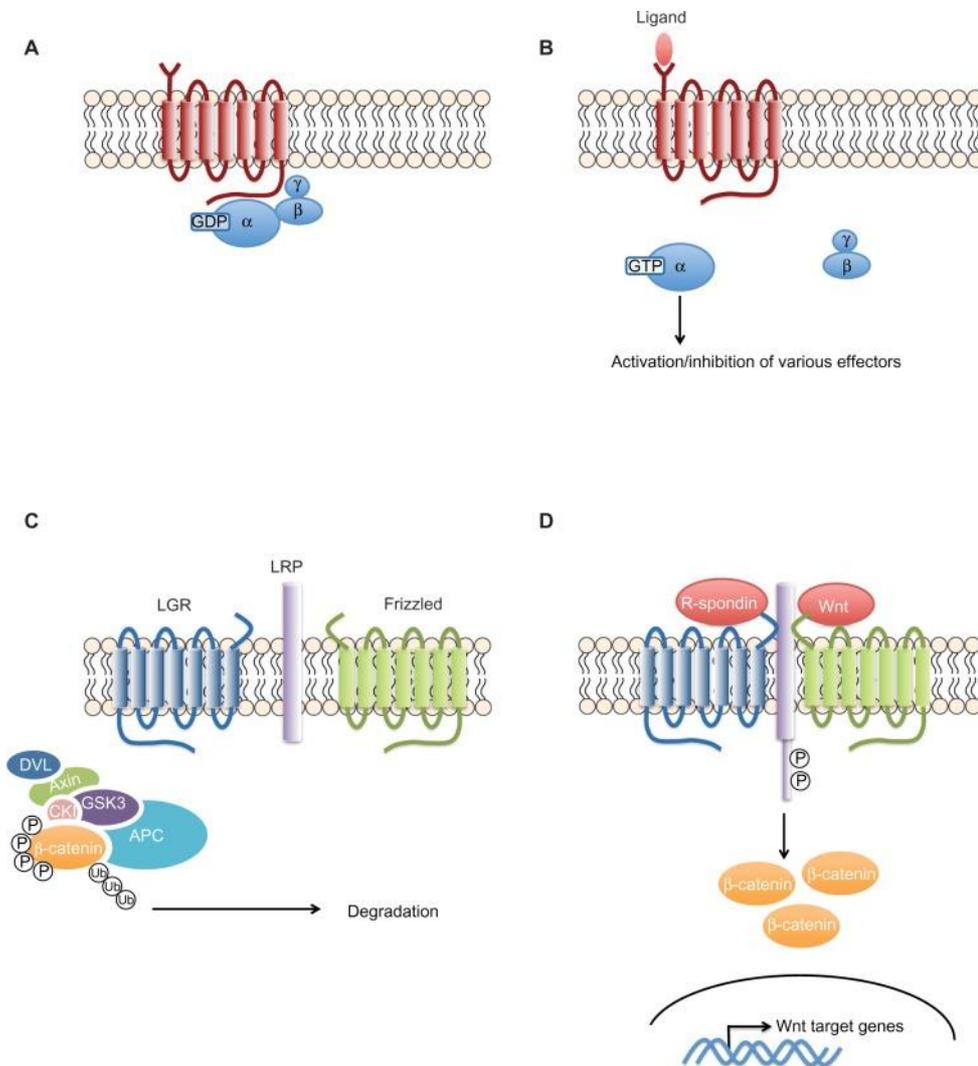


**Abbildung 3: Schematische Darstellung der LGR5 Struktur.** (Nakata et al. 2014).

Der aus etwa 144 kb bestehende LGR5 besitzt sieben transmembranäre Untereinheiten (Exon 18) sowie eine Exon 1-17 überspannende N-terminale, extrazelluläre Domäne. Diese weist bis zu 17 „leucine-rich repeats“ auf, wobei jedes 24 Aminosäuren enthält. Diese typischen Wiederholungssequenzen stellen bei anderen, besser charakterisierten Rezeptoren, die extrazelluläre Bindungsstelle des Liganden dar. Ferner ist das *LGR5* Gen auf Chromosom 12 an der Position 12q22–q23 lokalisiert (Hsu et al. 1998).

Obwohl die Namensgebung des LGR5 Rezeptors auf eine Aktivierung des Glykoproteins schließen lassen würde, wurde vor kurzem R-Spondin als dessen Ligand identifiziert (de Lau et al. 2011). Nach Ligandenbindung formt LGR5 gemeinsam mit Frizzled und LRP5/6 (lipoprotein receptor-related proteins 5 and 6) einen Proteinkomplex, welcher die Wnt-Signaltransduktion positiv reguliert. Ferner

konnte durch Kristallstrukturanalysen von R-Spondin und LGR5 gezeigt werden, dass diese als Heterodimere binden (Peng et al. 2013) (siehe Abb. 4C und D).



**Abbildung 4: Der Glykoprotein-gekoppelte Rezeptor Signaltransduktionsweg.** (A) Die transmembranären Domänen von GPCR aktivieren heterotrimerische G-Proteine; (B) Durch Ligandenstimulation des GPCR trennt sich die  $\alpha$ -Untereinheit von der  $\beta$ - sowie  $\gamma$ -Untereinheit und aktiviert bzw. inhibiert verschiedene zytoplasmatische Enzyme; (C und D) Im Gegensatz zu den klassischen GPCR, aktiviert LGR5 (wie auch LGR4-6) keine heterotrimerische G-Proteine zur Signalübertragung. Vielmehr rekrutiert er, über die Bindung von R-Spondin, den LRP-Frizzled-Rezeptorkomplex, welcher wiederum durch Wnt-Ligandenbindung zur Phosphorylierung von LRP führt. Dieser Komplex rekrutiert dann den Axin-Komplex,  $\beta$ -Catenin ist nicht mehr durch dessen Phosphorylierung für die Degradation markiert. Dies führt zur  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung, Akkumulation, Translokation in den Nucleus und schlussendlich zur Aktivierung der Genexpression (Nakata et al. 2014).

Bei LGR5 handelt es sich um das Synonym von Gpr49. Nachgewiesen werden

konnte die physiologische Expression von LGR5 bereits in diversen Gewebe, wie etwa dem Skelettmuskel, der Plazenta, dem Rückenmark, der Nebenniere und dem Gehirn. Verschiedene Studien haben darüber hinaus die LGR5-Expression in Karzinomen beschrieben. Yamamoto und Sakamoto zeigten im Jahr 2003, dass LGR5 in humanen Zelllinien von hepatozellulären Karzinomen, im Vergleich zu gesundem, hepatischem Gewebe, verstärkt nachweisbar ist. Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen verstärkter Expression des Rezeptors und einer  $\beta$ -Catenin Mutation nachgewiesen werden (Yamamoto, Sakamoto et al. 2003).

Die erste Beschreibung von LGR5 beim CRC stammt von der Arbeitsgruppe um Ahmed A. Samatar. Es konnte gezeigt werden, dass LGR5 in kolorektalem Tumorgewebe überexprimiert vorzufinden ist. Zudem konnten sie nachweisen, dass eine gezielte Blockade des Rezeptors in CRC-Zelllinien Apoptose induziert. Darüber hinaus wiesen CRC Proben in den UICC Stadien I und II signifikant mehr LGR5-mRNA auf, als die Stadien III und IV. Sie postulierten daher, dass der Rezeptor speziell in frühen Stadien der Karzinogenese eine Rolle spielt (McClanahan, Koseoglu et al. 2006).

### **2.3 Der Wnt-Signaltransduktionsweg**

Der Wnt-Signaltransduktionsweg (siehe Abb. 4C und D) nimmt beim Menschen eine besondere Rolle in der Embryonalentwicklung und der Regeneration von Geweben ein. Gewebe und Organe, die ständiger Selbsterneuerung unterworfen sind, transduzieren über den Wnt-Signalweg. So brauchen z.B. das hämatopoetische System, die Haut oder der Darm einen aktiven Wnt-Signalweg zur ständigen Proliferation (Grigoryan, Wend et al. 2008).

Der Wnt-Signaltransduktionsweg ist nach seinem Liganden Wnt benannt, bestehend aus Wg für wingless und Int-1 für integration 1. An seiner Signaltransduktion sind diverse Proteine, wie auch der in dieser Arbeit charakterisierte Glykoprotein-gekoppelte Rezeptor LGR5 beteiligt. Das Wnt-Signalprotein bindet gemeinsam mit dem Corezeptor LRP an den Rezeptor Frizzled und aktiviert das Protein Dishevelled. Dieses inhibiert wiederum einen Proteinkomplex, bestehend aus der GSK-3-Kinase, Axin-1 und dem Tumorsuppressorgen APC. Wenn jener Proteinkomplex aktiviert vorliegt, phosphoryliert GSK3  $\beta$ -Catenin und markiert es dadurch für die Degradierung

(siehe Abb. 4C). Durch Inhibierung des Komplexes und die daraus resultierende Inhibition des Abbaus von  $\beta$ -Catenin, akkumuliert  $\beta$ -Catenin und transloziert in Zellkern und Zytoplasma (siehe Abb. 4D). Durch eine Komplexbildung mit dem Transkriptionsfaktor TCF, aktiviert  $\beta$ -Catenin die Expression spezifische Zielgene wie *LGR5*. (Nusse, Fuerer et al. 2008).

Eine gezielte Unterdrückung einzelner Bestandteile dieses Ablaufs führt zu einer Änderung des physiologischen Ablaufs des Zellzyklus. Korinek und Barker konnten in Ihrer Arbeit zeigen, dass eine gezielte Blockade des Transkriptionsfaktors 4 (Tcf-4) oder  $\beta$ -Catenins zu einer Verminderung der intestinalen Zellproliferation führen kann (Korinek, Barker et al. 1998). Gleiches gilt für eine verstärkte Expression des Wnt-Inhibitors Dickkopf-1 (DKK-1). Im Tierversuch zeigten adulte Mäuse nach Inhibition von DKK-1 innerhalb von 2 Tagen eine verminderte Expression der Wnt-Zielgene CD44 und EphB2 in Duodenum und Kolon mit anschließendem Untergang des Epithels mit Verlust von Zotten und Krypten (Kuhnert, Davis et al. 2004).

Ferner ist der Wnt-Signaltransduktionsweg ein äußerst einflussreicher Krebsmediator. So begünstigen, wie bereits erwähnt, APC Mutationen die Wnt-Aktivität durch Dysregulation der  $\beta$ -Catenin-induzierten Genexpression, in 80 % der sporadischen CRC ist dies zu beobachten (Walker et al. 2011). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der extrinsischen Wnt-Signaltransduktion eine wichtige Determinante der zellulären Akquisition der Eigenschaften von Krebsstammzellen darstellt (de Sousa, Vermeulen, Richel, & Medema 2011).

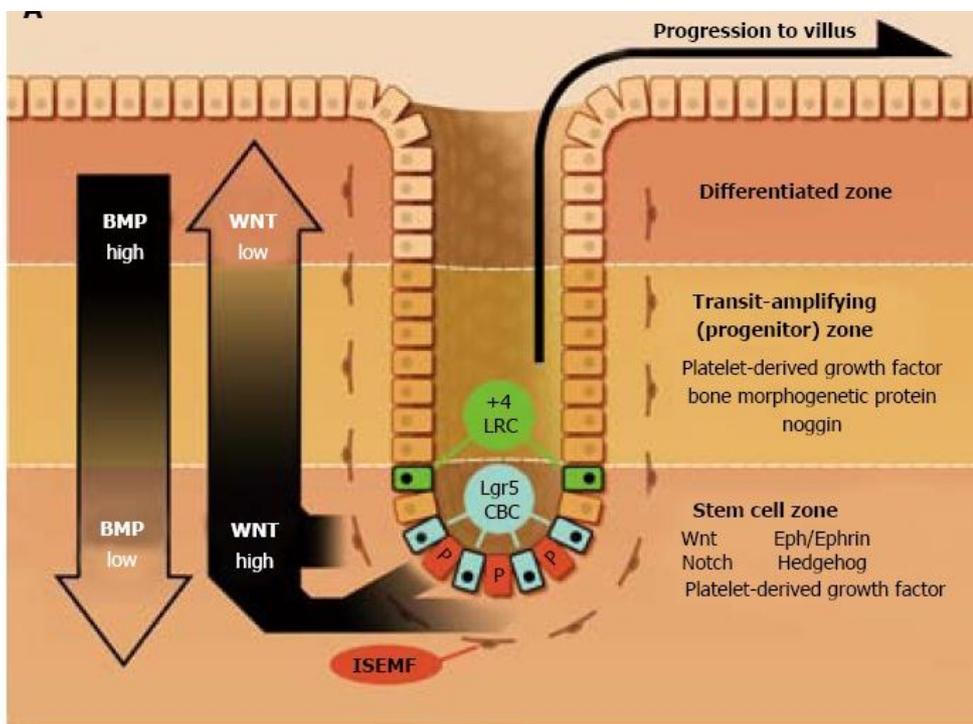
## **2.4 Die Krebs-Stammzell Theorie**

Eine relativ junge Theorie der Karzinogenese, die in der wissenschaftlichen Welt in den letzten Jahren diskutiert wird, ist die Krebs-Stammzell Theorie (Tomasson 2009). Diese Theorie geht davon aus, dass eine Subpopulation neoplastischer Zellen existiert, die die Fähigkeit besitzen sich selbst zu erneuern und sich in Vorläuferzellen zu differenzieren (Visvader 2011).

Stammzellen sind charakterisiert durch ein ausgeprägtes proliferatives Potential und ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie einer geregelte Weiterentwicklung in ausdifferenziertes, funktionelles Gewebe. Diese Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ein ausgeprägtes proliferatives Potential sind ebenso charakteristische

Eigenschaften von maligne entarteten Zellen. Dies wirft die Frage auf, ob der Regulation von gesunden Stamm- und malignen Zellen ähnliche oder sogar gleiche biologische Mechanismen zugrunde liegen.

Pluripotente Stammzellen können durch die Identifizierung spezifischer Zelloberflächen-Marker nachgewiesen werden. Der erfolgreiche Nachweis pluripotenter Stammzellen ist bislang im Knochenmark und in der weiblichen Brustdrüse gelungen, im Jahr 2007 erstmals auch im Intestinum (Kiel, Yilmaz et al. 2005). Anders als beim hämatopoetischen System, welches eine geringe Teilungsrate aufweist, regeneriert das Darmepithel innerhalb von fünf bis sieben Tagen. Stamm- und Progenitorzellen sorgen durch ihre ständige Teilungsaktivität für eine Zellerneuerung, ausgehend von der Kryptenbasis. Die Vorläuferzellen differenzieren sich in eine der vier epithelialen Zelltypen. So entstehen Enterozyten zur Absorption, Becherzellen zur Sekretion, enteroendokrine Zellen und Paneth-Körnerzellen. An der Kryptenspitze erfolgt schließlich die Apoptose und die abgestorbenen Zellen werden in das Darmlumen abgeschilfert (Barker, van Es et al. 2007).



**Abbildung 5: Nischenregulation des normalen intestinalen Epithels und CRC.** Intestinale subepitheliale Myofibroblasten (ISEMF) umgeben die Krypte. Gemeinsam mit den Paneth-Körnerzellen (P) versorgen diese die Stammzellnische mit trophischen Signalen (Ong et al. 2014).

Van de Wetering et al. haben im Jahr 2002 beschrieben, dass die Proliferation der Stammzellen an der Kryptenbasis durch Proteine induziert wird, die dem Wnt-Signaltransduktionsweg unterliegen. Je weiter die Migration der Zellen Richtung Darmlumen voranschreitet, desto schwächer wird das Wnt-Signal, bis es im oberen Drittel der Krypte ausbleibt, was zu einer Differenzierung der Zellen führt. Greift in diesen komplexen Prozess eine Mutation ein, werden die einzelnen Bausteine des Signalwegs gestört, sodass trotz fehlender Stimulation der Wnt-Signalweg aktiviert bleibt. Als Folge daraus kommt es weder zur weiteren Differenzierung, noch zur Apoptose. Diese vermehrte Proliferation führt über die oben beschriebene Polypenbildung zur Entstehung von CRC (van de Wetering, Sancho et al. 2002).

Die Existenz der intestinalen Stammzellen kann möglicherweise ein Erklärungsansatz für die Beobachtung sein, dass Tumore eine heterogene Mischung verschiedenster Zellarten mit unterschiedlichen Graden an Differenzierung innerhalb ihrer Struktur zeigen. Zudem ließe sich erklären, warum multiple, nebeneinander existierende Krebszellpopulationen in verschiedenen Stadien derselben Malignität in einem Patienten ko-existieren können. Darüber hinaus könnte so auch die Beobachtung erklärt werden, dass Patienten auf konventionelle kurative Krebstherapien häufig nur schlecht ansprechen (Radtko and Clevers 2005).

Im Jahr 2007 wurde erstmals von Barker et al. postuliert, dass das in dieser Arbeit charakterisierte Protein LGR5 als ein Marker für intestinale Stammzellen fungieren könnte (Barker, van Es et al. 2007). So konnte dieser zeigen, dass APC Deletionen in LGR5+ Stammzellen, welche 6,5 % der Tumormasse ausmachen, eine Entstehung von Adenomen fördern. So wurde schlussgefolgert, dass die LGR5+ Stammzelltransformation, insbesondere via Verlust der APC-Funktion, ein höchst effizienter Weg zur Neoplasie darstellt (Barker et al 2009).

Ließe sich zukünftig der nach der Krebs-Stammzell Theorie für die maligne Entartung ursächliche Anteil der Zellen weiter detektieren und möglicherweise selektiv inhibieren, würde dies neue Möglichkeiten für Tumortherapien eröffnen. Weitere Studien zu diesem Thema sind aktuell Inhalt intensivster Forschung und werden von der Fachwelt mit Spannung erwartet. Ein grundlegendes Verständnis von LGR5 ist somit für ein besseres Verständnis der Karzinogenese und Erforschung neuer kurativen Therapiemöglichkeiten von großer Bedeutung.

### **3 Ziele der Arbeit**

Bei verschiedenen soliden Karzinomen konnte eine Überexpression des G-Protein gekoppelten Rezeptors LGR5 im Tumorgewebe auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen der Expression des Rezeptors und der Tumorprogression wurde beim kolorektalen Karzinom zwar postuliert, die genaue Funktion des Lg5 Rezeptors bleibt jedoch weiterhin unklar. Ziel dieser Arbeit ist es daher

1. die differentielle Expression von LGR5 an einem eigenen CRC Patientenkollektiv mittels Real-Time PCR, Western Blot und Immunhistochemie an Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe zu untersuchen und
2. die Expression von LGR5 mit etablierten klinischen-pathologischen Parametern, wie Geschlecht, Tumorstadium, Differenzierungsgrad und Lokalisation der CRC zu korrelieren.



## 4 Material

### 4.1 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid	Roth (Karlsruhe, D)
Antikörper Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik Systeme (Hamburg, D)
APS (Ammonium Persulfat)	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Blocking Medium (10x)	BioGenex (San Ramon, USA)
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Chloralhydrat	Roth (Karlsruhe, D)
Chloroform	Roth (Karlsruhe, D)
Chromium 3 Kaliumsulfat	
Dodecahydrat 98%	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Deoxynucleotide Mix (dNTP´s)	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Diaminobenzidintetrahydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
DMPC	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
DNA Größenmarker 100bp	Invitrogen (Carlsbad, Kanada)

dNTP`s	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D) (Steinheim, D)
EDTA 0,5M	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Eosin	Roth (Karlsruhe, D)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe, D)
Essigsäureanhydrid	Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, D)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe, D)
Ficoll	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Gelatine	Merck (Darmstadt, D)
Glycin	Roth (Karlsruhe, D)
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
HCL Chlorwasserstoff	Roth (Karlsruhe, D)
Hot Star Taq Polymerase	Qiagen (Hilden, D)
Kaliumalumin	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
LB-Agar	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
LB-Broth	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe, D)
Magnesiumchlorid	Roche Applied Science (Mannheim, D)

Master SYBR Green (10x)	ProMega (Madison, USA)
MLV – Reverse Transkriptase	Promega (Mannheim, D)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
NaOH	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumcitrat	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumiodat	Roth (Karlsruhe, D)
NP40	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Oligo dt15 Primer	Promega (Mannheim, D)
OligodT`s	ProMega (Madison, USA)
PageRuler Protein Marker	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D)
PBS	Biochrom (Berlin, D)
Streptavidin-Peroxidase Komplex	KPL (Gaithersburg, USA)
Powerblock Immunhisto	Bio Genex (San Ramon, USA)
Proteaseinhibitoren	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Ready-Taq Mix	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
RNAse Inhibitor	ProMega (Madison, USA)
Roti-Histokit	Roth (Karlsruhe, D)
SDS-Pellets	Roth (Karlsruhe, D)
Temed	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Tris Hcl (1M)	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)

Tris Pufferan®	Roth (Karlsruhe, D)
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Tryptone	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Tween 20	Roth (Karlsruhe, D)
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Xylene Cyanol	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Xylol	Roth (Karlsruhe, D)
Zitronensäure	Roth (Karlsruhe, D)

## 4.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Hersteller
Acrylamidgel 10%	4,9 ml dd H <sub>2</sub> O + 2,5 ml 1,5 M Trizma Base + 2,5 ml 40 % Acrylamid + 50 µl 10 % SDS + 50 µl 10 % APS + 15 µl Temed
Acrylamidgel 7,5%	5,75 ml dd H <sub>2</sub> O + 2,5 ml 1,5 M Trizma Base + 1,88 ml 40 % Acrylamid + 50 µl 10 % SDS + 50 µl 10 % APS + 15 µl Temed
Agarose-Gel 1%	0,5 g Agarose + 50 ml TAE Puffer + 5 µl Ethifumbromid
BSA-Lösung 5%	5 g BSA in 100 ml TBS/T + 800 µl Natriumazid (2,5 %)
DNA Loading Buffer	4 mM Bromphenol Blau + 5 mM Xylene Cyanol + 0,4 mM Ficoll® 400 in dd H <sub>2</sub> O

Eosin-Färbelösung	0,5 g Eosin in 100 ml 70 % Ethanol
Hämalaun Färbelösung nach Meyer	1 g Hämatoxylin in 1000 ml H <sub>2</sub> O + 0.2 g Natriumjodat + 50 g Kalialaun + 50 g Chloralhydrat + 1 g Zitronensäure
Ladepuffer (DNA)	0,025 g Bromphenol blau + 0,025 g Xylene Cyanol + 1,5 g Ficoll 400 + 10 ml H <sub>2</sub> O
Laufpuffer 5x	15 g Trizma Base + 72 g Glycin + 5 g SDS auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Lumilight Western Blotting Kit	Roche-Applied Science (Mannheim, D)
Milchpulverlösung 5%	Magermilchpulver 5 % in TBS/T
NucleoSpin® RNA II Isolation	Macherey-Nagel (Düren, D)
PBS/ Phosphataseinhibitoren	0,8 ml PBS + 6, 8ml dd H <sub>2</sub> O + 0,4 ml Phosphataseinhibitoren
PBS-Tween	0,58 % 200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O + 1,92 % 230 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O + 0,01 % Tween20 in dd H <sub>2</sub> O
Protein-Lyse-Puffer	1 ml 1 M TrisHCl pH 6,8 + 0,4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 + 3 ml 5 M NaCl + 8,75 ml 10 M Brij96 + 1,25 10 % NP40 und auf 100 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
SSC Puffer 20x	3 M NaCl + 340 mM Natriumcitrat in dd H <sub>2</sub> O
TAE Puffer 50x	2 M Trizma Base + 6 % Essigsäure + 10 % 0,5 M EDTA bei pH 8,0 in dd H <sub>2</sub> O

TBS	50 mM Trizma Base + 150 mM NaCl in dd H <sub>2</sub> O mit HCl bei pH 7,6 einstellen
TBS-Tween (TBS/T)	50 mM Trizma Base + 150 mM NaCl in dd H <sub>2</sub> O mit HCl bei pH 7,6 einstellen + 0,01 % Tween20
Transfer Puffer	3,03 g Trizma Base + 14,4 g Glycin + 200 ml Methanol auf 800 ml dd H <sub>2</sub> O
QuantiPro BCA Assay Kit	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)

### 4.3 Primer

Alle Primer stammen von TIB Molbiol (Berlin, D).

