

Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus der Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. H. J. Buhr

**Chiparray basierte Genexpressionsanalysen beim kolorektalen
Karzinom nach Laser gestützter Mikrodissektion**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen
Doktorwürde der
Charité- Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Maya Heinze aus Berlin

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. B. Mann

Korreferent: Prof. Dr. med. M. van der Giet

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 15.12.2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Definition des kolorektalen Karzinoms.....	7
1.2 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	7
1.3 Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms.....	8
1.3.1 Exogene Risikofaktoren	8
1.3.2 Endogene Risikofaktoren	8
1.3.3 Adenom-Karzinom-Sequenz.....	10
1.4 Morphologie und Klassifikation.....	12
1.4.1 Wachstumstypen und Lokalisation	12
1.4.2 Histopathologische Tumortypisierung	12
1.4.3 Histopathologische Differenzierungstypen (Grading)	13
1.4.4 Tumorstadieneinteilung (TNM/ UICC/ Dukes)	13
1.5 Metastasierung	15
1.5.1 Metastasierung aus klassisch anatomischer Sicht	15
1.5.2 Metastasierung aus molekularbiologischer Sicht.....	16
1.6 Therapie.....	16
1.7 Prognose	18
1.7.1 Histopathologische Prognosefaktoren.....	18
1.7.2 Molekularbiologische Prognosefaktoren.....	20
1.8 Mikrodissektion.....	21
1.9 Chiparray basierte Genexpressionsanalysen	22
2 Ziel der Arbeit	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.2 Arbeitsübersicht	31
3.3 Patientenkollektiv.....	32
3.3.1 Aufklärung und Datenerhebung	32
3.3.2 Asservierung der kolorektalen Gewebe	33
3.3.3 Histologische Begutachtung der kolorektalen Gewebe	33
3.4 Mikrodissektion und mRNA Isolierung.....	34
3.4.1 Vorbereitung der Kryoschnitte.....	35
3.4.2 Durchführung der Mikrodissektion.....	36
3.4.3 Isolierung der mRNA aus den mikrodissezierten Geweben	38
3.5 cDNA Synthese	39
3.5.1 Erststrangsynthese	39
3.5.2 Zweitstrangsynthese	40
3.5.3 Aufreinigung der cDNA.....	40
3.6 In vitro Transkription (IVT).....	40
3.6.1 Aufreinigung der cRNA	41
3.7 Zweite und dritte Amplifikationsrunde	41
3.7.1 cDNA Synthese in der zweiten und dritten Amplifikationsrunde.....	42
3.7.2 IVT in der zweiten Amplifikationsrunde	43
3.7.3 Biotinmarkierte dritte IVT	43
3.8 Quantitätsbestimmungen und Qualitätskontrollen des genetischen Materials.....	44

3.8.1	Ribogreen- und Picogreen-Messung	44
3.8.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung	45
3.8.3	Taqman Untersuchungen einsträngiger cDNA	45
3.8.3.1	Quantifizierung und Qualitätserfassung mittels Taqman PCR	46
3.8.3.2	Durchführung der Taqman PCR	47
3.9	Affymetrix Chipexperimente	47
3.9.1	Chiphybridisierung	48
3.10	Datenverarbeitung und Datennormalisierung	49
3.10.1	Korrektur der Hintergrundhelligkeit	50
3.10.2	Generierung eines repräsentativen Probensatzwertes	50
3.10.3	Beurteilung der Hybridisierungsspezifität	50
3.10.4	Lineare Regression der Expressionsdaten	51
3.11	Definition und Identifikation differenziell exprimierter Sequenzen (DES)	52
3.12	Identifikation und Beurteilung Gewebe diskriminierender