**Tabelle 6: Primer**

Bezeichnung	Sequenz
B2M Antisense	5´-gAT gCT TAC ATg TCT Cg- 3´
B2M Sense	5´-CCA gCA gAg AAT ggA AAg TC- 3´
Gpr49 Antisense	5´-CTC AgC gTC TTC ACC TCC T- 3´
Gpr49 Sense	5´ -gTg gAT TCT ATT gTT ATg gAg A- 3´
Gpr49-LC Antisense	5´ -AgC Agg AAA TCT TCA Agg TCA CgT TC- 3´
Gpr49-LC Sense	5´ -gCT TAC CAg TgC TgT gCA TTT ggA gT- 3´
β-Aktin Antisense	5´ -CgC TgC gCT ggT CgT CgA CA- 3´
β-Aktin Sense	5´ -gTC Acg CAC gAT TTC Ccg CT- 3´

#### 4.4 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
GPR49- Rabbit-IgG	Biozol Diagnostica (Eching, D)
Anti Rabbit Biotin IgG	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

#### 4.5 Geräte

Tabelle 8: Geräte

Geräte	Hersteller
ABI PRISM 300 DNA Analyzer	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg, D)
Blotting Tank, inklusive Zubehör	BioRad (Hercules, Kanada)
CO <sub>2</sub> -Inkubator HeraCell	Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine Scotsman AF10	Scotsman Ice Systems (Vernon Hills, USA)
Electrophorese Documentation and Analysis System 120	Kodak (Stuttgart, D)
Elektrophoresekammer	BioRad (Hercules, Kanada)
Fuji Intelligent Dark Box	Fuji Photo Film (Tokyo, Japan)
Fujifilm LAS-1000 Kamera	Fuji Photo Film (Tokyo, Japan)
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, D)
Heizblock ThermoStat Plus	Eppendorf (Hamburg, D)

Heizplatte/Magnetrührer MR3001	Heidolph (Kelheim, D)
HP Deskjet 970 Cxi	Hewlett-Packard GmbH (Böblingen, D)
Kamera (PCR) Powershot S5	Canon (Tokyo, Japan)
Kryostat Microm HM 560	Microm (Walldorf, D)
Kryo-Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus (Hanau, D)
Kühltruhe Heraeus HFC486 Basis	Heraeus (Hanau, D)
Laborwaage Sartorius BP 310 S	Sartorius AG (Göttingen, D)
Lightcycler System Vers. 2.0	Roche Applied Sciences (Mannheim, D)
Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, D)
Mikroskop Axioskop 2	Carl-Zeiss AG (Jena, D)
Mikrotom Leica RM 2125 RT	Leica Microsystems (Wetzlar, D)
Mikrowelle M1727N 800W	Samsung Deutschland (Schwalbach, D)
pH Meter CG840	Schott AG (Mainz, D)
Pipettierboy Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Rocking Platform Vibramax100	Heidolph (Kelheim, D)
Schüttler Polymax 1040	Heidolph (Kelheim, D)
Ultraschallbad Transsonic	Elma (Singen, D)
UV Transluminator	Herolab (Wiesloch, D)
Vortex Mixer Genie 2	Scientific Industries (New York, USA) Vortex Mixer SA7 Carl-Stuart Laboratory Supplies (Dublin, Irland)

Wasserbad GFL1086	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, D)
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg, D)

#### 4.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
E. P. Tipps Pipettierspitzen	Eppendorf Hamburg, D)
Eppendorf Gefäße 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
Insulinspritzen	B.Braun (Melsungen, D)
Kanülen	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Küvetten	Eppendorf (Hamburg, D)
LightCycler Kapillaren	Roche Applied Science (Mannheim, D)
Objekträger	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
Parafilm M	Pechiney (Chicago, USA)
PVDF-Membran	Perkin-Elmer (Waltham, USA)
Skalpell	Feather (Osaka, Japan)
Zellkulturflaschen	Sarstedt (Nürnbrecht, D)
Zellschaber	TRP (Zürich, CH)

## 4.7 Software

Tabelle 10: Software

Software	Hersteller
EndNote Vers. 9.0	Thomson ResearchSoft (Carlsbad, USA)
Microsoft Excel 2003	Microsoft Germany (Unterschleißheim, D)
Microsoft Word 2003	Microsoft Germany (Unterschleißheim, D)
Relative Quantification Software	Roche Applied Sciences (Mannheim, D)
LightCycler Probe Design 2.0	Roche Applied Sciences (Mannheim, D)
Fujifilm Quantifizierungssoftware	Fuji Photo Film (Tokyo, Japan)
SysStat 12	Sys Stat Software (Erkrath, D)
Sigma Plot 10.0	Sys Stat Software (Erkrath, D)

## 4.8 Zelllinien

Tabelle 11: Kolonkarzinom Zelllinien

Zelllinie	Kultivierung
SW 480	Kultiviert aus einem kolorektalem Adenokarzinom, Dukes` Typ B, eines 50 jährigen Mannes. ATCC Nummer: CCL-228
SW 620	Kultiviert aus einer Lymphknotenmetastase des gleichen Patienten, wie SW 480. ATCC Nummer: CCL-227
HT 29	Kultiviert aus einem gut differenzierten, kolorektalen Adenokarzinom einer 44-jährigen Frau. ATCC Nummer: HAT38

HCT 116	Kultiviert aus einem kolorektalen Karzinom eines erwachsenen Mannes. ATCC Nummer: CCL-247
LOVO	Kultiviert aus Zellen einer supraklavikulären Metastase eines kolorektalen Adenokarzinoms eines 56jährigen Mannes. ATCC Nummer: CCL-229

**Tabelle 12: Magenkarzinom Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Kultivierung</b>
AGS	Kultiviert aus einem Adenokarzinom des Magens einer 54-jährigen Frau. ATCC Nummer CRL-1739
MKN-45	Kultiviert aus einem gering differenzierten, medullären Adenokarzinom des Magens von einer 62-jährigen Frau. ATCC Nummer 409

**Tabelle 13: Pankreaskarzinom Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Kultivierung</b>
MiaPaca	Kultiviert aus einem Pankreaskarzinom eines 65-jährigen Mannes. ATCC Nummer: CRL-1420
ASPC	Kultiviert aus einem Adenokarzinom des Pankreas einer 62-jährigen Frau. ATCC Nummer: CRL-1682

**Tabelle 14: Uteruskarzinom Zelllinie**

<b>Zelllinie</b>	<b>Kultivierung</b>
Kle	Epitheliale Zelllinie, kultiviert aus einem schlecht differenzierten Adenokarzinom des Endometriums einer 64-jährigen Frau.

	ATCC-Nummer: CRL-1622
--	-----------------------

#### 4.9 Kulturmedien

Alle aufgeführten Kulturmedien wurden von der Firma PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) bezogen.

**Tabelle 15: Kulturmedien**

Zelllinie	Zusammensetzung des Kulturmediums
AGS, SW 480, HT 29, HTC 116 und SW 620	500 ml DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium), 50 ml FBS (fetal bovine serum), 5ml Penicillin-Streptomycin (1 %), 500 µl Amphotericin B, 5 ml Glutamin
AsPc	500 ml RPMI1640 mit L-Glutamin, 50 ml FBS, 5 ml HEPES (1 M), 5 ml Penicillin-Streptomycin (1 %), 5 ml MEM-Puffer (Minimum Essential Medium), 500 µl Amphotericin
MKN-45	500 ml RPMI1640 mit Glutamax, 50 ml FBS, 5 ml Penicillin-Streptomycin (1 %), 500 µl Amphotericin
MiaPaca	500 ml DMEM, 12,5 ml Horse Serum, 50 ml FBS, 5 ml Penicillin-Streptomycin (1 %), 5 ml Sodium Pyruvat, 500 µl Amphotericin
Kle und LOVO	500 ml DMEM + Ham`s F12 (1:1), 50 ml FBS, 5 ml Penicillin-Streptomycin (1 %), 500 µl Amphotericin

## **5 Methoden und Patienten**

### **5.1 Zellkultur**

Alle verwendeten Zelllinien wurden von der Europäischen Zellkultursammlung (ECACC) und der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Kultiviert wurden fünf humane Kolonkarzinom Zelllinien (SW 480, SW 620, HT 29, HTC 116 und LOVO), zwei Magenkarzinom Zelllinien (AGS und MKN-45), zwei Pankreaskarzinom Zelllinien (MiaPaca und ASPC) und eine Uteruskarzinom Zelllinie (Gregory, Barlow et al.), deren Herkunft unter 4.8 beschrieben ist.

Alle Zelllinien wurden in einem Zellkultur-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Das Wechseln der oben angegebenen Zellkulturmedien erfolgte drei mal pro Woche, bis der Boden der Zellkulturflaschen konfluent mit Zellen bewachsen war. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit 5 ml phosphatgepufferter Lösung (PBS) gespült, mit 5 ml Trypsin-haltiger PBS-Lösung behandelt und auf frische Zellkulturflaschen verteilt.

### **5.2 Patienten**

Das für die Untersuchungen verwendete humane Gewebe entstammt der Tumorgewebe-Bank der Chirurgischen Klinik I der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (CBF). Sowohl Gewebeentnahme als auch die durchgeführten Untersuchungen wurden von der Ethikkommission, CBF, Charité, Universitätsmedizin Berlin am 08.01.2001 genehmigt. Die Entnahme der Proben erfolgte nach ausführlicher Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Patienten (siehe Studieninformations- und Aufklärungsbogen im Anhang). Sämtliche Gewebeproben wurden aus datenschutzrechtlichen Gründen anonymisiert.

Aus dem Tumorbankkollektiv wurden 67 Gewebelöcke ausgewählt, welche von Patienten stammen, die an der Chirurgischen Klinik aufgrund eines kolorektalen Karzinoms operiert wurden. Nach intraoperativer Entnahme des Tumors wurde das Material unverzüglich in das Institut für Pathologie der Charité, CBF gebracht. Das Präparat wurde *ex situ* längs der taenia libera eröffnet und die luminale Seite des Darmes mit Wasser gespült. Von einem Pathologen wurde jeweils Tumorgewebe

und korrespondierendes, makroskopisch tumorfreies Gewebe entnommen. Beide Proben sind unmittelbar postoperativ sowohl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in der Tumorbank der Chirurgischen Klinik unter konstanten Bedingungen bei 80 °C stabil gelagert, als auch für die Immunhistochemie (IHC) formalinfixiert und in Paraffin eingebettet worden. Die histologische Beurteilung des kolorektalen Tumorgewebes wurde durch die Klinik für Pathologie anhand von in Paraffin eingebetteten Schnitten auf Tumorstadium und Differenzierungsgrad hin beurteilt.

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv umfasst zwei verschiedene Gruppen von Patienten, da die zum Teil kleinen kolorektalen Tumorproben nicht in ausreichendem Maße für mehrere Versuchsreihen zur Verfügung standen und so die Methode der IHC an einem anderen, jedoch vergleichbaren Patientenkollektiv, vorgenommen werden musste.

### **5.3 Makrodissektion**

Von den bei -80 °C gelagerten Gewebelöcken des Patientengewebes mit Tumor- und gesundem Kolonepithel wurden mittels Gefriermikrotom 6-8 µm dicke Schnitte aus Tumorprobe- und korrespondierendem Normalgewebe gefertigt und je ein Kontrollschnitt mit Hämatoxylin-Eosin (siehe 5.5.5) gefärbt. Die angefertigten Präparate wurden durch einen Pathologen beurteilt und sichergestellt, dass in der Gewebeprobe das Tumorgewebe überwog (>90 %), keine großen Nekroseareale sowie im Normalgewebe mikroskopisch keine Tumorzellen vorhanden waren. Nach Markierung der tumortragenden Gewebeabschnitte wurden von den Blöcken 10-15 Schnitte von 20 µm Dicke angefertigt und die tumorhaltigen Gewebeabschnitte mit einem Skalpell disseziert. Alle 200 µm wurden erneut 6-8 µm dicke Schnitte angefertigt, um die Flächengröße des Tumors und des Normalgewebes zu kontrollieren. Die Dissektate wurden sofort in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und zur RNA Isolierung mit 350 µl RA1 Lysepuffer des NucleoSpin® RNA II Kits (siehe 5.4.1) versetzt, zur weiteren Verarbeitung mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C konserviert. Die Verarbeitung der korrespondierenden Blöcke mit Normalgewebe erfolgte auf die gleiche Weise.

## **5.4 Methoden zur RNA-Analyse**

### **5.4.1 RNA-Isolierung aus humanem Gewebe und Zelllinien**

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den makrodissezierten Zellen des humanen Gewebes und den kultivierten humanen Zelllinien wurde mit Hilfe des NucleoSpin® RNA II Kits durchgeführt. Das Funktionsprinzip des Kits beruht darauf, dass RNA Moleküle der aufgeschlossenen Zellen an eine Membran binden, von der sie nach mehreren Waschschrritten mit Wasser eluiert werden. Dabei erfolgt ein Ausschluss von stark fragmentierten RNA Molekülen mit einer Länge <200 bp. Zur Eliminierung genomischer DNA wurde zudem nach Herstellerangaben eine DNase Degradierung durchgeführt.

Die bei -80 °C in RA-1 Puffer gelagerten humanen Gewebeproben wurden zur weiteren Verarbeitung auf Eis aufgetaut. Die Anzucht der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der konfluent gewachsenen Zellen wurde das Zellmedium aus den Zellkulturflaschen abgekippt und der Zellrasen mit 5 ml Trypsin-haltiger PBS-Lösung vorsichtig gewaschen. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber abgelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 2 min bei 500 rpm und 5 °C zentrifugiert, wonach der entandene, klare Überstand verworfen wurde.

Die folgenden Schritte liefen sowohl für die Zellen aus den Geweben, als auch für die Zellen aus den Zelllinien gleich ab. Zur Lyse der Zellen wurden 3,5 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt und der Ansatz für 30 s im Vortex-Mixer homogenisiert. Zum Herabsetzen der Viskosität und zur Reinigung des Lysats wurden die Proben in der NucleoSpin Filtrationseinheit für 1 min bei 11000 rpm in Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Hinzufügen von 350 µl Ethanol (70 %) und 30 s vermischen am Vortex-Mixer wurden die Proben in die NucleoSpin® RNA II Sammelsäule gegeben, in der die RNA während 30 s Zentrifugation bei 8000 rpm gebunden wurde. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule mit 350 µl Membran Entsalzungspuffer des NucleoSpin® RNA II Kits bei 11000 rpm für 1 min zentrifugiert. Für jede Probe wurden 10 µl DNase I Enzym mit 90 µl DNase Aktivierungspuffer zusammen pipettiert und 95 µl des Gemisches auf die Säule gegeben. Um eine effiziente Funktion des Enzyms, welches gebundene DNA-Stränge hydrolysiert, zu gewährleisten, wurden die Säulen für 15 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase und zur Aufreinigung der Säulen erfolgten drei Waschvorgänge. Nach Hinzugabe von 200 µl RA2 Puffer wurden die Säulen bei 8000 rpm für 30 s, beziehungsweise Hinzugabe von 600 µl RA2 Puffer bei 8000 rpm für 30 s und von 250 µl RA3 Puffer für 2 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Elution der reinen Gesamt-RNA nach Pipettieren von 60 µl RNase-freiem Wasser in die Säulen durch Zentrifugieren für 1 min bei 11000 rpm. Die nun in 60 µl gelöste Gesamt-RNA der humanen Zelllinien, beziehungsweise des humanen Gewebes, wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

#### **5.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure**

Für eine möglichst genaue Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurden die Proben photometrisch gemessen. Dazu wurde die Absorption von UV Strahlen der Wellenlänge 260 und 280 nm bestimmt und so die Konzentration der RNA errechnet. Bei einer Wellenlänge von 260 nm beträgt der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  für RNA und einzelsträngige DNA  $25 \text{ cm}^2/\text{mg}$ . Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz lässt sich somit die Konzentration der RNA mit folgender Formel errechnen:

$$c = E \times 1/\epsilon \times 1/d \rightarrow \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,04 = \text{mg RNA/ml}$$

Anschließend wurde durch Verdünnung mit DMPC Wasser die RNA auf 2 µg pro Ansatz eingestellt.

#### **5.4.3 Synthese der cDNA**

Für die weitere PCR und RT-qPCR musste die aus den Geweben und Zelllinien isolierte, doppelsträngige RNA in einzelsträngige cDNA revers transkribiert werden. Nach Hinzufügen von 1 µl Oligo-dT's, 1 µl dNTP's (10 mM) wurden die Ansätze mit DMPC Wasser auf 18 µl aufgefüllt. Zur Auflösung der Sekundärstruktur der RNA wurde der Ansatz für 5 min bei 65 °C inkubiert, für 5 s bei 8000 rpm zentrifugiert und sofort auf Eis gelagert. Anschließend wurden 5 µl M-MLV-RT Reaktionspuffer (5x) und 1 µl RNase Inhibitor zu den Ansätzen pipettiert. Nach Inkubation für 2 min bei 37 °C, wurde den Proben 1 µl M-MLV-RT (Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse-Transkriptase), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, hinzugefügt. Nach vorsichtigem Vermischen der Proben am Vortex-Mixer wurden diese zur Synthese der cDNA für 1 h bei 37 °C gelagert. Die nachfolgende Inkubation für 15 min bei

70 °C führte zur Inaktivierung des Enzyms. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

#### 5.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode, bei der definierte DNA-Abschnitte über sequenzspezifische Primer vervielfältigt werden. Durch die zyklische Wiederholung der drei Reaktionsschritte Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation nimmt die Zahl der amplifizierten DNA-Abschnitte exponentiell zu. Die hitzestabile DNA-Polymerase, die diese Reaktion katalysiert, kann keine RNA umsetzen. Daher muss die extrahierte RNA zunächst durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Für das Design der Primer wurde das Programm LightCycler Probe Design 2 (Roche Applied Science) verwendet. Die Kriterien für die Sequenz waren ein GC-Gehalt <60 % und eine homogene Sequenz mit wenig repetitiven Nukleotiden.

Die benötigten Komponenten wurden nach dem unten aufgeführten Ansatz zusammen pipettiert und nach einem bereits etablierten Programm im Master Cycler Gradient bearbeitet. Zur Positivkontrolle wurden von allen Zelllinien ebenfalls PCRs mit Primern spezifisch für  $\beta$ -Actin, einem konstitutiv exprimierten Protein, durchgeführt.

**Tabelle 16: PCR Temperaturprogramm**

Reaktionsschritte	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiales Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	35
Primerhybridisierung	58 °C	1 min	
Elongation	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

**Tabelle 17: PCR Pipettierschema pro Probe**

<b>Ingrediens</b>	<b>Volumen</b>
ReadyTag-Mix	12,5 µl
Anitsense Primer 1	1 µl
Sense Primer 2	1 µl
cDNA	2,5 µl
H <sub>2</sub> O	8 µl

Die Überprüfung der PCR erfolgte über ein 1% iges Agarosegel. Dafür wurden 0,5g Agarose in 50ml TAE Puffer aufgekocht, mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und in die vorbereitete Gelkammer gegossen. 10 µl cDNA wurden mit 2 µl Ladepuffer vermischt und in die Taschen des abgekühlten Gels pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V für 1 h in 1x TAE Puffer. Als Marker wurde ein 100 bp Größenmarker von Invitrogen verwendet. Abschließend wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

#### **5.4.5 Real Time PCR (RT-qPCR)**

Die Real-Time-Quantitative PCR (RT-qPCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die im Vergleich zur PCR zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Es ist dabei möglich die Signale fluoreszenz-markierter DNA-Moleküle während eines PCR-Zyklus zu erfassen. Die Farbstoffe werden durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt, welcher über fiberoptische Fasern zu jeder Probe geleitet wird. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I lagert sich an neu synthetisierte doppelsträngige DNA-Moleküle an, von wo aus messbare Fluoreszenzsignale aussendet werem. Die emittierte Fluoreszenz wird dann durch die Faseroptik zurück in eine CCD-Kamera geleitet. Diese Kamera misst in der exponentiellen Phase der PCR alle 2-3 s die Emissionen in einem Bereich zwischen 520 und 620 nm. Ausgewertet werden die Signale mit der Relative Quantification Software (Roche Applied Science), welche die Werte für jeden Zyklus mittelt und gegen die Anzahl der Zyklen in einer Grafik aufträgt.

Da die Quantifizierung der DNA-Menge nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkten, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion beruht, wird als Referenz der so genannte Threshold Cycle oder CT-Wert herangezogen. Der CT-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei welchem die Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt.

In einer Verdünnungsreihe werden bekannte Templatemengen amplifiziert, um den gemessenen CT-Wert anschließend mit der jeweiligen Templatemenge in Beziehung zu setzen. Aus einer daraus erstellten Standardkurve kann bei einem bestimmten CT-Wert auf die Templatekonzentration geschlossen werden. Bei starker Expression eines Gens im Gewebe liegen entsprechend viele cDNA Kopien bei Reaktionsbeginn vor. Bereits nach wenigen Zyklen übersteigt die proportional zur Menge der PCR-Produkte zunehmende Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz und es ergibt sich ein niedriger CT-Wert. Zur Kontrolle der Qualität der verwendeten cDNA und um eventuelle Qualitätsunterschiede bei der Datenauswertung zu relativieren wurde die Expression von *PMM-1* mit untersucht. *PMM-1* (Phosphomannomutase) ist ein sogenanntes Housekeeping Gen, da es konstitutiv, unabhängig vom Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird. Als Referenz und Positivkontrolle für die relative Quantifizierung des *LGR5*-Gehalts wurde bei jeder RT-qPCR-Analyse außerdem cDNA aus Zellen der SW 620 Zelllinie untersucht.

Um zwischen der Amplifikation genspezifischer Abschnitte und unspezifischen Genprodukten, wie etwa häufig auftretenden Primerdimeren treffen zu können, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Da unterschiedliche Gensequenzen auch verschiedene Schmelztemperaturen besitzen, kann überprüft werden, ob auch wirklich der gesuchte DNA-Abschnitt vervielfältigt wurde. Abb. 8 zeigt die graphische Darstellung der Schmelzkurven eines Patienten, in der die Peaks von *LGR5* und *PMM-1* zu erkennen sind.

Bei der relativen Quantifizierung wird der Grad der Expression des Target-Gens mit dem des Housekeeping-Gens in Beziehung gesetzt. Es wird dabei nicht die absolute Anzahl der Kopien bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein zweites, ubiquitär homogen exprimiertes Gen bezogen. Vorteile dieser Methode liegen in der Verminderung der Varianz der Expressionsgrade, da verschiedene Mengen bei RNA-Extraktion oder eine

unterschiedlich effiziente reverse Transkription in gleicher Weise Zielgen, wie auch Housekeeping-Gen betreffen.

Zur Durchführung wurden die Proben auf Eis aufgetaut und nach dem unten beschriebenen Ansatz pipettiert. Nach vorsichtigem Durchmischen mittels Vortex-Mixer, wurden 10 µl des Master SYBR Green (10x) Enzyms hinzugefügt, die Lösung in die vorgekühlten Reaktionskapillare überführt und bei 3000 rpm für 5 s zentrifugiert. Die RT-qPCR-Reaktion wurde mit dem Lightcycler System 2.0 (Roche Applied Science) durchgeführt. Nach einer initialen Aktivierungsphase von 15 min bei 95 °C, folgten in 45 Zyklen die Denaturierungsphase bei 94 °C für 15 s, die Annealingphase bei 60 °C und die Elongation bei 72 °C für 30 s. Nach einer abschließenden Melting-Curve-Phase, bei der von 95°C schnell auf 60 °C abgekühlt und innerhalb von 10 min wieder auf 95 °C erwärmt wird, wurden die Proben auf 40 °C heruntergekühlt. Für die Bestimmung des CT-Wertes und die Quantifizierung der Ergebnisse wurde die Relative Quantification Software benutzt.

**Tabelle 18: RT-qPCR Temperaturprogramm**

<b>Reaktionsschritte</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
Aktivierung	95 °C	15 min	
Denaturierung	94 °C	15 s	45
Primerhybridisierung	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Melting Curve	95 °C auf 60 °C 60 °C auf 95 °C	10 min	
Abkühlung	40 °C	∞	

**Tabelle 19: RT-qPCR Pipettierschema pro Probe**

<b>Ingrediens</b>	<b>Volumen</b>
Master SYBR Green (10x)	12,5 µl
Magnesiumchlorid	0,8 µl
Anitsense Primer 1	0,5 µl
Sense Primer 2	0,5 µl
cDNA (1:5)	10 µl
H <sub>2</sub> O	2,2 µl

Im Rahmen der Genexpressionsanalyse kann es zu Differenzen bei der Bestimmung des Schwellenwertes für das Ziel- und das Referenzgen kommen. Ursächlich dafür sind neben der unterschiedlichen Probenqualität, ein variables Annealing der Proben und eine verschiedene Qualität des verwendeten Farbstoffes bei unterschiedlichen Produktionschargen. Zur Reduzierung dieser variablen Störgrößen wurden die Ergebnisse durch Mitbestimmung eines Kallibrators normalisiert. Verwendet wurde dafür revers transkribierte cDNA der SW 620 Zelllinie. Die normalisierte relative Konzentrations-Ratio ergibt sich demnach aus dem Quotienten vom Verhältnis des Medians Zielgen/Referenzgen der Probe und des Medians vom Verhältnis Zielgen/Referenzgen des Kallibrators SW 620.

## **5.5 Methoden zur Protein-Analyse**

### **5.5.1 Protein-Isolierung aus humanem Gewebe und Zelllinien**

Zur experimentellen Analyse wurden Proteine sowohl aus den Zelllinien als auch aus Gewebestücken isoliert. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der Zellen wurde das Zellmedium aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellrasen mit 10 ml eiskaltem PBS vorsichtig gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in 5 ml PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde

daraufhin in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 2 min bei 500 rpm und 5 °C zentrifugiert.

Um die intrazellulären Proteine in Suspension zu bringen, war es notwendig die Zellen zu lysieren. Nach Hinzugabe von 400 µl des Protein-Lyse-Puffer/Proteaseinhibitor-Ansatzes zum Zellpellet und vorsichtigem Vermischen mittels Vortex-Mixer wurde die Zellsuspension in eine Insulinspritze mit 20 G Kanüle 10 mal aufgezogen. Diese Technik zur mechanischen Zerstörung der Zellmembranen wurde nachfolgend 10 mal mit 22 G- und 10 mal mit 23 G-Kanülen durchgeführt. Das so homogenisierte Zelllysate wurde anschließend für 30 s am Vortex-Mixer vermischt, für 30 s im Ultraschallbad auf Eis gekühlt und auf der "Rocking Platform" bei 150 rpm für 15 min inkubiert. Zellreste wie Membranen, Zytoskelett, RNA oder DNA bildeten nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4 °C mit 10000 rpm auf dem Boden des Eppendorfgefäßes ein Pellet, während die Proteine sich in dem klaren Lyse-Puffer über dem Pellet befanden. Dieser Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, aliquotiert und eingefroren bei -20 °C gelagert.

### **5.5.2 Photometrische Proteinquantifizierung**

Zur Ermittlung der Proteinmenge in den Zelllysaten wurden das Bio Photometer (Eppendorf) und das Proteinbestimmungs-kit QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich Chemie) verwendet. Das Prinzip der Methode beruht auf der durch Proteine katalysierten Reduktion zweiwertigen Kupfers ( $\text{Cu}^{2+}$ ) zu einwertigem Kupfer ( $\text{Cu}^{1+}$ ). Das entstehende  $\text{Cu}^{1+}$  bildet mit der hinzugefügten Bizinchoninsäure einen farbigen Komplex und somit die Absorption der Proteinlösung bei 562 nm als direkt proportional zur Proteinkonzentration angenommen werden kann. Entsprechend der Herstellerangaben, wurden aus dem Kit jeweils 2,5 ml QuantiPro Puffer QA und QuantiPro BCA QB zusammen pipettiert und 100 µl 4 % Copper(II) Sulfatpentahydrat hinzugefügt. 100 µl des Ansatzes wurden mit 100 µl des Zelllysats versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Durch eine geometrische Verdünnungsreihe einer Proteinstandardlösung (1 µg/µl BSA) des Kits wurde eine Proteinstandardkurve erstellt und so die Proteinkonzentration der einzelnen Lysate berechnet.

### 5.5.3 Western Blot-Analyse

Zur Charakterisierung von LGR5 auf Proteinebene wurden die Proteine elektrophoretisch mittels SDS-Page nach Größe fragmentiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für den LGR5 Nachweis in 7,5 %- und für den  $\beta$ -Aktin Nachweis in 10 %igem Acrylamidgel jeweils mit 30  $\mu$ g Protein. Als Größenmarker diente der PageRuler Prestained Protein Marker der Firma Fermentas. Die Gele wurden in der Elektrophoresekammer mit dem angesetzten Laufpuffer überschichtet und für 1,5 h bei 100 V angeschlossen.

Für den Western Blot müssen die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nylonmembran überführt werden. Durch ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld wandern die Proteine aus dem Gel auf die Membran und behalten dort aufgrund ihrer hydrophoben Wechselwirkungen das Muster der elektrophoretischen Auftrennung. Durch den Einsatz eines *LGR5*-spezifischen Antikörpers und eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers kann so das Zielprotein spezifisch nachgewiesen werden. Anders als bei der IHC (siehe 5.5.4) katalysiert eine Peroxidase eine sogenannte Chemilumineszenzreaktion, bei der Licht emittiert wird. Für den Transfer der Proteine auf eine Membran, wurde zunächst eine PVDF Membran (Polyvinylidendifluorid) auf die Größe der Trenngele zurechtgeschnitten, in Ethanol (100 %) für 5 min äquilibriert und im angesetzten Transfer Puffer für 5 min inkubiert. Der Blotting-Tank wurde wie folgt von der schwarzen Kathodenseite luftblasenfrei beschichtet:

- |                 |                 |
|-----------------|-----------------|
| 1. Schwamm      | 4. PVDF-Membran |
| 2. Filterpapier | 5. Filterpapier |
| 3. Gel          | 6. Schwamm      |

Der Proteintransfer erfolgte unter konstantem Stromfluß bei 100 V und 4 °C für 1 h. Nach Beendigung des Transfers wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in einer 5 % Milchpulverlösung (5 % Magermilchpulver in TBS/T) bei Raumtemperatur blockiert. Vor dem Einsatz der Antikörper wurde dann die Membran erneut für 2 h in vorab angesetzter BSA-Lösung (5 %) inkubiert.

Die Antikörper wurden für den Primärantikörper mit der BSA-Lösung 1:500 verdünnt, während für den Sekundärantikörper die Blockierungslösung (1 %) aus dem verwendeten Kit in 1:1000 Verdünnung verwendet wurde. Nach Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde die Membran 3 mal mit 15 ml TBS/T gewaschen und schließlich der primäre Antikörper über einen sekundären, Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper nachgewiesen. Dazu wurden aus dem Lumilight Western Blotting Kit (Roche-Applied Science), entsprechend der Herstellerangaben, 1 g Blockierungsreagenz in 100 ml TBS/T gelöst und zu 15 ml der Lösung 15 µl des anti-rabbit Sekundärantikörpers pipettiert. Nach 1,5 h Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die untersuchten Membranen erneut 3 mal in 15 ml TBS/T gewaschen. Die Detektion erfolgte in einer Fuji Intelligent Dark Box mittels Fujifilm LAS-1000 Kamera (Fuji Photo Film). Dazu wurden, entsprechend der Herstellerangaben, 4 ml Stable Peroxidase Sodium mit 4 ml Luminol aus dem verwendeten Kit vermischt und die Membranen in der Reagenz inkubiert. Abschließend wurden alle Western Blots mit einer Belichtungszeit von 10 s fotografiert, eingescannt und mittels Fujifilm Quantifizierungssoftware LAS-1000 ausgewertet.

## **5.5.4 Immunhistochemie (IHC)**

### **5.5.4.1 Prinzip der immunhistochemischen Färbung**

Beim immunhistochemischen Nachweis können Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht und somit eine Aussage darüber getroffen werden, in welchen Geweben das Protein vorhanden ist, und in welchen Kompartimenten der Zelle es exprimiert wird. Der Antikörper ist an ein Detektionssystem gekoppelt, das den Nachweis einer erfolgten Antigen-Antikörper-Reaktion möglich macht.

Die im Rahmen der Untersuchungen eingesetzte Labelled-Biotin-Streptavidin-Methode beruht auf der starken Affinität des Streptavidins zum Vitamin Biotin. Streptavidin ist ein Glykoprotein, welches aus vier identischen Untereinheiten mit jeweils einer Biotin-Bindungsstelle besteht. Nachdem die Bindung eines unkonjugierten Anti-LGR5 Primär-Antikörpers an das Gewebsantigen erfolgt ist, wird eine Inkubation mit einem biotinylierten Sekundär-Antikörper vorgenommen. An diesen kann im dritten Schritt der enzymmarkierte Streptavidinkomplex binden. Ein zugegebenes Substrat wird oxidiert und somit lichtmikroskopisch sichtbar.

#### **5.5.4.2 Anfertigung der Schnitte**

Die immunhistochemische Analyse für LGR5 wurde in Formalin fixierten und paraffinisierten Gewebeproben durchgeführt, aus denen am Rotationsmikrotom 3 µm dicke Schnitte angefertigt wurden.

Zur Behandlung der Objektträger, wurden 5 g Gelatine in 1 l destilliertem Wasser bei 37 °C aufgelöst. Nach dem Erhitzen der Lösung auf 42 °C, wurden 0,5 g Chromium III Kaliumsulfat Dodecahydrate (98 %) hinzugefügt. Nach etwa 4 weiteren Stunden Abkühlung bis auf Raumtemperatur wurde der Ansatz filtriert, die Objektträger für jeweils 5 min in die Lösung getaucht und anschließend für 24 h bei 37 °C getrocknet.

#### **5.5.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)**

Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin, eine histologische Routinefärbung, wurde bei allen angefertigten Schnitten durchgeführt. Während Hämatoxylin die Zellkerne blau färbt, dient Eosin der Kontrastierung und färbt das Zytoplasma rot. Die Schnitte wurden für 5 min in Hämatoxylin gehalten und nach dem sogenannten „Bläuen“, dem Spülen für 5 min in Leitungswasser, in Eosin 5 min zur Kontrastierung inkubiert. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte für jeweils 2min in eine aufsteigende Ethanolreihe gegeben (70 %, 96 % und 100 %). Nach anschließender Inkubation der gefärbten Präparate in Xylol für 2x5 min wurden sie mit dem Roti-Histokit eingedeckt und getrocknet.

#### **5.5.4.4 Färbung der Schnitte**

Die angefertigten Schnitte wurden 3 mal 5 min in Xylol entparaffinisiert, in absteigenden Alkoholbädern (100 %, 96 % und 70 %) für jeweils 5 min entwässert und in destilliertem Wasser für 5 min rehydriert. Anschließend wurden diese mit 0,01 % EDTA-Lösung (pH 8) in der Mikrowelle für 5 min bei 800 W (Watt) erhitzt, gefolgt von 5 min bei 200 W. Nach einer Abkühlphase von 25 min wurden die Präparate zur Blockierung der endogenen Peroxidase in 1 %igem Wasserstoffperoxid für weitere 25 min inkubiert. Es folgten weitere Inkubationen in PBS Tween Lösung für 5 min und in Blocking Medium (10x) für 5 min, um unspezifische Antigene zu binden und eine optimale Wirkung des Antikörpers zu gewährleisten.

Eine optimale Färbung ließ sich mit einer 1:150 Verdünnung des Primärantikörpers in Antikörper Verdünnungspuffer und Inkubation für 30 min bei 37 °C erzielen. Als Negativkontrolle wurden Schnitte mit dem Verdünnungspuffer anstelle des Primärantikörpers unter sonst gleichen Bedingungen inkubiert. Nach weiterem Waschen der Präparate in PBS Tween 3 mal für 5 min, folgte die Behandlung mit dem biotinhaltigen anti-rabbit Sekundärantikörper (1:200) für 30 min bei 37 °C. Erneut wurden die Schnitte für 3 mal 5 min in PBS Tween gewaschen und mit dem Streptavidin-Peroxidase Komplex für 30 min bei 37 °C behandelt und 3 mal für 5 min in TBS gespült. Für die Farbentwicklung wurden die behandelten Präparate für 5 min mit dem Substrat DAB behandelt, anschließend 3 mal 5 min mit TBS gewaschen und mit Hämalaun Färbelösung nach Meyer für 30 s gegengefärbt. In aufsteigenden Alkoholbädern (70 %, 96 % und 100 %) für jeweils 2 min und 2 mal 5 min Inkubation in Xylol erfolgte die Rehydratation. Abschließend wurden alle Schnitte in Roti Histokit fixiert und lichtmikroskopisch ausgewertet.

## **5.6 Semiquantitative Bestimmung der Proteinexpression (IHC)**

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie, CBF, semiquantitativ mit Bewertung der Intensität und des Anteils der gefärbten Zellen im Präparat, analog zu anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe CRC des CBF (Lauscher, Loddenkemper et al. 2007) Bezüglich des Anteils der gefärbten Zellen, entspricht 0: 0 % positiv angefärbter Tumorzellen; 1: 1 bis 49 % positiver Tumorzellen; 2: 50 bis 70 % positiver Tumorzellen; 3: mehr als 70 % angefärbter Zellen. Die Intensität der zytoplasmatischen und nukleären Färbung wurde mit 0 für nicht, 1 für schwach, 2 für mittelgradig und 3 für stark gefärbt bewertet.

## **5.7 Statistische Methoden**

Wie unter 5.2 beschrieben, umfasst die vorliegende Arbeit 2 verschiedene Patientenkollektive, da die zum Teil kleinen kolorektalen Tumorproben nicht in ausreichendem Maße für mehrere Versuchsreihen zur Verfügung standen. Die Methoden der RT-qPCR, WB und IHC wurden auf unterschiedlichen Skalen gemessen, die teilweise ordinal sind. Zur statistischen Analyse wurden daher nichtparametrische Verfahren verwendet, da die Normalverteilungsannahme bei rein ordinalen Merkmalen nicht plausibel ist. Zuerst wurde für jede Methode

getrennt untersucht, ob signifikante Unterschiede der LGR5 Expression zwischen Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe vorlagen. Das geeignete statistische Verfahren dafür ist der Wilcoxon-Test, welcher ein nichtparametrisches statistisches Testverfahren darstellt. Es kann somit untersucht werden, ob bei zwei abhängigen Stichproben gleichen Umfangs, hinsichtlich einer ordinal skalierten Zufallsvariablen, dieselbe Verteilung zugrunde liegt (Eckstein 1997).

Die Methoden RT-qPCR und Western Blot wurden auf ein Patientenkollektiv angewandt. Um zu überprüfen, ob die ermittelten Verhältnisse von Tumor- zu Normalgewebe bei den beiden Methoden gleichläufig sind, wurde die Korrelation nach Spearman angewendet. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman ist eine statistische Messzahl für einen monotonen Zusammenhang zwischen zwei metrischen Variablen. Er kann dabei Werte zwischen -1 und +1 annehmen, je größer bzw. kleiner (negativ) der Wert dabei ist, desto stärker ist der monotone Zusammenhang. Ist der Korrelationskoeffizient 0 so besteht kein monotoner Zusammenhang.

Es gibt zusätzlich vier Gruppenvariablen für die überprüft werden soll, ob es in den Gruppen Unterschiede hinsichtlich des Verhältnisses von Tumor- zu Normalgewebe gibt: Geschlecht des Patienten, UICC-Stadium, Grading und Ort des Tumors. Das dafür geeignete statistische Verfahren ist der Mann-Whitney-U-Test, welcher ein nichtparametrisches statistisches Testverfahren darstellt, durch das überprüft werden kann, ob sich die zentrale Tendenz hinsichtlich einer ordinal skalierten Zielvariablen in den Gruppen unterscheidet (Bortz 2003). Ein Test liefert signifikante Ergebnisse, wenn der P-Wert kleiner gleich (standardmäßig) 0,05 ist. Ein statistischer Vergleich der Methoden (RT-qPCR/WB vs. IHC) aus Patientenkollektiv 1 mit der aus Patientenkollektiv 2 ist nicht möglich, da unterschiedliche Skaleneinteilungen vorliegen bzw. die Patienten nicht zu ein und demselben Patientenkollektiv gehören. Zur statistischen und deskriptiven Analyse sowie zur graphischen Darstellung der Daten wurden die Programme SysStat 12 und SigmaPlot 10.0 verwendet. Die Tabellen mit den Ergebnissen der statistischen Analyse befinden sich im Anhang der Arbeit.



## 6 Ergebnisse

### 6.1 Die Expression von LGR5 in Tumorzelllinien

#### 6.1.1 RNA-Expression in der RT-PCR

Die Analyse der *LGR5* Expression auf Ebene der RNA erfolgte zunächst in Tumorzelllinien mittels RT-PCR, um so geeignete Zelllinien für die Positivkontrolle der darauffolgenden RT-qPCR und der Western Blots zu finden.



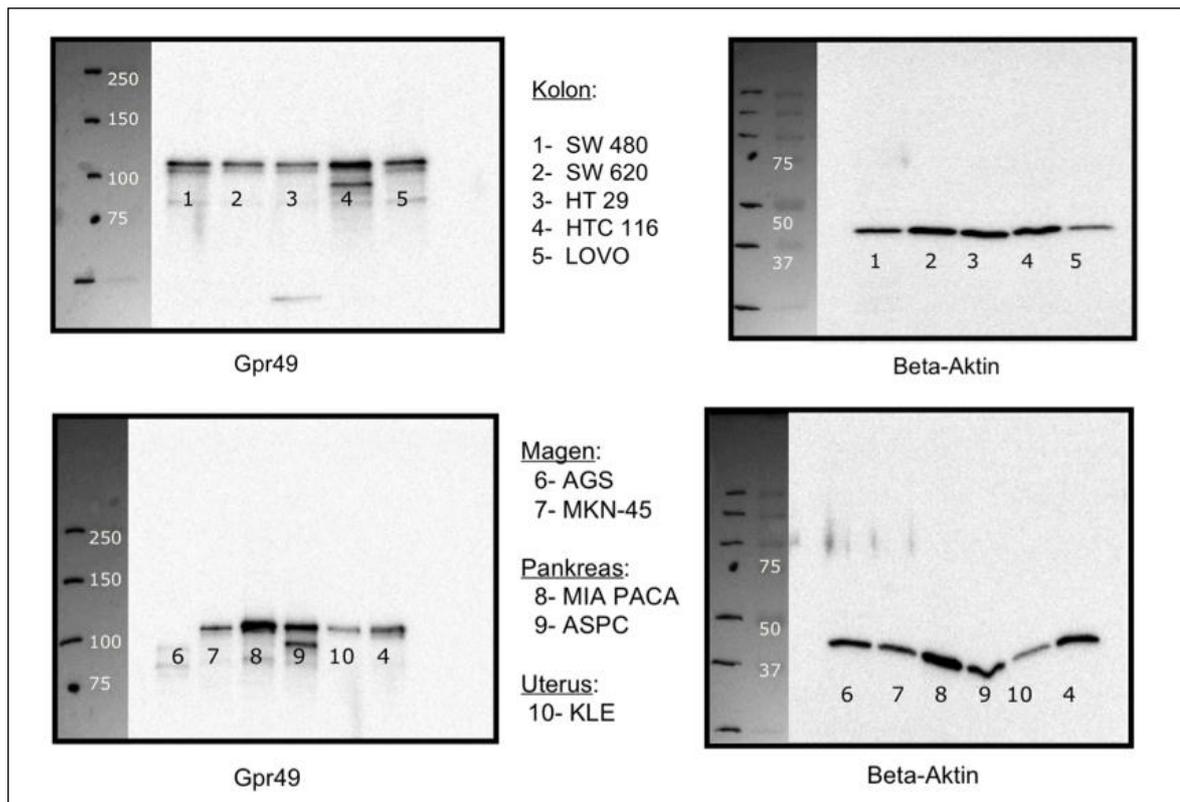
**Abbildung 6: RT-PCR der Tumorzelllinien.** Aufgetragen wurden die Proben der verschiedenen Karzinom-Zelllinien und der 100 bp DNA Leiter (6). Im oberen Bildteil wurde ein LGR5-spezifischer Primer verwendet. Im unteren Bildteil, ein Beta-Aktin spezifischer Primer (Kontrolle). 9 der 10 Zelllinien zeigen im Bereich von 500 bp eine Bande, entsprechend der Größe der vervielfältigten DNA. Einzig die Magenkarzinom-Zelllinie AGS (8) weist keine Bande auf.

Bei den CRC-Zelllinien LOVO (1), HTC 116 (2), HT 29 (3), SW 620 (4) und SW 480 (5), der Uteruskarzinom-Zelllinie KLE (7), den Pankreaskarzinomlinie ASPC (9) und MIA PACA (11), sowie bei der Magenkarzinom-Zelllinie MKN-45 (10) ist in dem oberen Bildteil (*LGR5*) jeweils in der zu erwartenden Höhe bei 500 bp eine Bande zu sehen. Einzig die aufgetragene Probe der Magenkarzinom-Zelllinie AGS (8) zeigt keine Bande im Bereich von 500 bp und somit keine RNA Expression. In dem unteren Bildteil der Abbildung 6 ist die Positivkontrolle der RT-PCR mittels dem „Housekeeping-Gen“ Beta-Aktin zu sehen. Alle Zelllinien zeigen hier eine Bande in der für Beta-Aktin zu erwartenden Größe von 500 bp. Es ist somit davon

auszugehen, dass bis auf die Magenkarzinom Zelllinie AGS alle verwendeten Zelllinien *LGR5*-RNA enthalten.

### **6.1.2 Protein-Expression im Western Blot**

Um die differentielle Expression auch auf Proteinebene zu verifizieren, wurden mit den gleichen Zelllinien Western Blots durchgeführt. Die Kontrolle erfolgte dabei ebenfalls mit Beta-Aktin. Analog zu der RT-PCR zeigen auch im Western Blot neun der zehn Zelllinien eine Bande auf der zu erwartenden Höhe des *LGR5*-Proteins. Einzig die AGS-Zelllinie (6) zeigt nur eine Bande in der Beta-Aktin Kontrolle, nicht jedoch in dem *LGR5*-spezifischen Versuch. Zusätzlich wurde in Probe 4 (HTC 116) und in Probe 9 (ASPC) ein Degradationsprodukt unterhalb der für *LGR5* spezifischen Bande detektiert. Analog zur RT-PCR enthalten demnach, außer die Magenkarzinomzelllinie AGS, die erneut die Ausnahme bildet, alle verwendeten Zelllinien das *LGR5*-Protein.



**Abbildung 7: Western Blots der Tumorzelllinien.** Dargestellt ist die Expression von LGR5 in Zelllinien. Verwendet wurde als Erstantikörper ein Rabbit-Anti-LGR5 spezifischer Antikörper (1:1000). Die auf der linken Seite aufgetragenen Spuren zeigen alle, bis auf die Magenkarzinom-Zelllinie AGS (6), eine Bande im 100 kDa Bereich des aufgetragenen Markers. Erkennbar ist zudem eine zweite Bande bei (4) und (9). Zur Einschätzung der Intensität wurde im unteren Blot die in Vorversuchen auf ihre LGR5 Expression deutlich positiv bewertete Kolonkarzinom-Zelllinie HTC 116 (4) als Positivkontrolle eingesetzt. Auf der rechten Seite ist zur Kontrolle der Western Blot des „Housekeeping Gens“ Beta-Aktin dargestellt. Alle 10 aufgetragenen Spuren zeigen eine Bande im Größenbereich von 45 kDa.

## 6.2 Die Expression von LGR5 in Patientengewebe

Die Quantifizierung der Expression von LGR5 erfolgte an Tumorgewebe von humanen kolorektalen Karzinomen (T) und korrespondierendem Normalgewebe (N) auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR, sowie auf Protein-Ebene mittels Western Blot und IHC.

### 6.2.1 Patienten

Wie unter 5.2 beschrieben, mussten die Methoden aufgrund der zum Teil kleinen Karzinomgewebeblöcke an zwei verschiedenen Patientenkollektiven erfolgen. Insgesamt wurden 41 Patienten, die an einem CRC erkrankt waren, auf ihre

Expression von LGR5 mittels RT-qPCR, Western Blot oder IHC untersucht.

Das mediane Alter des in Tabelle 20 dargestellten Patientenkollektivs 1 beträgt 66,7 Jahre. 25 % oder fünf der Patienten waren männlich, 75 % weiblich, dies entspricht einer Anzahl von 15 Frauen. Im untersuchten Patientengut ließen sich fünf Patienten als UICC Stadien I und II klassifizieren, sechs als Stadium III und vier Patienten konnten dem Stadium IV zugeordnet werden. Davon gehörten sechs Patienten der Gruppe T2N0M0 an, drei Patienten der Gruppe T3N0M0 und ein Patient der Gruppe T4N0M0. Der Gruppe T3N1M0 konnten vier Patienten zugeordnet werden, der Gruppe T3N2M0 zwei Patienten. Ein positiver Metastasenstatus M1, daher einem UICC Stadium IV entsprachen insgesamt vier Patienten. Für neun Patienten wurde der Differenzierungsgrad G2 festgelegt, elf Patienten gehörten zur Gruppe G3. Das Patientenkollektiv 1 umfasst zwölf Kolonkarzinome und acht Rektumkarzinome.

**Tabelle 20: Übersicht Patientenkollektiv 1 der RT-qPCR und WB.** Erfasst wurden Geschlecht, Alter, Grading des Tumors, TNM-Klassifikation, UICC-Stadium und Lokalisation des Tumors.

Patienten-Nr.	UICC	T	N	M	m/w	Alter	Grading	Ort
1	3	3	1	0	w	86	3	Kolon
2	3	3	1	0	w	71	2	Rectum
3	2	3	0	0	w	65	2	Rectum
4	1	2	0	0	w	38	2	Rectum
5	1	2	0	0	m	50	2	Rectum
6	1	2	0	0	m	51	2	Kolon
7	3	3	2	0	w	86	3	Kolon
8	2	3	0	0	w	66	3	Rectum
9	4	3	1	1	w	77	3	Kolon
10	2	3	0	0	m	73	3	Rectum
11	3	3	1	0	m	44	2	Kolon
12	4	4	2	1	w	57	3	Kolon
13	1	2	0	0	w	63	3	Rectum
14	1	2	0	0	w	87	2	Rectum
15	4	3	2	1	w	65	2	Kolon
16	2	4	0	0	w	68	3	Kolon
17	3	3	2	0	w	74	3	Kolon
18	2	2	0	0	m	63	2	Kolon
19	3	3	1	0	w	74	3	Kolon
20	4	4	1	1	w	75	3	Kolon

Für den immunhistochemischen *in situ* Nachweis wurden Schnitte von 21 Patienten angefertigt, bewertet und analysiert. Das mediane Alter dieses in Tabelle 20 aufgeführten Patientenkollektivs 2 liegt bei 63,0 Jahren. Acht (38 %) der Patienten waren männlich, 13 (62 %) weiblich. Die Verteilung der UICC-Stadien im untersuchten Patientengut umfasst für das Stadium I vier Patienten, für das Stadium II fünf, den UICC Stadien III und IV konnten jeweils acht und vier Patienten zugeordnet werden. Der Grad der Differenzierung lag bei neun der Patienten bei G2, elf Patienten gehören zur Gruppe G3, ein Patient wurde mit G1 bewertet. Das Patientenkollektiv 2 (Tab. 21) der IHC des humanen Gewebes umfasst 14 Kolonkarzinome und sieben Rektumkarzinome.

**Tabelle 21: Übersicht Patientenkollektiv 2 der IHC.** Erfasst wurden Geschlecht, Alter, Grading des Tumors, TNM-Klassifikation, UICC-Stadium und Lokalisation des Tumors.

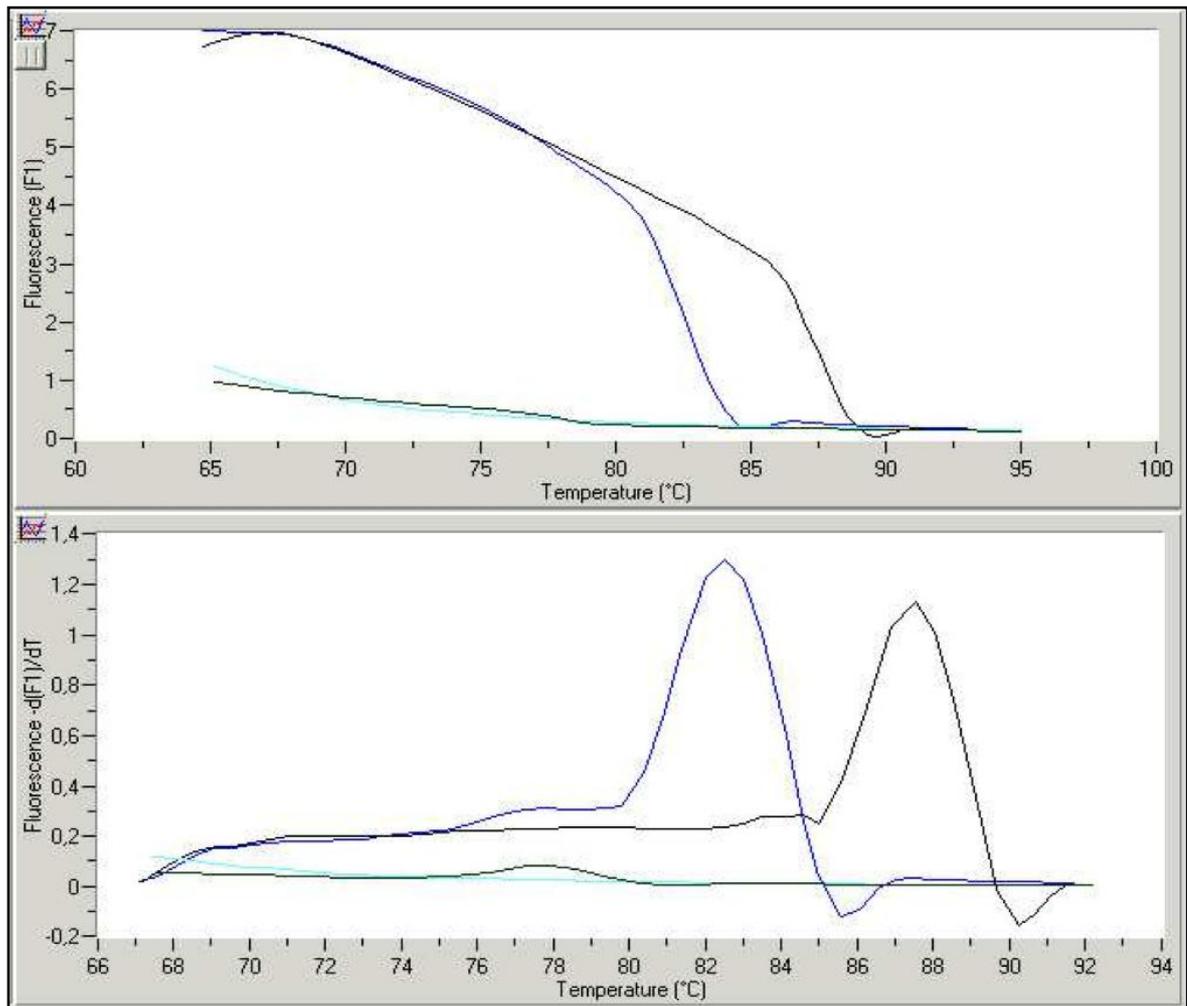
Patienten Nr.	UICC	T	N	M	m/w	Alter	Grading	Ort
1	1	2	0	0	m	76	3	Rectum
2	3	4	1	0	w	63	2	Kolon
3	3	3	1	0	m	49	2	Rectum
4	2	3	0	0	w	39	2	Kolon
5	4	3	2	1	w	76	3	Rectum
6	4	3	2	1	w	70	3	Rectum
7	1	2	0	0	w	87	2	Rectum
8	3	4	1	0	m	82	1	Kolon
9	2	3	0	0	m	61	3	Kolon
10	3	3	2	0	w	84	3	Kolon
11	1	1	0	0	m	55	2	Kolon
12	3	3	1	0	m	42	3	Rectum
13	3	3	1	0	w	57	3	Kolon
14	3	3	2	0	m	76	3	Kolon
15	4	3	0	1	w	62	2	Kolon
16	4	4	1	0	w	84	3	Kolon
17	3	2	2	0	w	62	3	Kolon
18	1	2	0	0	m	67	2	Kolon
19	2	3	0	0	w	77	3	Kolon
20	2	3	0	0	w	60	2	Rectum
21	2	3	0	0	w	59	2	Kolon

## 6.2.2 RNA-Expression in der RT-qPCR

### 6.2.2.1 Schmelzkurvenanalyse und Standardkurve

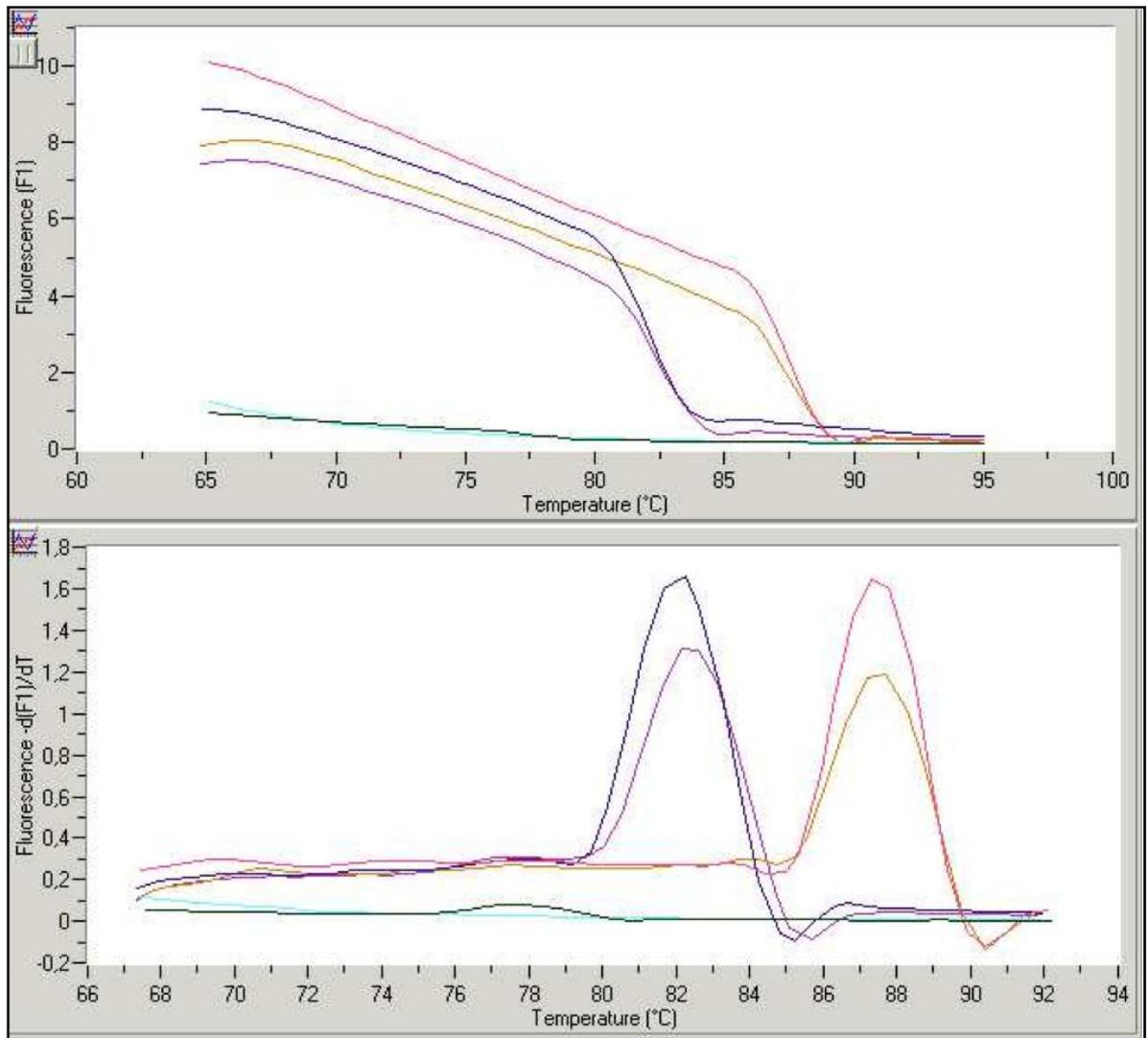
Die Expression von *LGR5* auf RNA-Ebene wurde bei insgesamt 20 Patienten bestimmt, diese Gewebeprobe wurden auch für die Quantifizierung der Proteinexpression genutzt. Abb. 8 – 12 zeigen die graphische Darstellung der verwendeten Relative Quantification (RelQuant) Software.

Um zwischen einer Amplifikation genspezifischer Abschnitte und unspezifischen Genprodukten unterscheiden zu können, sowie die störanfällige Methode der RT-qPCR zu etablieren, wurden, wie bereits unter 5.4.5 beschrieben, Schmelzkurvenanalysen durchgeführt.

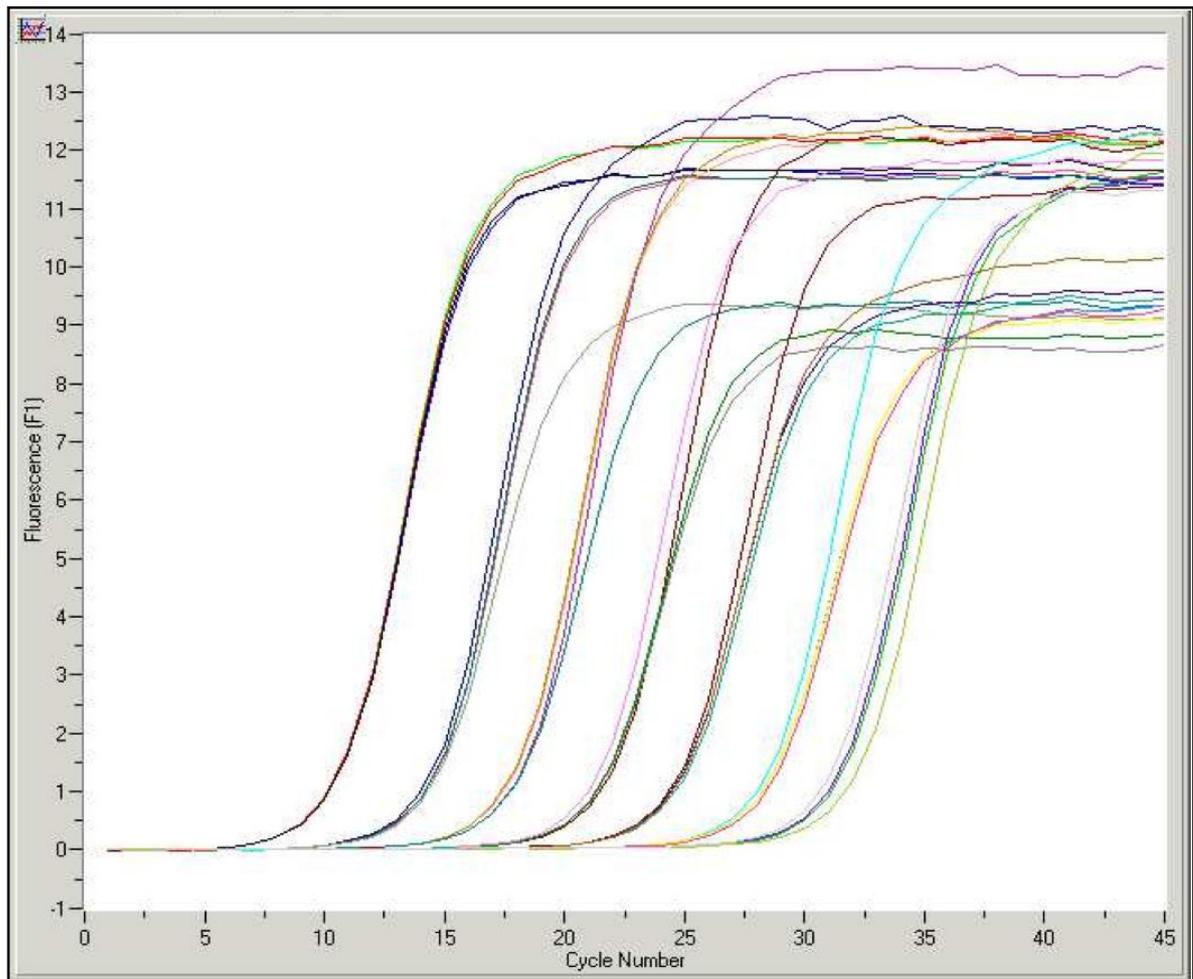


**Abbildung 8: Schmelzkurven der Positiv- und Negativkontrolle.** Aufgetragen sind die Kurven der Schmelzkurvenanalyse im Verhältnis der Fluoreszenz zur Zeit. Die beiden eingipfligen Kurven im unteren Bild zeigen das Target LGR5-SW 620, mit einem Maximum der Fluoreszenz bei 81 °C und des „Housekeeping-Gens“ PMM-1-SW 620 mit einem Maximum bei 87 °C. Die beiden Negativproben LGR5-H<sub>2</sub>O und PMM-1-H<sub>2</sub>O verlaufen konstant bei nicht messbarer Fluoreszenz.

Abb. 8 zeigt exemplarisch Schmelzkurven von LGR5-SW 620 (mit einem Maximum der Fluoreszenz bei 81 °C) und des „Housekeeping-Gens“ PMM-1-SW 620 (mit einem Maximum bei 87 °C) aufgezeigt. Die beiden Negativproben LGR5-H<sub>2</sub>O und PMM-1-H<sub>2</sub>O haben bei fehlender Fluoreszenz einen flachen Kurvenverlauf.

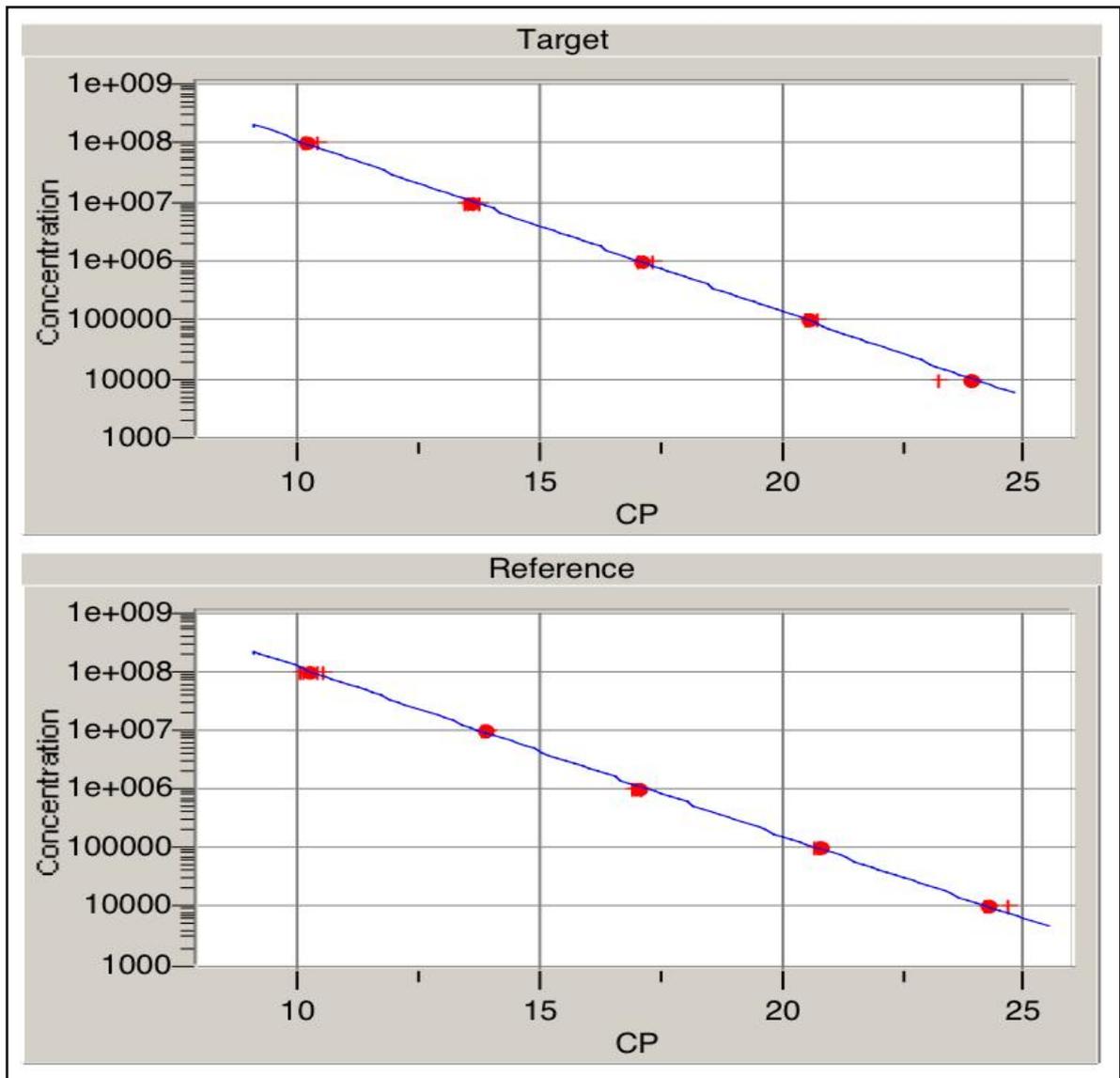


**Abbildung 9: Schmelzkurvenanalyse von Patient 6.** Analog zu Abb. 8 ist diesmal die Schmelzkurvenanalyse eines Patienten dargestellt. Die im unteren Bild zu erkennenden Kurven zeigen LGR5-Tumor- und Normalgewebe, welche vor den Kurven von PMM-1-Tumor und Normalgewebe ansteigen. Die Negativkontrollen zeigen auch hier keine messbare Fluoreszenz.



**Abbildung 10: Verdünnungsreihe der Positivkontrolle SW 620.** Zur Erstellung der Verdünnungsreihe wurde die Ausgangslösung der als Positivkontrolle verwendete CRC-Zelllinie SW 620 in 1:10 Verdünnungsstufen mit DNA freiem Wasser verdünnt und als Probe für die RT-qPCR eingesetzt.

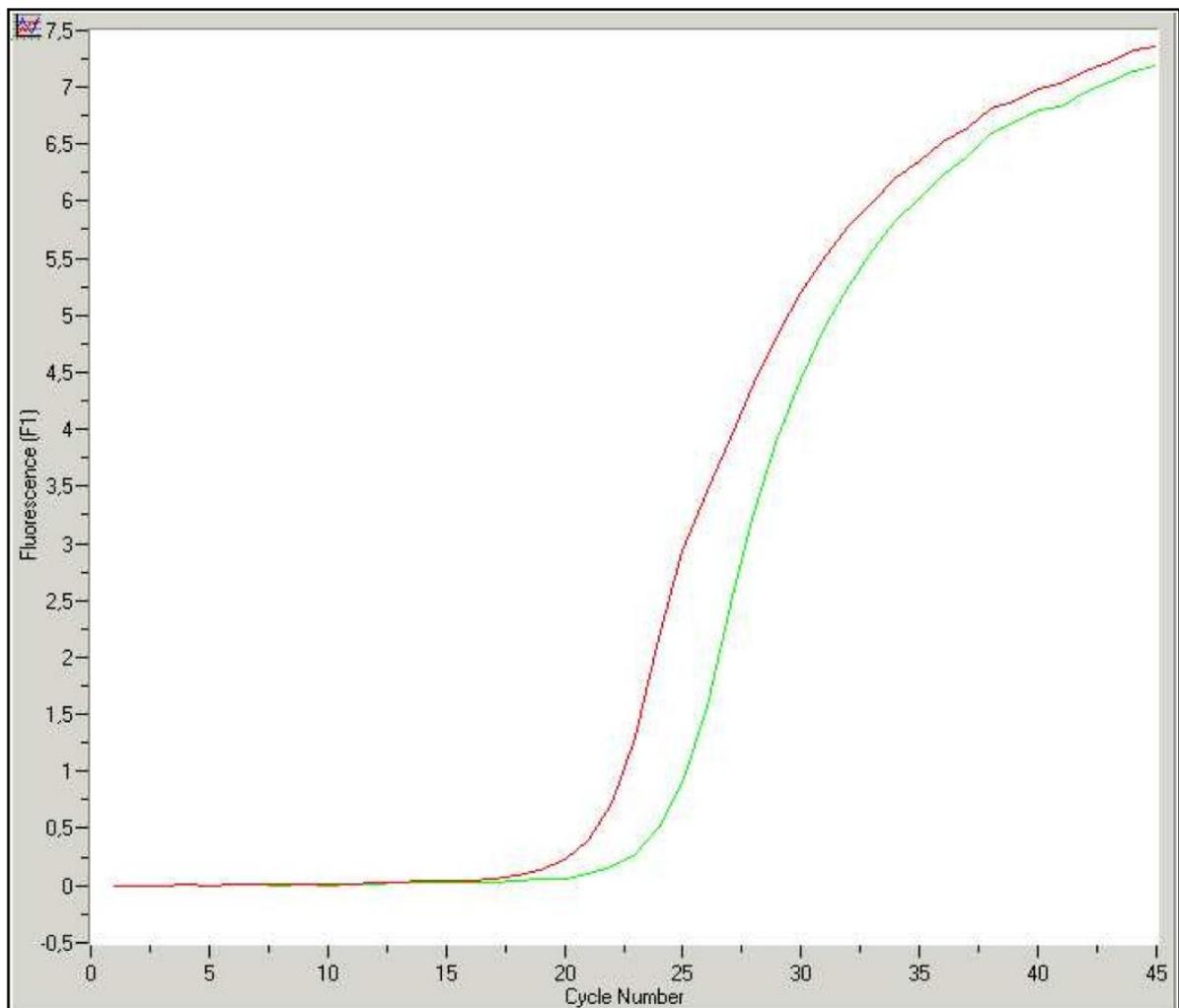
Die Bestimmung der Effizienz der RT-qPCR wurde mit Hilfe einer Standardkurve durchgeführt, die mittels einer Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen der CRC-Zelllinie SW 620 als Positivkontrolle erstellt wurde. Abbildung 10 zeigt den Verdünnungslauf aus dem die Standardkurve in Abbildung 11 erstellt werden konnte. Die einzelnen Verdünnungsstufen der Positivkontrolle werden als Regressionsgerade dargestellt.



**Abbildung 11: Standardkurve der RT-qPCR.** Aus den ermittelten CT-Werten und der Anzahl der Genomkopien wurde aus der Verdünnungsreihe eine Standardkurve errechnet. Anhand dieser Standardkurve konnte dann eine Quantifizierung der *LGR5*-RNA in einer Probe erfolgen und durch die Amplifikation der PMM-1-Sequenzen auch in Relation zur Zellzahl gesetzt werden.

### 6.2.2.2 *LGR5*-Expression der RT-qPCR in Normal- und Tumorgewebe

Es wurden insgesamt 20 Gewebeproben, bestehend aus Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe analysiert. Abbildung 12 zeigt exemplarisch den Verlauf der Kurve zur Quantifizierung eines Patienten. Zu erkennen ist der typische Verlauf einer sigmoidalen Amplifikationskurve eines RT-qPCR Durchgangs.



**Abbildung 12: Quantifizierung einer Patienten-Gewebeprobe.** Der Anschaulichkeit halber ist nur die Quantifizierung von Tumor- (rot) und Normalgewebe (grün) mit *LGR5*-Primer dargestellt. Während die Tumorgewebeprobe einen Amplifikationsanstieg bei 22,2 Zyklen zeigt, steigt die Kurve des Normalgewebes bei 23,81 Zyklen an.

Die gemessene Hintergrundfluoreszenz geht bei etwa 17 Zyklen in die exponentielle Amplifikationsphase über, gefolgt von einer linearen Amplifikationsphase mit abschließender Plateauphase. Die Tumorprobe mit *LGR5*-Primer steigt mit 22,2 Zyklen deutlich früher als die Probe des Normalgewebes an, welche einen Amplifikationsanstieg nach 23,81 Zyklen aufweist. Es liegt somit eine höhere Expression von *LGR5* im Tumor- als im Normalgewebe vor. Aus Gründen der Anschaulichkeit ist auf die Darstellung des Housekeeping Gens *PMM-1* und der Positivkontrolle SW 620 verzichtet worden.

Tabelle 22 zeigt die Analyse desselben Patienten durch die relative Quantifizierung. cDNA der SW 620-Zelllinie als Standard, sowie cDNA von Normal- und

Tumorgewebe wurden jeweils mit *LGR5*- und *PMM-1*-spezifischen Primer in Doppelbestimmung gemessen. Das PCR-Signal des Zielgens im Tumor wird durch die Relative Quantification Software ins Verhältnis zum gesunden Gewebe gesetzt und auf das Referenzgen *PMM-1* normalisiert.

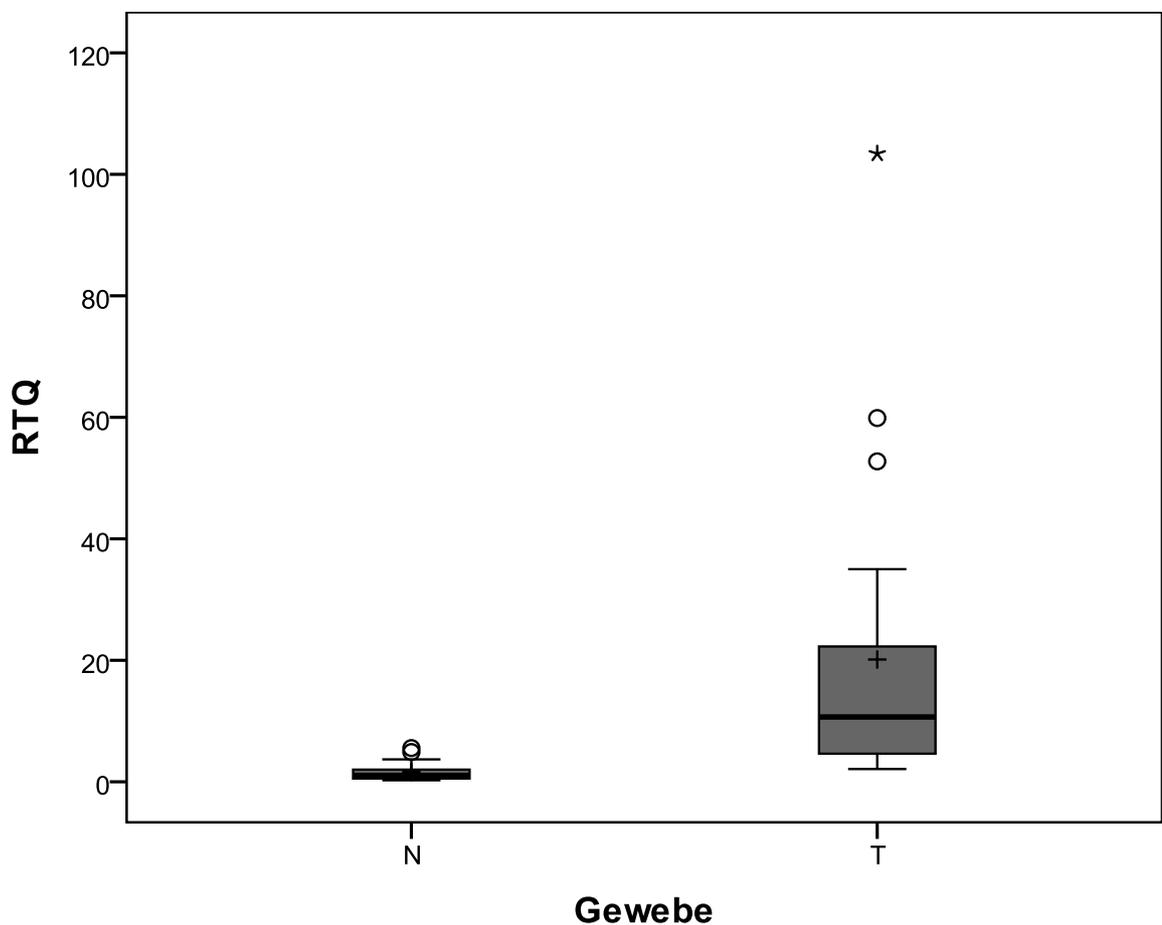
**Tabelle 22: Relative Quantifizierung einer Patienten-Gewebeprobe.** Dargestellt ist die Auswertung der gemessenen Daten durch die RelQuant Software. Gemessen wurde in Doppelstimmung der Amplifikationsantieg vom Standard SW620, Tumor- und Normalgewebe, jeweils mit *PMM-1* und *LGR5*-Primer.

Nummer	Probe	CP	CP median	Delta CP median	Ratio conc.	Normalized ratio
1	SW620_GPR49	21,96	21,97	2,76	0,12	1
2	Replicate of 1	21,98				
3	SW620_PMM	19,24	19,21			
4	Replicate of 3	19,18				
5	Pat.6N_GPR49	24,57	23,81	1,48	0,26	<b>2,11</b>
6	Replicate of 5	23,06				
7	Pat.6N_PMM	22,71	22,34			
8	Replicate of 7	21,96				
9	Pat.6T_GPR49	22,36	22,2	-0,86	1,22	<b>9,91</b>
10	Replicate of 9	22,03				
11	Pat.6T_PMM	22,51	23,05			
12	Replicate of 11	23,59				

Die Auswertung der RT-qPCR Ergebnisse der übrigen 19 CRC-Proben wurde analog zu Patient Nummer 6 durchgeführt. Die in 6.2.3.2 präsentierte Tabelle 24 zeigt, neben den Ergebnissen des Western Blots, das Ergebnis der relativen Quantifizierung. Im gesamten Patientenkollektiv konnte *LGR5* sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe nachgewiesen werden. Tabelle 23 und Abbildung 13 zeigen einen errechneten ct-Mittelwert des Normalgewebes von 1,63 (Median 1,11), der des Tumorgewebes liegt bei 20,13 (Median 10,68). 19 von 20 CRC-Gewebeproben zeigen somit eine stärkere Expression von *LGR5* im Tumor-, als im Normalgewebe, einzig Patient Nummer 4 weist eine höhere Expression von *LGR5* im Normalgewebe auf. Im Wilcoxon Test zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe RT-qPCR ( $p=0,00$ ).

**Tabelle 23: Statistische Auswertung der RT-qPCR.** Die Auswertung der RT-qPCR mittels Wilcoxon Test ergibt einen statistisch signifikanten Unterschied der *LGR5*-Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe.

RT-qPCR						
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum	Anzahl
RTQ N	1,63	1,55	1,11	0,25	5,55	20
RTQ T	20,13	25,50	10,68	2,10	103,40	20
Wilcoxon-Test: p=0,00						



**Abbildung 13: LGR5-Expression der RT-qPCR im Boxplot.** Der Boxplot zeigt den Vergleich von Tumor- (T) und Normalgewebe (N). Die Ober- und Untergrenzen der Box repräsentieren oberes und unteres Quartil. Linien (fett): Median; die *Whiskers* zeigen das Minimum und Maximum.

### **6.2.2.3 Korrelation der *LGR5* RNA-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern**

Zur Auswertung der differentiellen RNA-Expression der UICC-Stadien, wurden die Proben klassifiziert als UICC-Gruppen I und II mit den Gruppen III und IV verglichen. Die Auswertung der Daten der Gruppe UICC I und II zeigte einen ct-Mittelwert T/N von 14,5, (Median 7,94), während die UICC-Gruppen III und IV mit einem ct-Mittelwert T/N von 21,56 (Median 14,94) einen deutlich höhere RNA-Expression aufwiesen (Mann-Whitney-Test  $p=0,35$ ).

Für die Auswertung der Ergebnisse nach Tumor-Grading wurden Low-Grade Karzinome (G1 und G2) mit High-Grade-Karzinomen (G3 und G4) verglichen. Da die vom pathologischen Institut bewerteten Patientenproben ausschließlich neun G2- und elf G3- Karzinomen aufwiesen, wurden diese beiden Gruppen miteinander verglichen. Das Grading der Tumore zeigte dabei einen höheren Grad der Expression an *LGR5* in der Gruppe der geringer differenzierten Tumore, G3 und G4 von 20,97, (Median 15,61), verglichen mit 14,45, (Median 8,40) der G1 und G2 Gruppe ( $p=0,50$ ).

Für die Analyse der Expression des Rezeptors im Hinblick auf die Lokalisation des Tumors wurden Tumore im Coecum und Kolon ascendens, transversum und descendens (nachfolgend Kolon genannt), mit den Tumoren des Kolon sigmoideum und des Rektums (nachfolgend Rektum genannt) verglichen. Die Tumore im Kolon zeigten dabei im ct-Mittelwert ein ähnliches Verhältnis T/N von 18,13, (Median 6,43), die zwölf distal gelegenen Tumore 17,9, (Median 14,20;  $p=0,97$ ).

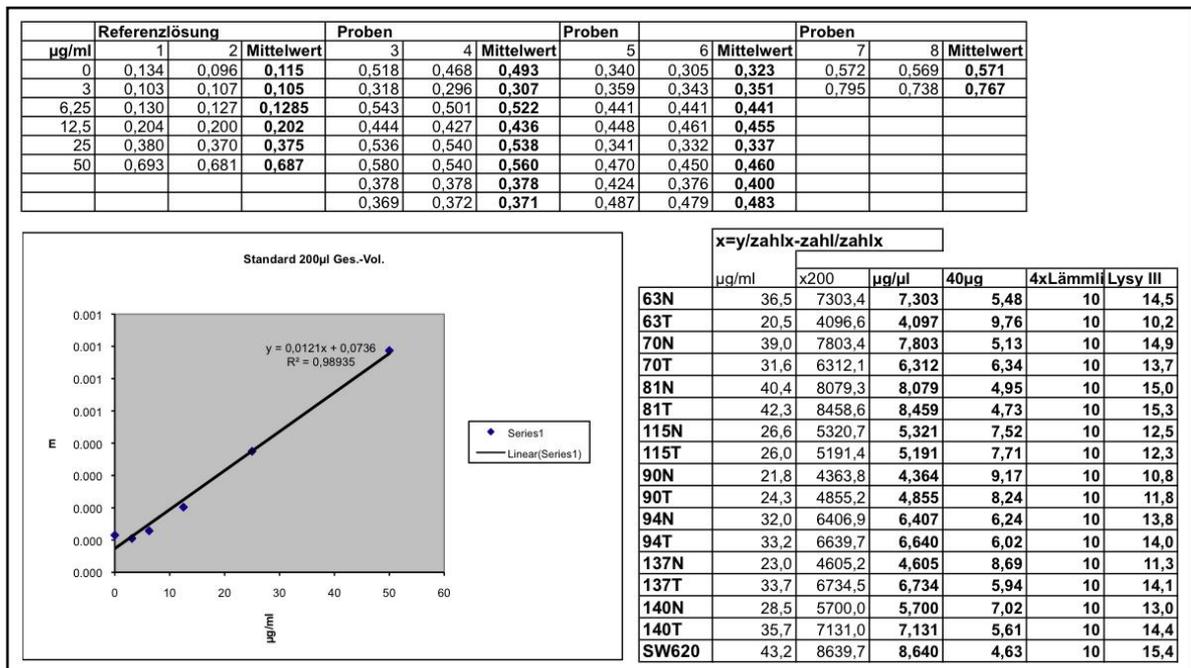
Aufgrund des ungleichen Geschlechterverhältnisses des Patientenkollektivs von fünf Männern zu fünfzehn Frauen wurde auf eine Auswertung hinsichtlich der Geschlechterverteilung verzichtet.

## **6.2.3 Protein-Expression im Western Blot**

### **6.2.3.1 Berechnung der Proteinkonzentration**

Zur weiteren Analyse der Expression von *LGR5* auf Proteinebene wurden Western Blots mit isoliertem Protein sowohl aus Tumorgewebe als auch aus gesundem Epithel von Patienten durchgeführt. Um sicher zu stellen, dass in jeder Probe die gleiche Proteinmenge enthalten ist, wurde vorab die Proteinkonzentration der

einzelnen Lysate berechnet. Um diese bestimmen zu können, wurde aus Referenzlösungen, deren Proteinkonzentration bekannt war, eine Kalibriergerade erstellt. Über die gemessenen Absorbtionswerte der Proben konnte somit auf deren Proteinkonzentration geschlossen werden.

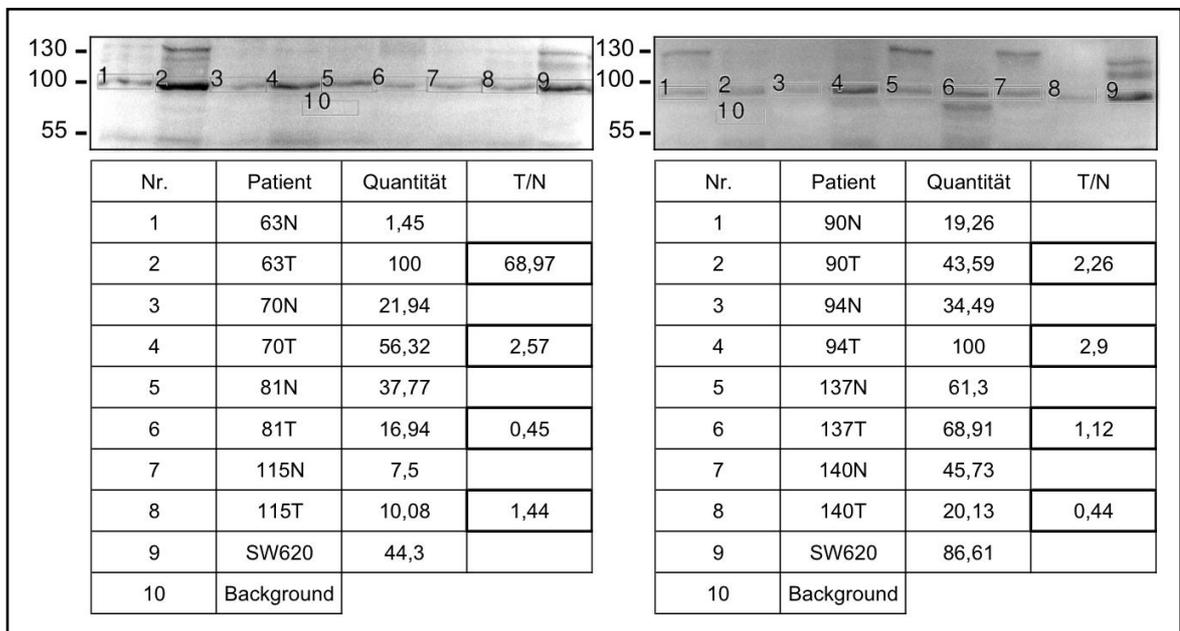


**Abbildung 14: Bestimmung der Proteinkonzentration.** Dargestellt ist die Konzentrationsberechnung der Proteinlysate. Über eine Kalibriergerade, die aus Referenzlösungen erstellt wird, kann die Proteinkonzentration der Proben aus ihren Absorbtionswerten bestimmt werden. Die Berechnung erfolgt durch die lineare Regression der Referenzlösungen und die anschließende Umrechnung der Absorbtionswerte der untersuchten Lösungen in die Proteinkonzentrationen über die Regressionsgleichung. Die Nummern in der ersten Spalte der unteren Tabelle entsprechen nicht der Nummerierung dieser Arbeit, sie sind die Bezeichnung der Proben der Tumorgewebe-Bank des CBF.

Abbildung 14 zeigt die graphisch aufgetragenen Absorbtionswerte der Referenzlösung. Die Tabelle auf der rechten Seite zeigt das unter 5.5.4 beschriebene Pipettierschema des Western Blots. Die Proteinlösungen für gesundes Epithel (N) und Tumorgewebe (T) der Patienten wurden jeweils im Wechsel aufgetragen. Als Positivkontrolle diente erneut die Kolonkarzinom-Zelllinie SW 620 (9).

### 6.2.3.2 LGR5-Expression der Western Blots in Normal- und Tumorgewebe

Im Western Blot wurde, basierend auf den in der RT-PCR gemessenen mRNA-Expressionslevels, die LGR5-Konzentration auf Proteinebene untersucht. In beiden der in Abbildung 15 gezeigten Western Blots sind in den jeweils 9 aufgetragenen Spuren Banden im Bereich von 100 kD zu sehen, die der Größe des untersuchten Targets entsprechen. Die Spuren 1-8 zeigen die alternierend aufgetragenen Gewebeproben von Normal- und Tumorgewebe. Der unter den Banden liegende Kasten Nummer 10 zeigt den gewählten „Background“ an, welcher die Hintergrundhelligkeit darstellt, die zur Ermittlung der Quantität von 1-8 durch die verwendete Software subtrahiert wurde.



**Abbildung 15: Western Blot des humanen Gewebes.** Die Expressionsanalyse von LGR5 auf Proteinebene mit Hilfe des Western Blots wurde mit einer gegen LGR5 spezifischen Antikörper-Lösung (1:1000) vorgenommen. Alle Spuren zeigen im Größenbereich von 100 kD liegende Banden, deren gemessene Quantität in der unten stehenden Tabelle aufgetragen ist. Anschließend wurde das Verhältnis von Tumor (T) zu gesundem Epithel (N) bestimmt. Ein Ergebnis  $<1$ , somit eine höhere Quantität der Bande des Normalgewebes, zeigen Patient 4 (hier als Patient 81N und 81T, nach Tumorgewebe-Bank Nummer des CBF bezeichnet) und Patient 140. Als Positivkontrolle wurde die Kolonkarzinom-Zelllinie SW 620 (9) verwendet.

In Abbildung 15 sind zudem die Ergebnisse der Quantität der Banden dargestellt, wobei das gebildete Verhältnis von Tumorgewebe (T) zum entsprechenden gesunden Kolonepithel (N) hervorgehoben ist. Patient 140 (Tumorgewebe-Bank-Nummer des CBF) stellt bezüglich des Probenmaterials eine Ausnahme dar, da sich das intraoperativ entnommene Resektat nachträglich in der pathologischen Untersuchung als Adenom und nicht als Karzinom erwies (siehe Abb. 17). Analog zu den Abbildungen 14 und 15 wurden Western Blots an insgesamt 20 Patienten-Gewebeproben durchgeführt.

**Tabelle 24: RT-qPCR und Western Blots der Patienten.** Dargestellt sind die Ergebnisse der Quantitätsmessung von RT-qPCR und die Quantität der Banden von Tumor- (T) und Normalgewebe (N) im Western Blot. Bis auf Patient 8 im Western Blot und Patient 4 in der RT-qPCR zeigen alle untersuchten Patienten einen Wert  $>1$  im Verhältnis T/N

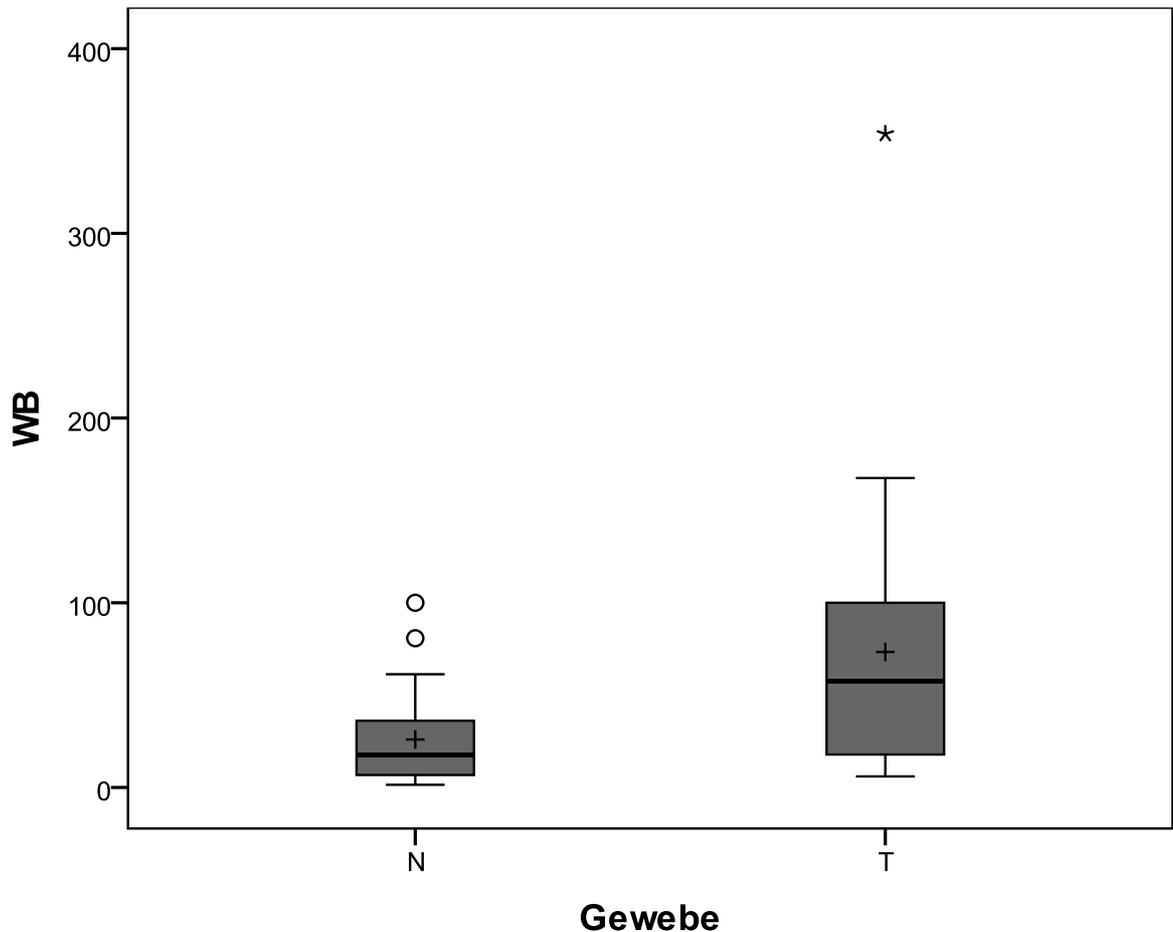
Patienten Nr.	WB N	WB T	WB T/N	RTQ N	RTQ T	RTQ T/N
1	12,16	14,04	1,20	2,11	9,91	4,70
2	27,84	100,00	3,60	0,45	5,76	12,80
3	22,41	27,96	1,20	0,25	2,10	8,40
4	2,93	5,98	2,00	5,55	3,15	0,57
5	1,45	100,00	68,97	0,41	20,52	50,05
6	10,82	13,01	1,20	1,16	5,55	4,78
7	21,94	56,32	2,57	1,90	103,40	54,42
8	37,77	16,94	0,45	3,69	6,67	1,81
9	19,26	43,59	2,26	0,90	59,88	66,53
10	34,49	100,00	2,90	3,38	52,75	15,61
11	39,49	58,65	1,50	4,90	24,03	4,90
12	7,50	10,08	1,44	1,26	3,70	2,94
13	61,30	68,91	1,12	0,62	15,40	24,88
14	16,00	18,72	1,20	0,44	12,70	29,06
15	2,20	76,52	34,80	0,67	11,45	17,09
16	2,21	47,71	21,60	0,35	2,62	7,49
17	12,61	100,00	7,90	1,35	7,25	5,37
18	6,01	87,88	14,60	0,92	2,21	2,40
19	80,79	167,52	2,10	1,20	35,00	29,17
20	100,00	353,85	3,50	1,05	18,60	17,71

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte analog zu denen der RT-qPCR. Tabelle 24 zeigt die Ergebnisse der Quantitätsmessung der Banden von den untersuchten 20 Tumorgewebeproben. Aufgetragen ist die gemessene Quantität der Banden von Tumorepithel T, von gesundem Normalepithel N und deren Verhältnis T/N. Die gemessene mittlere Quantität der Banden liegt beim Normalgewebe bei 25,96,

Median 17,63, die des Tumorgewebes bei 73,38, Median 57,49. Nur Patient Nr. 8 zeigt eine höhere Intensität im Normal- als im Tumorgewebe. Auch hier zeigt sich im Wilcoxon Test ein signifikantes Ergebnis ( $p=0,00$ ). Das LGR5-Protein weist demnach eine signifikant höhere Expression im malignen Gewebe auf.

**Tabelle 25: Statistische Auswertung der Western Blots.** Die Auswertung der Western Blots mittels Wilcoxon Test ergibt einen statistisch signifikanten Unterschied der Expression von LGR5 zwischen Tumor- und Normalgewebe.

Western Blot						
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum	Anzahl
WB N	25,96	27,05	17,63	1,45	100,00	20
WB T	73,38	78,34	57,49	5,98	353,85	20
Wilcoxon-Test: $p=0,00$						



**Abbildung 16: LGR5-Expression der Western Blots im Boxplot** Der Boxplot zeigt Median, oberes und unteres Quartil sowie Minimum und Maximum der LGR5 Expression von Tumor- (T) und Normalgewebeprobe (N) im Western Blot.

### 6.2.3.3 Korrelation der LGR5 Protein-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

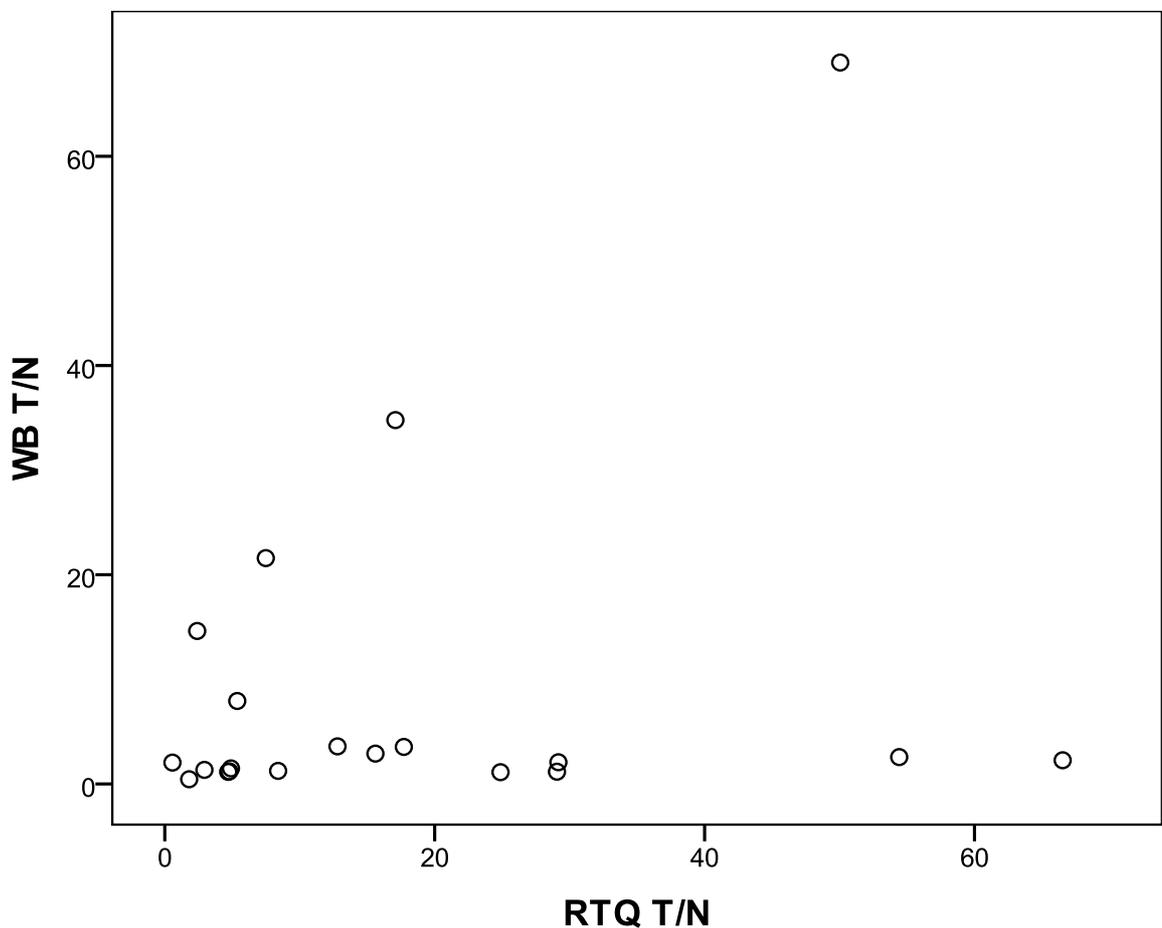
Die Gruppe UICC III und IV liegt mit einer gemessenen mittleren Bandenintensität (T/N) von 6,07, Median 2,42 unter dem der Gruppe UICC I und II von 11,53, Median 1,64 liegt ( $p=0,481$ ). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass sowohl der kleinste (Pat. 8, 0,45), als auch der größte Wert (Pat. 5, 68,97) in der Gruppe UICC I und II zu finden sind, eine Standardabweichung von 21,41 ist damit deutlich höher als die der Gruppe UICC III und IV, welche eine Divergenz von 10,28 aufweist.

Die G2-Karzinome zeigen dabei ein mittleres Verhältnis T/N von 14,35, Median 2,04, während die High-Grade Karzinome G3 einen Wert von 4,26, Median 2,26 aufweisen ( $p=0,55$ ).

Die Auswertung basierend auf der Lokalisation des Tumors, liefert folgendes Ergebnis: Die Gruppe der proximalen Tumore weist bei der mittleren Bandenintensität im Western Blot einen T/N-Quotienten von 6,07, Median 2,42, die der distalen Tumore von 11,53, Median 1,64 auf ( $p=0,305$ ). In keiner der analysierten Subgruppen konnte ein signifikanter Unterschied im relativen Expressionsverhältnis Tumor-/Normalgewebe nachgewiesen werden.

#### 6.2.4 Korrelationsanalyse von RT-qPCR und Western Blot

Zur Analyse der Vergleichbarkeit der Methoden von RT-qPCR und Western Blot wurde die Korrelation nach Spearman angewendet.



**Abbildung 17: Korrelation von Western Blot und Real-Time PCR.** Die Verhältnisse Tumor-/Normalgewebe (T/N) von Western Blot und Real-Time zeigen im Spearman Test eine positive, jedoch nicht signifikante Korrelation.

Der errechnete Korrelationskoeffizient von 0,259 der LGR5 Expression von Tumor- zu Normalgewebe weist auf einen positiven Zusammenhang der Ergebnisse, gewonnen durch RT-qPCR und Western Blot, hin. Da der p-Wert jedoch keine Signifikanz aufzeigt, muss von einem monotonen Zusammenhang abgesehen werden.

## 6.2.5 Immunhistochemie

### 6.2.5.1 Bewertungsscore der IHC

Für den immunhistochemischen Nachweis wurden nach dem in 5.5.5 beschriebenen Prinzip insgesamt 21 Schnitte mit LGR5-spezifischen Antikörpern gefärbt. Tabelle 26 zeigt den Score der immunhistochemischen Färbung der 21 Schnitte des humanen Gewebes.

**Tabelle 26: Immunhistochemie-Score des humanen Gewebes.** Aufgelistet ist der vergebene Score der immunhistochemischen Färbung des humanen Gewebes. Bewertet wurde anhand des entwickelten Bewertungs-Scores jeweils der Anteil der gefärbten Tumor- und gesunden Epithelzellen und deren Intensität. Ein Verhältnis von T/N >1 ist rot markiert.

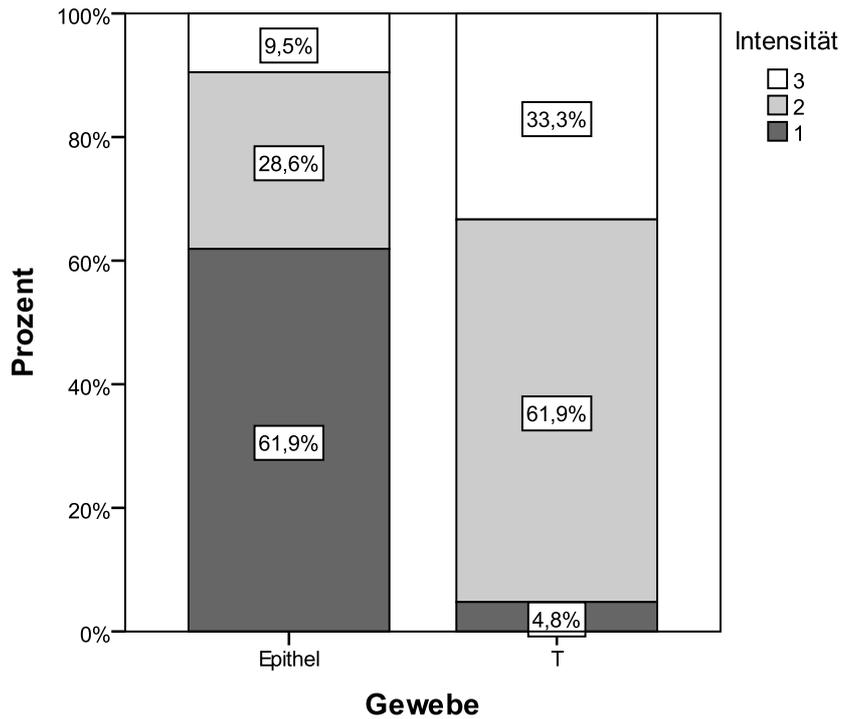
Patienten Nr.	Intensität T	Färbung T	Färbung Epithel	Intensität Epithel	Intensität T/Epithel
1	2	3	3	2	1
2	3	3	3	2	1,5
3	2	2	3	1	2
4	2	2	3	1	2
5	2	3	3	1	2
6	2	3	3	1	2
7	2	3	3	2	1
8	3	3	3	3	1
9	2	3	3	1	2
10	3	3	3	1	3
11	3	3	3	3	1
12	3	3	3	1	3
13	2	3	3	2	1
14	2	3	3	1	2
15	3	3	3	1	3
16	2	3	3	1	2
17	3	3	3	2	1,5
18	2	3	3	2	1
19	2	3	3	1	2
20	1	2	3	1	1
21	2	3	3	1	2

Bei der Auswertung der Schnitte wurden der Anteil und die Intensität der gefärbten Zellen mit den Werten des gesunden Epithelgewebes verglichen. Grundsätzlich wiesen alle gefärbten Schnitte eine deutliche zytoplasmatische Färbung von LGR5 in den Karzinomzellen auf.

#### **6.2.5.2 Differentielle Expression von LGR5 in der IHC**

Insgesamt zeigt der Vergleich der Färbungsintensität zwischen Normal- und Tumorgewebe eine stärkere Intensität des Tumorgewebes, verglichen mit gesundem Epithel. Da eine intensivere Färbung mit einer höheren Expression des Rezeptors einhergeht, ist demnach in den dargestellten Ergebnissen der IHC eine stärkere Expression von LGR5 in Tumorzellen, verglichen mit dem korrespondierenden Normalgewebe anzunehmen.

Die IHC der 21 Gewebsschnitte der CRC zeigte, wie in Tabelle 27 und Abbildung 18 dargestellt, folgende Aufteilung: Der Mittelwert des gefärbten Tumorepithels lag bei 2,86, die durchschnittliche Intensität der Färbung bei 2,29, Median 2. Dabei zeigte das Normalepithel einen durchschnittlichen Anteil der Färbung von 3,0, bei einer durchschnittlichen Färbungsintensität von 1,48, Median 1. Keinen Intensitätsunterschied zeigten 7 der gefärbten Schnitte.

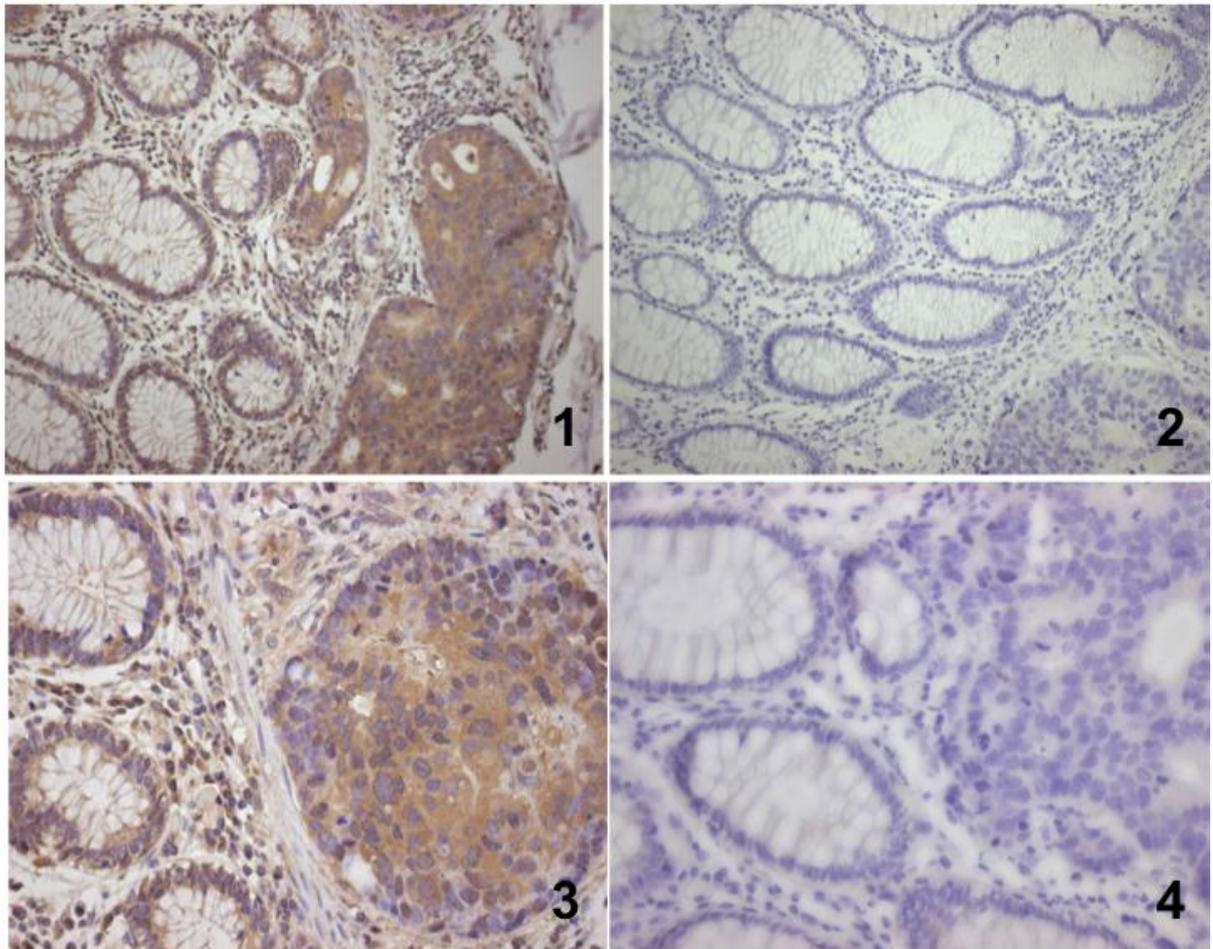


**Abbildung 18: Anteil der Färbungsintensitäten.** Das Tumorgewebe (T) weist in 33,3 % mit 3 und mit 61,9 % mit 2 bewerteten Schnitten eine höhere Intensität als das Normalgewebe (Epithel) auf, welches in 61,9 % mit 1 bewertet wurde.

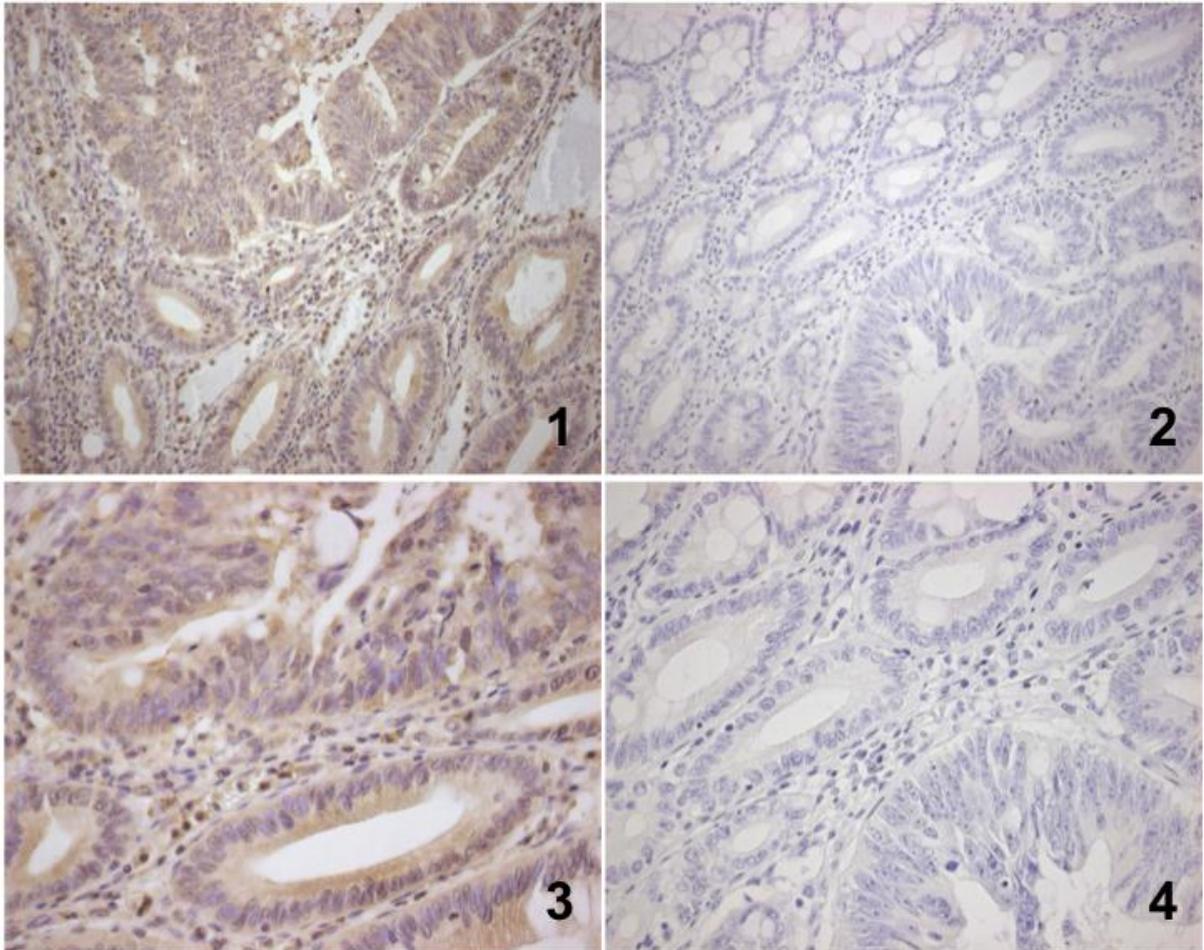
**Tabelle 27: Statistische Auswertung der IHC.** Die Auswertung der IHC-Scores mittels Wilcoxon Test ergibt einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von LGR5 im Tumor- und Normalgewebe.

Intensität T vs Epithel						
	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum	Anzahl
Intensität T	2,29	0,56	2,00	1,00	3,00	21
Intensität N	1,48	0,68	1,00	1,00	3,00	21
Wilcoxon-Test: p=0,00						

In den Bildern 1 und 3 der Abbildungen 19 und 20 sind jeweils Tumorzellen zu sehen, erkennbar durch ihre dunkelbraune Färbung, gesundes Epithel ist durch eine hellere Färbung davon zu unterscheiden. 2 und 4 zeigen die entsprechenden Negativkontrollen. Im Wilcoxon Test lässt sich eine statistische Signifikanz der LGR5 Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe nachweisen.



**Abbildung 19: IHC Patient Nr. 12.** Bild 1 (20x) und 3 (40x) zeigen angefärbtes Tumorgewebe rechts, gesundes Epithel links. Deutlich erkennbar ist die zytoplasmatische Färbung. Bewertet wurde dieser Schnitt: Färbung T: **3**; Färbung Epithel: **3**; Intensität T: **3**; Intensität Epithel: **1**; Bild 2 (20x) Bild 4 (40x) zeigen die Negativkontrolle zu 1 und 3.



**Abbildung 20: IHC Patient Nr. 4** Bild 1 (20x) und 3 (40x) zeigen oben Tumorgewebe, während unten eine schräg angeschnittene Krypte gesunden Epithels zu sehen ist. Bild 2 (20x) Bild 4 (40x) zeigen erneut die Negativkontrolle zu 1 und 3. Bewertet wurde dieser Schnitt: Färbung T: **2**; Färbung Epithel: **3**; Intensität T:**2**; Intensität Epithel: **1**;

### 6.2.5.3 Korrelation der IHC anhand klinisch-pathologischer Parameter

Die Analyse der Daten nach der UICC-Stadieneinteilung ergab, dass die UICC-Gruppe I und II beim Verhältnis T/N der Intensität (T/Epithel = 1,44; Median 1,0) schwächer bewertet wurde, als das der Gruppen III und IV (T/Epithel = 2; Median 2,0) ( $p=0,096$ ).

Die Low-Grade Karzinome, bestehend aus einer G1- und neun G2-bewerteten Proben, wiesen ein niedrigeres Verhältnis von Tumor- zu Epithelgewebe (T/Epithel = 1,55; Median 1,25) auf, als die Gruppe der High-Grade Karzinome. Diese bestand aus elf G3-Karzinome, die einen Mittelwert von 1,95; Median 2,0

aufwiesen. Die Differenzierung zwischen männlichen und weiblichen Patienten ergab ein größeres Verhältnis der weiblichen Patienten von 1,85; Median 2,0, im Vergleich zu 1,63 im Quotienten T/N der Männer; Median 1,5 ( $p=0,52$ ). Die Färbungsintensität T/N der proximalen Tumore lag bei 1,79 sowie 1,71 bei den distalen Tumoren. Beide Mediane liegen bei 2,0; der im Mann-Whitney-U-Test ermittelte p-Wert bei 0,857. Ein signifikanter Zusammenhang ließ sich demnach in keiner der analysierten Gruppenvariablen feststellen.

## **7 Diskussion**

Das kolorektale Karzinom zählt statistisch in Deutschland- wie auch weltweit zu den häufigsten tumorbedingten Todesursachen. Daher sind neue spezifische molekular-therapeutische Behandlungsansätze dringend notwendig, um dessen schlechte Prognose und, damit einhergehend, die Kuration der Patienten zu verbessern. Aufgrund ihrer Diversität stellen G-Protein gekoppelten Rezeptoren erfolgsversprechende Ziele für die Krebsstammzellenforschung dar, aktuell werden diese intensiv auf ihr Potential als Zielstruktur zu fungieren überpüft.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob der G-Protein gekoppelte Rezeptor LGR5 eine Rolle in der Tumorphogenese des humanen kolorektalen Karzinoms spielt. Es konnte auf RNA- sowie Proteinebene gezeigt werden, dass im Tumorgewebe der CRC eine deutliche Überexpression des Rezeptors im Vergleich zu korrespondierendem gesunden Epithel vorliegt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden nachfolgend ausführlich diskutiert.

### **7.1 Bewertung des Patientenkollektivs**

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv umfasst zwei verschiedene Gruppen von Patienten, da die zum Teil kleinen Tumorproben der CRC nicht in ausreichendem Maße für den gesamten Umfang der Versuchsreihen zur Verfügung standen und so die Methode der IHC an einem anderen, jedoch vergleichbaren, Patientenkollektiv vorgenommen werden musste.

Für die Versuche der RT-qPCR sowie des Western Blots wurden Proben eines 20 Personen umfassendens Patientenkollektivs mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 66,7 Jahren herangezogen, wobei das der IHC 21 Patienten miteinbezog und ein durchschnittliches Erkrankungsalter von 63 Jahren aufwies. Dieses Alter rangiert damit leicht überhalb des Durchschnittsalters anderer, das CRC behandelnde Studien. Das hier bewertete Patientenkollektiv weist jedoch ein ähnliches Durchschnittsalter auf, welches das deutsche Krebsregister für CRC mit 65,4 Jahren als Erkrankungsalter angibt (Schmiegel, Pox et al. 2005). In der IMPACT-Studie von 1995, in der 1526 Patienten evaluiert wurden, lag das durchschnittliche Erkrankungsalter bei 62 Jahren, in einer weiteren großen Studie an 929 Patienten bei 61 Jahren (IMPACT 1995) (Moertel, Fleming et al. 1990).

Das Geschlechterverhältnis von Männern gegenüber Frauen wird vom deutschen Krebsregister mit 1,1:1 angegeben, ein ähnliches Geschlechterverhältnis mit annähernder Gleichverteilung weisen auch die oben genannten klinischen Studien auf. In der vorliegenden Arbeit beträgt die Geschlechterverteilung von Männern zu Frauen 1:3 im Kollektiv von RT-qPCR und Western Blot, respektive 1:1,6 bei der IHC. Das Ungleichgewicht dieser Zahlen ist am ehesten mit der geringen Fallzahl und der Auswahl der untersuchten Gewebeblöcke nach ausgeglichenen UICC-Stadien in der Arbeit zu begründen. Signifikante Aussagen zu differentieller Expression des Rezeptors, bezogen auf das Patientengeschlecht, konnten daher nicht getroffen werden.

Die Verteilung der Infiltrationstiefen anhand des T-Status zeigte sich in dieser Studie wie folgt: RT-qPCR und Western Blot zeigten zu 30 % ein T2 Stadium (6/20), zu 55 % ein T3 Stadium (11/20) und zu 15 % ein T4 Stadium (3/20). Ein T1 Stadium lag in diesem Patientenkollektiv nicht vor. Die UICC Gruppen wiesen eine heterogene Verteilung von jeweils 25 % UICC I und II (jeweils 5/20), 30 % UICC III (6/20) und 20 % UICC IV (4/20) auf. Der Grad der Differenzierung (Grading) lag hierbei zu 45 % bei G2 (9/20 mäßig differenzierte Tumore, „Low-Grade“) und zu 55 % bei G3 (11/20 schlecht differenzierte Tumore, „High-Grade“).

Das Patientenkollektiv der IHC zeigte eine Verteilung von einem T1 Karzinom (4,7 %, 1/21), vier T2-Karzinomen (19 %, 4/21), 13 T3-Karzinomen (62 %, 13/21) und drei T4-Karzinomen (14,3 %, 3/21). Vier Patienten konnten der Gruppe UICC I zugerechnet werden (19 %, 4/21), fünf Patienten der Gruppe UICC II (24 %, 5/21), acht Patienten in UICC III und vier Patienten der Gruppe UICC IV (19 %, 4/21). Das Grading verteilte sich in dem Patientenkollektiv von IHC zu 43 % auf G2 (9/21), zu 52 % auf G3 (11/21) und zu etwa 5 % auf die Gruppe G1 (1/21). Die Verteilung der Infiltrationstiefen, beziehungsweise der UICC Gruppen in dieser Studie, ist demnach vergleichbar mit der Verteilung der UICC-Gruppen, veröffentlicht vom deutschen Krebsregister bei Erstdiagnose: 13 % UICC I, 27 % UICC II, 32 % UICC III und 28 % UICC IV (Schmiegel, Pox et al. 2005).

Die Gruppe der T1-Karzinome ist zwar im RT-qPCR- und Western Blot-Patientenkollektiv nicht vorhanden, jedoch konnten für die Expressionsanalyse von LGR5 und Tumorfortschritt die Gruppen UICC I und II gegen die Gruppen III und IV verglichen werden. Sämtliche Tumore beider Patientenkollektive wurden

histopathologisch als Adenokarzinome eingestuft, bei keinem der eingeschlossenen Patienten bestand der Verdacht auf eine hereditäre Form des kolorektalen Karzinoms.

Disponierende Vorerkrankungen, wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen, lagen bei keinem der untersuchten Patienten vor oder waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung nicht bekannt. Bis auf das erwähnte ungleiche Geschlechterverhältnis in der RT-qPCR- und Western Blot-Analyse, entspricht das vorliegende Patientenkollektiv in klinischer und pathologischer Hinsicht dem anderer, größerer Studien und kann daher als repräsentativ eingestuft werden.

Ein für alle Methoden einheitliches Patientenkollektiv hätte jedoch weitere Aussagen über die Vergleichbarkeit der Methoden und die Proteinbiosynthese von LGR5 auf RNA- und Proteinebene, verglichen mit den mikroskopisch bewerteten Ergebnissen der IHC, an ein und demselben Patienten liefern können.

## **7.2 Expression von LGR5 in Tumorzelllinien**

In insgesamt zehn Tumorzelllinien wurde die mRNA- und Proteinexpression untersucht, dies erfolgte mittels RT-PCR und Western Blot. So konnte für die darauffolgende Durchführung der RT-qPCR die SW 620-Zelllinie als Positivkontrolle etabliert werden. Im Weiteren zeigten die Kolonkarzinomzelllinien LOVO, HTC116, HT 29, SW 620 und SW 480 ebenfalls eine Bande in dem für den verwendeten LGR5 spezifischen Primer zu erwartenden Bereich von etwa 500 bp. Gleiches gilt für die Uteruskarzinom-Zelllinie KLE, die Magenkarzinom-Zelllinie MKN-45 und die Pankreaskarzinom Zelllinien MIA PACA und ASPC. Es ist daher davon auszugehen, dass diese Zelllinien *LGR5*-RNA enthielten. Einzig die Magenkarzinom-Zelllinie AGS wies in der RT-PCR keine Bande auf und wurde somit als LGR5-negativ eingestuft.

Gleiches Ergebnis lieferte auch die Untersuchung auf Protein-Ebene mittels Western Blot. Auch hier zeigte die Zelllinie AGS keine Bande in dem zu erwartenden Bereich, jedoch ließ sich LGR5 in allen weiteren untersuchten Zelllinien (SW 620, LOVO, HTC116, HT 29, SW 620 und SW 480, KLE, MKN-45, MIA PACA und ASPC) auch auf Proteinebene detektieren.

So untersuchten auch Uchida und Yamazaki et al. die *LGR5* Expression 37 humaner Karzinomzelllinien mittels RT-qPCR, darunter elf CRC-, elf

Bronchialkarzinom-, fünf Hepatozelluläre-Karzinom- und zehn Ovarkarzinom-Zelllinien. *LGR5* war dabei in fünf der elf CRC Zelllinien überexprimiert. Ferner konnte in allen aus metastatischem Gewebe gewonnenen Zelllinien eine *LGR5* Überexpression (COLO 201, COLO 205, SW 620 und LOVO) detektiert werden. Daher kann schlußgefolgert werden, dass *LGR5* bei fortgeschrittenen CRC von Bedeutung sein kann. Bei den übrigen Gewebetypen wiesen lediglich die primäre CRC-Zelllinie CaCo-2, die HCC-Zelllinie HepG2 und die Bronchialkarzinom-Zelllinie H889 eine vermehrte Expression auf (Uchida, Yamazaki et al. 2010).

Kontrastierend zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnten Xi et al. eine vermehrte Expression von *LGR5* in der Magenkarzinom-Zelllinie AGS nachweisen und eine positive Korrelation von *LGR5* Expression und Invasionstiefe, Metastasen in den Lymphknoten sowie der Distanz der Metastasen feststellen. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein knock-out von *LGR5* mittels *LGR5*-siRNA in einer reduzierten Zellmigration sowie verminderter  $\beta$ -Catenin Expression resultierte (Xi et al. 2014). Ferner wurde auch ein Zusammenhang zwischen Rezeptor und Karzinogenese des Magen- beziehungsweise des Ösophaguskarzinoms aufgezeigt. Becker & Huang et al. stellten in Ihrer Arbeit fest, dass *LGR5* vermehrt in Epitheldysplasien des Ösophagus, im sogenannten Barrett-Ösophagus, nachweisbar ist. Höhergradige Epitheldysplasien zeigten ein noch stärkeres Expressionsverhalten von *LGR5*. Sie postulierten daher, dass *LGR5* als möglicher Biomarker für Barrett-Epitheldysplasien anzusehen ist (Becker 2009).

Die Aussagekraft der unter 6.1.1 und 6.1.2 gezeigten Ergebnisse ist aufgrund der lediglich absoluten Aussagemöglichkeit über die Expression von *LGR5* bei den beiden Methoden eingeschränkt. Insgesamt sind die Ergebnisse der Tumorzelllinien als Vorversuch für die Expressionsanalyse des humanen Gewebes anzusehen.

### **7.3 Expression von *LGR5* in Patientengewebe**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der RT-qPCR ergab eine signifikante Überexpression des Rezeptors auf mRNA-Ebene im Tumorgewebe. 95 % (19/20) der untersuchten Gewebe zeigten in der Tumorprobe eine stärkere Expression von *LGR5* als im korrespondierenden gesunden Normalepithel. Lediglich Patient Nr. 4 wies erhöhte Werte an *LGR5*-mRNA im gesunden Epithel auf. Der ct-Wert des

Normalgewebes lag bei 1,63, Median 1,11, der des Tumorgewebes bei 20,13, Median 10,68. Diese Ergebnisse entsprechen denen aus Studien anderer Arbeitsgruppen. McClanahan et al. konnten die *LGR5* Überexpression in 64 % (25/39 Patienten) ihres, durch RT-qPCR untersuchten, CRC-Patientenkollektivs feststellen. Zudem stellten sie einen Zusammenhang zwischen Tumorfortschritt und dem Grad der Expression her. In den von Ihnen erhobenen Daten zeigte sich in den UICC Stadien I und II signifikant mehr *LGR5*-mRNA als in den Stadien III und IV. Sie wiesen *LGR5* daher eine Rolle in frühen Stadien der Erkrankung zu (McClanahan, Koseoglu et al. 2006). Ebenso konnten Jang et al. eine Korrelation der *LGR5* Expression und frühen Stadien des Magenkarzinoms feststellen. So identifizierten sie 76 % der Magen-Adenome sowie 43 % der frühen Magen-Karzinome als *LGR5* positiv. Im Weiteren konnten *LGR5*<sup>+</sup> Zellen häufiger in Low-Grade Tumoren mit aktiver Wnt-Signaltransduktion detektiert werden, auf einen Zusammenhang zwischen *LGR5* und Wnt-gesteuerter Tumorigenese lässt dies schließen (Jang et al. 2013). Vergleicht man die hier präsentierten Ergebnisse, lässt sich jedoch ein anderer Trend beobachten: Das gebildete Verhältnis von Tumor- zu Normalgewebe zeigt höhere Werte in den Stadien UICC III und IV von 14,94, verglichen mit 7,94 in den UICC-Stadien I und II.

Takahashi et al. ist es gelungen, einen signifikanten Zusammenhang zwischen Überlebenszeit der Patienten mit einem CRC und der nachgewiesenen *LGR5*-mRNA herzustellen (Takahashi, Ishii et al. 2011). Patienten mit geringeren *LGR5*-mRNA Werten hatten eine längere Gesamtüberlebenszeit als Patienten mit höheren *LGR5*-mRNA-Werten. Neben der Tatsache, dass auch hier die Mehrzahl der untersuchten Tumore eine erhöhte mRNA-Expression von *LGR5* aufwies, erkannten sie eine Korrelation von *LGR5* Expression und des Protoonkogens *cMYC*. *cMYC* ist ein, im Vergleich zu *LGR5*, bereits gut charakterisiertes Gen, welches die Expression von etwa 15 % aller humaner Gene reguliert. Eine mutierte Version dieses Protoonkogens wurde bereits in verschiedenen Malignomen detektiert. Soucek, Whitfield et al. konnten beispielsweise nachweisen, dass eine Inhibition der *c-MYC* Expression im Mausmodell selektiv Bronchialkarzinomzellen abtötet. (Soucek, Whitfield et al. 2008). *cMYC* gilt seitdem als mögliches Zielprotein für die pharmakologische Beeinflussung der Karzinogenese. Eine Gruppierung der RT-qPCR Ergebnisse hinsichtlich der High-Grade und der Low-Grade

Differenzierung zeigte erhöhte, jedoch statistisch nicht signifikante Werte des T/N Verhältnisses in der Gruppe G3 und 4 von 20,97, Median 15,61, verglichen mit 14,45, Median 8,40 in Gruppe G1 und 2, denen aufgrund des höheren Differenzierungsgrades eine bessere Prognose zugesprochen wird. Nahezu keinen Unterschied im Verhältnis T/N der RT-qPCR wies die Differenzierung der Lokalisation des Tumors auf. Eine statistische Signifikanz ließ sich bezüglich der untersuchten Parameter auch hier nicht nachweisen.

Auch auf Proteinebene zeigte sich eine im Wilcoxon Test statistisch signifikante Überexpression von LGR5 im Tumorgewebe. Anders zu den Ergebnissen der RT-qPCR zeigt hier Patient 8 eine erhöhte Expression von LGR5 im korrespondierenden Normalgewebe auf. Trotzdem sind es auch hier 95 % (19/20) der untersuchten Gewebe die eine intensivere Färbung des Tumorgewebes zeigen. Die bereits in 6.2.3.3 beschriebenen Ergebnisse bezüglich der Parameter UICC-Stadium und Grading ergaben zwar alle mit  $p > 0,05$  kein statistisch signifikantes Ergebnis, jedoch lässt sich auch hier ein Trend beobachten. Anders als in den Ergebnissen der RT-qPCR wiesen im Western Blot die High-Grade Karzinome ein niedrigeres Verhältnis von T/N als die Low-Grade Karzinome auf. Auch die UICC Stadien III und IV zeigten einen ähnlichen Trend mit geringerem Grad an Expression. Ein Zusammenhang zwischen erhöhter LGR5 Expression und den mit einer schlechteren Prognose einhergehenden High-Grade Karzinomen und den fortgeschrittenen Tumorstadien UICC III und IV kann demnach nur auf RNA-Ebene vermutet werden.

Die von Barker et al. erstmals aufgestellte Hypothese, dass LGR5 als ein Marker für intestinale Stammzellen fungiert, markiert einen Meilenstein in der molekularbiologischen Tumorforschung (Barker, van Es et al. 2007). LGR5 wird in zahlreichen Tumoren wie Leber-, Kolon-, Ovarial-, und Basalzellkarzinomen überexprimiert, die Expression steigt dabei mit Fortschreiten der Krankheit an (McClanahna et al 2006; Yamamoto et al. 2003; Tanese 2008). So sind Wnt-aktivierende Mutationen, wie etwa Mutationen des Tumorsuppressors Adenomatous Polypolis Coli (APC) oder  $\beta$ -Catenin, grundlegend für die Initiation der Mehrheit der Kolonkarzinome (Brabletz 2001; Fodde 2007). Als Konsequenz dieser Mutationen wird  $\beta$ -Catenin nicht degradiert, akkumuliert daher im Nukleus und aktiviert so Wnt-Zielgene (Kemper 2012). Ferner wurde postuliert, dass

Kolonkarzinomzellen mit erhöhter Wnt-Aktivität Stammzellmarker exprimieren, sowie eine höhere Teilungsrate und Tumorigenität aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigen Zellen mit geringer Wnt-Aktivität eine vermehrte Expression von Differenzierungsmarkern und sind daher außerstande, zu einem Tumor zu arriivieren (de Sousa, Vermeulen, Richel, & Medema 2011). Im Weiteren konnte auch *in vivo* eine deutlich erhöhte Tumorigenität von LGR5<sup>+</sup>-Stammzellen beobachtet werden, differenziertere Zellen wiesen dieses Charakteristikum nicht auf (Sato 2009). Trotz intensiver Forschung ist bislang nur wenig über die genaue Funktion von LGR5 bekannt. Sollte sich dieser Ansatz jedoch auch in weiterführenden Untersuchungen bestätigen, sind enorme Fortschritte bei der Suche nach gezielter Tumortherapie zu erwarten. Ließe sich zukünftig der für die maligne Entartung ursächliche Anteil der Zellen detektieren, könnte es ebenfalls möglich sein, diese Zellen selektiv zu bekämpfen. Die nach Barker et al. an der Kryptenbasis vermuteten intestinalen Stammzellen konnten in den in 6.2.5.2 dargelegten Ergebnissen der IHC nicht identifiziert werden. Die beurteilten Schnitte wiesen sowohl in LGR5-Antikörper- als auch in HE-Färbung ein nahezu homogenes Färbemuster der Krypten im Kolonepithel auf. Dies könnte eventuell auf die nicht ausreichende Spezifität des LGR5-Antikörpers zurückgeführt werden. Um exakte Aussagen über Lokalisation der LGR5<sup>+</sup> Zellen treffen zu können, sollten hochspezifische sowie -selektive Antikörper verwendet werden – kommerziell erhältliche erfüllen oft diese Standards nicht. Um jedoch eine generelle Aussage über das Vorhandenseins von LGR5 zu treffen, sind jene vollkommen zulässig.

In den vorgestellten Ergebnissen der IHC wiesen 67 % (14/21) der angefertigten Schnitte, verglichen zum Normalgewebe, eine signifikant stärkere Intensität des Tumorgewebes und somit eine stärkere Expression des LGR5 Proteins in malignen Zellen auf. Vergleichbare Ergebnisse lieferten Takahashi et al., die in ihrer Arbeit eine ubiquitäre Färbung des LGR5 Rezeptors im Tumorgewebe und ebenfalls eine Überexpression in den untersuchten CRC, verglichen mit korrespondierendem Normalepithel, nachweisen konnten. Interessanterweise konnten sie bei Ihrer immunhistochemischen Auswertung von Adenomen einzelne deutlich gefärbte Zellen an der Kryptenbasis detektieren. Carcinomata *in situ* zeigten etwas mehr LGR5<sup>+</sup> Zellen in der Kryptenregion, jedoch mit deutlich geringerem Anteil als die bereits die Basalmembran durchbrochenen Adenokarzinome. Es ist ihnen damit

erstmals gelungen den Verlauf der Karzinogenese aus den möglicherweise durch LGR5 markierten Stammzellen über das Carcinoma in situ bis zum vollständig ausgebildetem Adenokarzinom darzustellen (Takahashi, Ishii et al. 2011).

Eine zusätzliche Expressionsanalyse von Adenomgewebe und Carcinomata in situ ist in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgt. Auch ein Vergleich der Kryptenbasis mit Normalgewebe mittels Mikrodissektion und anschließender RT-qPCR Analyse könnte Aufschluss über die von Barker et al. postulierte Lokalisation und Funktion von LGR5 als Stammzellmarker liefern.

Fan et al. konnten mittels Tissue Microarray (TMA) die LGR5 Expression an der Kryptenbasis genauer untersuchen. Bei dieser Methode können bis zu 400 ausgestanzte Gewebezyylinder gleichzeitig auf einem Paraffinblock immunhistologisch analysiert werden (Kononen, Bubendorf et al. 1998). In gesunder Mukosa von nicht erkrankten Patienten waren lediglich wenige Zellen mit schwacher LGR5 Färbung an der Kryptenbasis zu erkennen, jedoch zeigten die untersuchten Adenome zu 28 % (5/18) eine LGR5 spezifische Färbung. Analog zu dem IHC-Ergebnis der vorliegenden Arbeit, zeigte das maligne Gewebe mit 54 % (55/102) eine gesteigerte LGR5 Expression. Eine weitere Analyse von Carcinomata in situ, dem Frühstadium des CRC mit ausschließlich intraepithelialelem Wachstum, wurde nicht vorgenommen. Eine statistisch signifikante Korrelation des Grades der LGR5 Expression bezüglich Patientenalter, Tumorgröße oder Lymphknotenstatus bestand nicht – allerdings wiesen die TMA-Daten der Frauen des untersuchten Patientenkollektivs eine signifikant höhere LGR5 Expression auf. Sie begründeten diese Beobachtung mit der strukturellen Ähnlichkeit des Rezeptors zu den Geschlechtshormonen LH und FSH, die ebenfalls der Familie der Glykoprotein-Hormonrezeptoren angehören (Fan, Wu et al. 2010).

Auch das in der vorliegenden Studie ausgewogene Verhältnis von Männern zu Frauen im Kollektiv der IHC ließ einen Trend der Überexpression bei Frauen bezüglich ihrer LGR5 Expression auf Proteinebene erkennen. Ihr Verhältnis von T/N zeigte einen durchschnittlichen Wert von 1,85 (Median 2,0), verglichen mit 1,63 bei den Männern (Median 1,5). Andere Studien, die zum Teil ein größeres Patientenkollektiv umfassen und die IHC Ergebnisse mit Daten aus RT-qPCR validieren konnten, wiesen eine geschlechtsunabhängigen LGR5 Expression auf (McClanahan, Koseoglu et al. 2006) (Uchida, Yamazaki et al. 2010) (Takahashi,

Ishii et al. 2011).

Die unter 6.2.5.3 dargestellte Auswertung der IHC Ergebnisse anhand klinisch pathologischer Kriterien, zeigt die gleiche Tendenz wie die Ergebnisse der RT-qPCR, jedoch konträr zu den Ergebnissen des Western Blots. Eine intensivere Färbung, und damit einen höheren Expressionsgrad an LGR5 Protein wiesen die UICC Stadien III und IV und die Gruppe der High-Grade Karzinome in der RT-qPCR und IHC auf, dies jedoch ohne statistische Signifikanz. Der vorab auf RNA-Ebene postulierte Zusammenhang zwischen einer hohen LGR5 Expression und dem Tumorprogress, beziehungsweise dem Differenzierungsgrad, wird demnach durch die Ergebnisse in der IHC untermauert. Eine unterschiedliche LGR5 Expression, je nach Lokalisation des CRC, ließ sich nicht nachweisen.

Eine weiterer Beleg für die Rolle von LGR5 in der Karzinogenese wurde in der Studie zum Basalzellkarzinom (BCC) der Haut von Tanese et al. erbracht (Tanese, Fukuma et al. 2008). Gewiss handelt es sich bei Basaliomen der Haut um eine andere Tumorentität, jedoch gelang es in einem Mausmodell weitere Aufschlüsse über die Rolle von LGR5 bei der Karzinogenese des Basalzellkarzinoms zu erhalten. Neben der Tatsache, dass 95 % der analysierten humanen Basalzellkarzinome eine erhöhte LGR5 Expression aufwiesen, führte eine gezielte Inhibition von LGR5 zu verminderter Zellproliferation von BCC-Zelllinien. Zwar missglückte die Anwendung von *LGR5*-shRNA im Tierversuch, jedoch konnte durch *LGR5*-shRNA die Zellproliferation einer BCC Zelllinie *in vitro* gemindert werden.

Eine der Zielsetzungen onkologischer Forschung ist, molekulare Mechanismen der Krebsentstehung und tumorbiologischer Vorgänge, wie Invasion und Metastasierung, zu ergründen. Die einleitend vorgestellte Hypothese, dass Tumore eine heterogene Ansammlung von Zellen sind und dass stammzellähnliche Zellen für die Tumorentstehung und Ausbreitung verantwortlich sind, rückt hierbei immer mehr in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

Sollte zukünftig der Beweis gelingen, dass LGR5 einer dieser Stammzellmarker ist, würde dies einige der Beobachtungen dieser Arbeit erklären. Die Überexpression des Rezeptors in Tumorzellen und insbesondere das vermehrte Auftreten des Rezeptors in fortgeschrittenen und niedrig differenzierten Tumoren würde sich durch eine ebenfalls vermehrte Stammzellaktivität erklären. Zusätzlich könnte

durch eine Kombinatorik aus bisher etablierten Stammzellmarkern wie CD24, CD29, CD133 sowie CD166 und funktionell wichtigen Markern wie CD44 als auch ALDH1A1 (Aldehyde dehydrogenase 1 A1) und die auf in dieser Arbeit fokussierten Wnt-Signaltransduktion zu einer besseren Prognose führen. Bisher jedoch konnte ausschließlich die mittlere erhöhte Expression von ALDH1A1 mit einer CRC Prognose assoziiert werden (Kemper 2012).

Trotz intensiver Forschung ist das CRC die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen und Männern in der Bundesrepublik Deutschland. Dies erfordert neue Herangehensweisen an Früherkennungs- und Therapiemethoden um das Neuauftreten des CRC und seiner Rezidive zu verhindern. Entscheidende Faktoren, bezüglich der Prognose des CRCs, sind der Zeitpunkt seiner Diagnosestellung und die richtige Einschätzung der Malignität des Tumors. Je früher die Krankheit erkannt wird, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit dass eine kurative Therapie noch möglich ist. Hierbei wird je nach Malignität des Tumors, eine Operation mit anschließender, angepasster adjuvanten Chemotherapie und Bestrahlung eingesetzt. Bisher erfolgt das Staging nach Tumorgröße, Ort und Differenzierungsgrad. Die Etablierung neuer immunhistochemischer Marker könnte eine genauere Prognose und sogar eine individuelle Therapieadaptation ermöglichen.

## 8 Anhang

### 8.1 Deskriptive Statistiken

Patientenkollektiv RT-qPCR und WB

UICC						
			Geschlecht			
	Gesamt		männlich		weiblich	
	%	N	%	N	%	N
niedriges Tumorstadium	50,0%	10	80,0%	4	40,0%	6
höheres Tumorstadium	50,0%	10	20,0%	1	60,0%	9
Summe	100,0%	20	100,0%	5	100,0%	15

Grading						
			Geschlecht			
	Gesamt		männlich		weiblich	
	%	N	%	N	%	N
Low- Grade	45,0%	9	80,0%	4	33,3%	5
High- Grade	55,0%	11	20,0%	1	66,7%	10
Summe	100,0%	20	100,0%	5	100,0%	15

Ort						
	Geschlecht					
	Gesamt		männlich		weiblich	
	%	N	%	N	%	N
Colon	60,0%	12	60,0%	3	60,0%	9
Rectum	40,0%	8	40,0%	2	40,0%	6
Summe	100,0%	20	100,0%	5	100,0%	15

#### Patientenkollektiv IHC

UICC						
	Geschlecht					
	Gesamt		männlich		weiblich	
	%	N	%	N	%	N
I und II	42,9%	9	50,0%	4	38,5%	5
III und IV	57,1%	12	50,0%	4	61,5%	8
Summe	100,0%	21	100,0%	8	100,0%	13

Grading						
			Geschlecht			
	Gesamt		männlich		weiblich	
	%	N	%	N	%	N
Low-Grade	47,6%	10	50,0%	4	46,2%	6
High-Grade	52,4%	11	50,0%	4	53,8%	7
Summe	100,0%	21	100,0%	8	100,0%	13

Ort						
			Geschlecht			
	Gesamt		männlich		weiblich	
	%	N	%	N	%	N
Colon	66,7%	14	62,5%	5	69,2%	9
Rectum	33,3%	7	37,5%	3	30,8%	4
Summe	100,0%	21	100,0%	8	100,0%	13

## 8.2 Testergebnisse

Patientenkollektiv RTQ-PCR und WB

WB						
	MITTELWERT	STANDARDABWEICHUNG	MEDIAN	MINIMUM	MAXIMUM	N
WB N	25,96	27,05	17,63	1,45	100,00	20
WB T	73,38	78,34	57,49	5,98	353,85	20
Wilcoxon-Test: p=0,00						

RTQ						
	MITTELWERT	STANDARDABWEICHUNG	MEDIAN	MINIMUM	MAXIMUM	N
RTQ N	1,63	1,55	1,11	,25	5,55	20
RTQ T	20,13	25,50	10,68	2,10	103,40	20
Wilcoxon-Test: p=0,00						

WB T/N				
			Geschlecht	
			Gesamt	männlich
WB T/N	MITTELWERT	8,80	17,83	5,79
	STANDARDABWEICHUNG	16,58	29,12	9,59
	MEDIAN	2,17	2,90	2,07
	MINIMUM	0,45	1,20	0,45
	MAXIMUM	68,97	68,97	34,78
	N	20	5	15
Mann-Whitney-U-Test: p = 0,39				

WB T/N				
		UICC		
		Gesamt	I und II	III und IV
WB T/N	MITTELWERT	8,80	11,53	6,07
	STANDARDABWEICHUNG	16,58	21,41	10,28
	MEDIAN	2,17	1,64	2,42
	MINIMUM	0,45	0,45	1,15
	MAXIMUM	68,97	68,97	34,78
	N	20	10	10
Mann-Whitney-U-Test: p = 0,48				

WB T/N				
		Gesamt	Grading	
			Low-Grade	High-Grade
WB T/N	MITTELWERT	8,80	14,35	4,27
	STANDARDABWEICHUNG	16,58	23,32	6,08
	MEDIAN	2,17	2,04	2,26
	MINIMUM	0,45	1,17	0,45
	MAXIMUM	68,97	68,97	21,59
	N	20	9	11
Mann-Whitney-U-Test: p = 0,55				

WB T/N				
		Gesamt	Ort	
			Colon	Rectum
WB T/N	MITTELWERT	8,80	7,88	10,19
	STANDARDABWEICHUNG	16,58	10,63	23,77
	MEDIAN	2,17	2,42	1,64
	MINIMUM	0,45	1,15	0,45
	MAXIMUM	68,97	34,78	68,97
	N	20	12	8
Mann-Whitney-U-Test: p = 0,30				

RTQ T/N				
		Gesamt	Geschlecht	
			männlich	weiblich
RTQ T/N	MITTELWERT	18,03	15,55	18,86
	STANDARDABWEICHUNG	19,14	19,95	19,50
	MEDIAN	10,60	4,90	12,80
	MINIMUM	0,57	2,40	0,57
	MAXIMUM	66,53	50,05	66,53
	N	20	5	15
Mann-Whitney-U-Test: p = 0,61				

RTQ T/N				
		Gesamt	UICC	
			I und II	III und IV
RTQ T/N	MITTELWERT	18,03	14,50	21,56
	STANDARDABWEICHUNG	19,14	15,87	22,22
	MEDIAN	10,60	7,94	14,94
	MINIMUM	0,57	0,57	2,94
	MAXIMUM	66,53	50,05	66,53
	N	20	10	10
Mann-Whitney-U-Test: p = 0,35				

RTQ T/N				
		Gesamt	Grading	
			Low-Grade	High-Grade
RTQ T/N	MITTELWERT	18,03	14,45	20,97
	STANDARDABWEICHUNG	19,14	16,01	21,68
	MEDIAN	10,60	8,40	15,61
	MINIMUM	0,57	0,57	1,81
	MAXIMUM	66,53	50,05	66,53
	N	20	9	11
Mann-Whitney-U-Test: p = 0,50				

RTQ T/N				
			Ort	
			Gesamt	Colon
RTQ T/N	MITTELWERT	18,03	18,13	17,90
	STANDARDABWEICHUNG	19,14	21,47	16,42
	MEDIAN	10,60	6,43	14,20
	MINIMUM	0,57	2,40	0,57
	MAXIMUM	66,53	66,53	50,05
	N	20	12	8
Mann-Whitney-U-Test: p = 0,97				

Korrelation nach Spearman				
		Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	N
RTQ T/N	WB T/N	0,259	0,271	20

Patientenkollektiv IHC

Intensität T vs Epithel						
	Gesamt					
	MITTELWER T	STANDARDABWEICHUN G	MEDIA N	MINIMU M	MAXIMU M	N
Intensität Tumor	2,29	0,56	2,00	1,00	3,00	21
Intensität Epithel	1,48	0,68	1,00	1,00	3,00	21
Wilcoxon-Test: p=0,00						

T/Epithel				
		Geschlecht		
		Gesamt	männlich	weiblich
T/Epithel	MITTELWERT	1,76	1,63	1,85
	STANDARDABWEICHUNG	0,68	0,74	0,66
	MEDIAN	2,00	1,50	2,00
	MINIMUM	1,00	1,00	1,00
	MAXIMUM	3,00	3,00	3,00
	N	21	8	13
Mann-Whitney-U-Test: p = 0,52				

T/Epithel				
		Gesamt	UICC	
			I und II	III und IV
T/Epithel	MITTELWERT	1,76	1,44	2,00
	STANDARDABWEICHUNG	0,68	0,53	0,71
	MEDIAN	2,00	1,00	2,00
	MINIMUM	1,00	1,00	1,00
	MAXIMUM	3,00	2,00	3,00
	N	21	9	12
Mann-Whitney-U-Test: p = 0,096				

T/Epithel				
		Gesamt	Grading	
			Low-Grade	High-Grade
T/Epithel	MITTELWERT	1,76	1,55	1,95
	STANDARDABWEICHUNG	0,68	0,69	0,65
	MEDIAN	2,00	1,25	2,00
	MINIMUM	1,00	1,00	1,00
	MAXIMUM	3,00	3,00	3,00
	N	21	10	11
Mann-Whitney-U-Test: p = 0,17				

T/Epithel				
		Ort		
		Gesamt	Colon	Rectum
T/Epithel	MITTELWERT	1,76	1,79	1,71
	STANDARDABWEICHUNG	0,68	0,67	0,76
	MEDIAN	2,00	2,00	2,00
	MINIMUM	1,00	1,00	1,00
	MAXIMUM	3,00	3,00	3,00
	N	21	14	7
Mann-Whitney-U-Test: p = 0,86				



### 8.3 Aufklärungsbogen über die Studie

Molekularbiologische Untersuchungen

zum genetischen Profil kolorektaler Karzinome

(Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Fa. metaGen GmbH Berlin)

Die Ursachen der Entstehung der meisten Krebserkrankungen sind bisher nur ungenügend bekannt. Es wird vermutet, dass eine Reihe von bisher unbekanntem genetischen Veränderungen die Entstehung und den Verlauf dieser Tumorerkrankung hervorrufen bzw. beeinflussen.

Ziel dieser Studie:

Ziel der oben genannten Studie ist es, die genetischen Ursachen für Karzinome zu finden und neue Heilungsmethoden zu entwickeln. Wir glauben, dass durch diese Untersuchungen Erkenntnisse gewonnen werden können, die zu einer Verbesserung der Früherkennung und der Heilungschancen von Patienten mit dieser Krebserkrankung führen können.

Durchführung der Studie:

Um die genetischen Ursachen der oben genannten Krebserkrankungen finden zu können, benötigen wir Gewebeproben aus dem Tumor und eine Blutprobe. Die Blutprobe wird während des stationären Aufenthaltes gleichzeitig mit einer sowieso durchzuführenden Blutentnahme durchgeführt. Die Gewebeproben werden ausschließlich während oder nach der Operation **nach Zuschnitt durch einen Pathologen** der Universitätsklinik von einem Chirurgen bzw. einer MTA gewonnen. Es werden **keine** Gewebeentnahmen nur zum Zweck der Studie durchgeführt. So wird nur Gewebematerial, welches die Pathologen **nicht** für die histologische Charakterisierung benötigen und welches sowieso bei der Operation entfernt werden muss, gesammelt. Es entsteht für Sie deshalb **kein zusätzliches Risiko** bei der Behandlung Ihrer Erkrankung

Um die klinischen und pathologischen Daten mit den Forschungsergebnissen zu vergleichen, ist eine Erhebung und elektronische Speicherung dieser Daten notwendig. Im Umgang mit genetischen Untersuchungen muss eine

höchstmögliche Sicherheit in Bezug auf den Datenschutz gewährleistet werden. Daher werden die von Ihnen stammenden Proben nur anonymisiert (d.h. ohne dass Ihre Identität, Ihr Name oder Geburtsdatum erkennbar wird) untersucht und weitergeleitet. Sie erhalten persönlich keine Informationen über die genetischen Ergebnisse, da daraus zum jetzigen Zeitpunkt keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden können, welche die Diagnose oder Therapie Ihrer Erkrankung beeinflussen könnten und da dies nach einer vollständigen Anonymisierung auch gar nicht mehr möglich ist. Auch andere Institutionen (z.B. Versicherungsgesellschaften) könne keine Informationen über die Untersuchungsergebnisse erhalten. Das genetische Material wird nach 10 Jahren Aufbewahrungszeit vernichtet.

Sie selbst werden aus der Studienteilnahme keinen direkten Nutzen ziehen können. Die durch diese Studie gewonnen Ergebnisse können jedoch in Zukunft möglicherweise dazu beitragen, die Ursachen der Erkrankung, an der Sie leiden, genauer zu definieren und eventuell neue Therapiemethoden für zukünftige Patienten zu entwickeln. Wir bitten Sie daher um Ihre Teilnahme an dieser Studie.

Die Teilnahme an der oben genannten Studie ist **freiwillig**. Sie können jederzeit und ohne Angabe von Gründen Ihre Einwilligung widerrufen bzw. zurückziehen, ohne dass Ihnen hierdurch irgendwelche Nachteile entstehen.

Bei weiteren Fragen steht Ihnen gerne Ihr behandelnder Arzt oder einer der unten aufgeführten Ansprechpartner unserer Klinik zur Verfügung.

Priv. Doz. Dr. med. B. Mann

Dr. med. J. Gröne

Chirurgische Klinik I, UKBF, FU Berlin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin **Telefon:** 030 8445 2543, **Telefax:** 030 8445 2740,

**E-Mail:** mann@ukbf.fu-berlin.de

#### **8.4 Einwilligungserklärung zum Forschungsprojekt**

Molekularbiologische Untersuchungen zu genetischen Profilen kolorektaler Karzinome (Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Fa. metaGen GmbH, Berlin).

Inhalt, Vorgehensweise, Risiken und Ziel des obengenannten Forschungsprojektes hat mir \_\_\_\_\_ (Name der Ärztin/des Arztes) ausreichend erklärt. Ich hatte Gelegenheit, Fragen zu stellen, und habe hierauf Antwort erhalten. Ich hatte ausreichend Zeit, mich für oder gegen die Teilnahme an dem Forschungsprojekt zu entscheiden. Ich bin mit der im Rahmen des obengenannten Forschungsprojektes erfolgenden elektronischen Aufzeichnung der bei mir erhobenen klinischen, anamnestischen und pathologischen Daten und ihrer Weitergabe in anonymer Form einverstanden. Die elektronische Verarbeitung der Daten erfolgt unter Beachtung der gesetzlichen Regelungen zum Datenschutz. Darüber hinaus übertrage ich das Eigentum an während der Operation entnommenen Gewebeproben (Tumor- und Normalgewebe) sowie einer Vollblutprobe an das UKBF, Chirurgische Klinik I.

Hiermit erteile ich mein Einverständnis, dass bei der Operation gewonnenes Gewebe, welches nicht für die zur Behandlung meiner Erkrankung notwendigen Untersuchungen benötigt wird und andernfalls verworfen werden würde, sowie eine im Rahmen von notwendigen Blutentnahmen zusätzlich gewonnene Menge von Venenblut für Forschungsprojekte über solide Karzinome verwendet werden darf.

Ich bin damit einverstanden, dass die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen zur weiteren wissenschaftlichen Erforschung der Karzinome genutzt werden können. Mir ist bekannt, dass das genetische Probenmaterial nach 10 Jahren Aufbewahrungszeit vernichtet wird.

---

Unterschrift des Patienten Ort, Datum



## 9 Abkürzungsverzeichnis

Chemikalie	Hersteller
ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase 1 A1
APC	Adenomatous polyposis coli
B2M	$\beta$ -2-Mikroglobulin
BCC	Basalzellkarzinom
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CBF	Campus Benjamin Franklin der Charité
CCD-Kamera	Charge-coupled Device Kamera
cDNA	complementary DNA
Cis	Carcinoma in situ
CIMP	CpG island methylator phenotype
CRC	Kolorektales Karznom
CT-Wert	Threshold Cycle-Wert
Cu	Kupfer
D	Deutschland
D	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DCC	Deleted in colon cancer
DKK-1	

DMPC	Dimethylcarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECACC	Europäische Zellkultursammlung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fa	Firma
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
G	Grading
G	Gauge-Wert, Außendurchmesser
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
Gpr49	Glykoprotein-Rezeptor 49
h	Stunden
Hcl	Chlorwasserstoff
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton

I	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon
LSAB-Methode	Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode
LGR	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor (Protein)
<i>LGR</i>	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor (Gen)
m	männlich
M-MLVRT	Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse-Transkriptase
MCC	Methylcrotonoyl-Coenzym A-Carboxylase
MEM-Puffer	Minimum Essential Medium-Puffer
min	Minuten
ml	Mililiter
MMR	Missed-Match-Repair
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
N	Normalgewebe
N	Anzahl (im Anhang)
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion

PMM-1	Phosphomannomutase 1
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RT-qPCR	Real-Time Quantitative PCR
s	Sekunden
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small inhibiting RNA
T	Tumorgewebe
TAE Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TMA	Tissue Microarray
Tcf-4	Transkriptionsfaktor 4
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
UICC	Union internationale contre le cancer
UV-Licht	ultraviolette Licht
V	Volt
W	Watt

w	weiblich
μl	Mikroliter



## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kolorektales Karzinom.....	10
Abbildung 2: Mehrstufenmodell der Karzinogenese.....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der LGR5 Struktur.....	18
Abbildung 4: Der Glykoprotein-gekoppelte Rezeptor Signaltransduktionsweg.....	19
Abbildung 5: Nischenregulation des normalen intestinalen Epithels und CRC.....	22
Abbildung 6: RT-PCR der Tumorzelllinien.....	54
Abbildung 7: Western Blots der Tumorzelllinien.....	56
Abbildung 8: Schmelzkurven der Positiv- und Negativkontrolle.....	60
Abbildung 9: Schmelzkurvenanalyse von Patient 6.....	61
Abbildung 10: Verdünnungsreihe der Positivkontrolle SW 62.....	62
Abbildung 11: Standardkurve der RT-qPCR.....	63
Abbildung 12: Quantifizierung einer Patienten-Gewebeprobe.....	64
Abbildung 13: LGR5-Expression der RT-qPCR im Boxplot.....	66
Abbildung 14: Bestimmung der Proteinkonzentration.....	68
Abbildung 15: Western Blot des humanen Gewebes .....	69
Abbildung 16: LGR5-Expression der Western Blots im Boxplot.....	72
Abbildung 17: Korrelation von Western Blot und Real-Time PCR.....	76
Abbildung 18: Anteil der Färbungsintensitäten.....	76
Abbildung 19: IHC Patient Nr. 12.....	77
Abbildung 20: IHC Patient Nr. 4.....	78



## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hereditäre Syndrome beim CRC.....	12
Tabelle 2: TNM Klassifikation des CRC.....	14
Tabelle 3: UICC Stadienteilung des CRC. ....	15
Tabelle 4: Chemikalien .....	26
Tabelle 5: Lösungen und Puffer.....	29
Tabelle 6: Primer .....	31
Tabelle 7: Antikörper.....	32
Tabelle 8: Geräte .....	32
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien .....	34
Tabelle 10: Software .....	35
Tabelle 11: Kolonkarzinom Zelllinien .....	35
Tabelle 12: Magenkarzinom Zelllinien.....	36
Tabelle 13: Pankreaskarzinom Zelllinien .....	36
Tabelle 14: Uteruskarzinom Zelllinie.....	36
Tabelle 15: Kulturmedien .....	37
Tabelle 16: PCR Temperaturprogramm.....	42
Tabelle 17: PCR Pipettierschema pro Probe .....	43
Tabelle 18: RT-qPCR Temperaturprogramm.....	45
Tabelle 19: RT-qPCR Temperaturprogramm pro Probe .....	46
Tabelle 20: Übersicht Patientenkollektiv 1 der RT-qPCR und WB.....	58
Tabelle 21: Übersicht Patientenkollektiv 2 der IHC. ....	59
Tabelle 22: Relative Quantifizierung einer Patienten-Gewebeprobe. ....	65
Tabelle 23: Statistische Auswertung der RT-qPCR .....	66
Tabelle 24: RT-qPCR und Western Blots der Patienten. ....	70
Tabelle 25: Statistische Auswertung der Western Blots.....	71

Tabelle 26: Immunohistochemie-Score des humanen Gewebes.....	74
Tabelle 27: Statistische Auswertung der IHC.....	76

## 12 Literaturverzeichnis

- Barker, N., J. H. van Es, et al. (2007). "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene LGR5." Nature 449(7165): 1003-7.
- Barker, N., Ridgway, van Es, van de Wetering, Begthel et al. (2009) Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. Nature 457: 608-611.
- Becker L, H. Q., Mashimo H. (2009). "LGR5, an intestinal stem cell marker, is abnormally expressed in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma." Dis Esophagus. 2010 Feb;23(2):168-74. Epub.
- Bingham, S. A., N. E. Day, et al. (2003). "Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study." Lancet 361(9368): 1496-501.
- Booth, R. A. (2007). "Minimally invasive biomarkers for detection and staging of colorectal cancer." Cancer Lett 249(1): 87-96.
- Bortz, J. (2003). "Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung - Leitfaden für die Verteilungsfreie Analyse kleiner Stichproben." (ISBN 3-540-00069-0).
- Buhr HJ, R. L. (2006). "Kolonkarzinom." In Siewert JR, Rothmund, Schumpelick V Praxis der Viszeralchirurgie Onkologische Chirurgie 2. Auflage Springer Verlag Heidelberg: S. 621-641.
- Civelli, O., Y. Saito, et al. (2006). "Orphan GPCRs and their ligands." Pharmacol Ther 110(3): 525-32.
- Coates, R. J., R. S. Greenberg, et al. (1995). "Anatomic site distribution of colon cancer by race and other colon cancer risk factors." Dis Colon Rectum 38(1): 42-50.
- de la Chapelle, A. and H. Hampel (2010). "Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer." J Clin Oncol 28(20): 3380-7.
- de Lau, W., N. Barker, T. Y. Low, B. K. Koo, V. S. Li et al. (2011) Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. Nature 476: 293-297.

- De Sousa, E. M. F., Vermeulen, L., Richel, D., & Medema, J. P. (2011). Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(4), 647–53.
- Eckstein, P. (1997). "Angewandte Statistik mit SPSS." (ISBN 3-409-12232-X).
- Fan, X. S., H. Y. Wu, et al. (2010). "Expression of LGR5 in human colorectal carcinogenesis and its potential correlation with beta-catenin." *Int J Colorectal Dis* 25(5): 583-90.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* 61(5): 759-67.
- Ferlay, J., Shin, H., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893–2917.
- Fornaro, R., M. Frascio, et al. (2009). "[Chron's disease and cancer]." *Ann Ital Chir* 80(2): 119-25.
- Fuchs, C. S., E. L. Giovannucci, et al. (1994). "A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer." *N Engl J Med* 331(25): 1669-74.
- Fukushima, T. and S. Takenoshita (2001). "Colorectal carcinogenesis." *Fukushima J Med Sci* 47(1): 1-11.
- Gregory, S. G., K. F. Barlow, et al. (2006). "The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1." *Nature* 441(7091): 315-21.
- Grigoryan, T., P. Wend, et al. (2008). "Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice." *Genes Dev* 22(17): 2308-41.
- Haegebarth, A. and H. Clevers (2009). "Wnt signaling, LGR5, and stem cells in the intestine and skin." *Am J Pathol* 174(3): 715-21.
- Hsu, S. Y., Liang, S.-G., & Hsueh, A. J. W. (1998). Characterization of Two LGR Genes Homologous to Gonadotropin and Thyrotropin Receptors with Extracellular Leucine-Rich Repeats and a G Protein-Coupled, Seven-Transmembrane Region. *Molecular Endocrinology*, 12(12), 1830–1845.

- IMPACT (1995). "Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators." Lancet 345(8955): 939-44.
- Jackman, R. J. and C. W. Mayo (1951). "The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon." Surg Gynecol Obstet 93(3): 327-30.
- Jang, B. G., Lee, B. L., & Kim, W. H. (2013). Distribution of LGR5+ cells and associated implications during the early stage of gastric tumorigenesis. PloS One, 8(12), e82390.
- Johns, L. E. and R. S. Houlston (2001). "A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk." Am J Gastroenterol 96(10): 2992-3003.
- Kemper, K., Versloot, M., Cameron, K., Colak, S., de Sousa e Melo, F., de Jong, J. H., ... Medema, J. P. (2012). Mutations in the Ras-Raf Axis underlie the prognostic value of CD133 in colorectal cancer. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 18(11), 3132–41.
- Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, et al. (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell 121(7): 1109-21.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1997). "Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers." Nature 386(6627): 761, 763.
- Kononen, J., L. Bubendorf, et al. (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." Nat Med 4(7): 844-7.
- Korinek, V., N. Barker, et al. (1998). "Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4." Nat Genet 19(4): 379-83.
- Kuhnert, F., C. R. Davis, et al. (2004). "Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1." Proc Natl Acad Sci U S A 101(1): 266-71.
- Lauscher, J. C., C. Loddenkemper, et al. (2007). "Increased pntin expression in human colorectal cancer tissue." Hum Pathol 38(7): 978-85.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1998). "Genetic instabilities in human cancers."

Nature 396(6712): 643-9.

- Makinen, M. J., S. M. George, et al. (2001). "Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis." J Pathol 193(3): 286-94.
- McClanahan, T., S. Koseoglu, et al. (2006). "Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors." Cancer Biol Ther 5(4): 419-26.
- Mezger, J., U. Locherbach, et al. (1997). "[Symptoms, tumor stage and primary treatment in patients with colorectal carcinoma]." Dtsch Med Wochenschr 122(22): 703-8.
- Moertel, C. G., T. R. Fleming, et al. (1990). "Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma." N Engl J Med 322(6): 352-8.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, et al. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." Science 275(5307): 1787-90.
- Moslein, G. (2003). "Clinical implications of molecular diagnosis in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." Recent Results Cancer Res 162: 73-8.
- Munemitsu, S., I. Albert, et al. (1995). "Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein." Proc Natl Acad Sci U S A 92(7): 3046-50.
- Nakata, S., Phillips. E., Goids., V. (2014). „ Emerging role for leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors LGR5 and LGR4 in cancer stem cells.“ Cancer Management and Research, 6, 171–180.
- Norat, T., S. Bingham, et al. (2005). "Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition." J Natl Cancer Inst 97(12): 906-16.
- Nusse, R., C. Fuerer, et al. (2008). "Wnt signaling and stem cell control." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 73: 59-66.
- Parkin, D. M., P. Pisani, et al. (1999). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin

49(1): 33-64, 1.

- Peng, W. C., de Lau, W., Madoori, P. K., Forneris, F., Granneman, J. C. M., Clevers, H., & Gros, P. (2013). Structures of Wnt-Antagonist ZNRF3 and Its Complex with R-Spondin 1 and Implications for Signaling. *PLoS ONE*, 8(12), e83110.
- Radtke, F. and H. Clevers (2005). "Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin." *Science* 307(5717): 1904-9.
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., ... Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262–265.
- Schmiegel, W., C. Pox, et al. (2005). "S3-guideline conference "Colorectal Cancer" 2004." *Dtsch Med Wochenschr* 130 Suppl 1: S5-53.
- Soucek, L., J. Whitfield, et al. (2008). "Modelling Myc inhibition as a cancer therapy." *Nature* 455(7213): 679-83.
- Takahashi, H., H. Ishii, et al. (2011). "Significance of LGR5(+ve) Cancer Stem Cells in the Colon and Rectum." *Ann Surg Oncol*.
- Tanese, K., M. Fukuma, et al. (2008). "G-protein-coupled receptor GPR49 is up-regulated in basal cell carcinoma and promotes cell proliferation and tumor formation." *Am J Pathol* 173(3): 835-43.
- Tomasson, M. H. (2009). "Cancer stem cells: a guide for skeptics." *J Cell Biochem* 106(5): 745-9.
- Truninger, K. and H. E. Blum (2000). "[Screening for prevention and early detection of colorectal carcinoma]." *Ther Umsch* 57(1): 26-32.
- Uchida, H., K. Yamazaki, et al. (2010). "Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer." *Cancer Sci* 101(7): 1731-7.
- van de Wetering, M., E. Sancho, et al. (2002). "The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells." *Cell* 111(2): 241-50.

- Visvader, J. E. (2011). "Cells of origin in cancer." Nature 469(7330): 314-22.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, et al. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." N Engl J Med 319(9): 525-32.
- Walker, F., H. H. Zhang, A. Odorizzi, and A. W. Burgess (2011) LGR5 is a negative regulator of tumorigenicity, antagonizes Wnt signalling and regulates cell adhesion in colorectal cancer cell lines. PLoS. One. 6: e22733.
- Wittekind, C. and B. Oberschmid (2010). "[TNM classification of malignant tumors 2010: General aspects and amendments in the general section]." Pathologe 31(5): 333-4, 336-8.
- Xi, H. Q., Cai, A. Z., Wu, X. S., Cui, J. X., Shen, W. S., Bian, S. B., ... Chen, L. (2014). Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 is associated with invasion, metastasis, and could be a potential therapeutic target in human gastric cancer. Br J Cancer, 110(8), 2011–2020.
- Yamamoto, Y., M. Sakamoto, et al. (2003). "Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations." Hepatology 37(3): 528-33.

### **13 Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Moritz Robert Siedmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchung der Genexpression des G-Protein gekoppelten Rezeptors LGR5 beim kolorektalen Karzinom selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Berlin, den 25.05.2014 Moritz Robert Siedmann



## **14 Curriculum Vitae**

Die elektronische Version der Arbeit enthält aus datenschutzrechtlichen Gründen keinen Lebenslauf.



## **15 Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Buhr für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Chirurgischen Klinik I der Charité - Universitätsmedizin Berlin - Campus Benjamin Franklin erarbeiten zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Jörn Gröne für die direkte Betreuung meiner Dissertation und die ständig gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich zudem bei Birgit Hotz, Marco Arndt und Sonja Dullat vom chirurgischen Forschungslabor Campus Benjamin Franklin, ohne deren große Geduld und Hilfestellung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Mutter, Dr. med. Isabell Siedmann für die lebenslange liebevolle Unterstützung und Valentina Belzer für die ständige Motivation durchzuhalten bedanken.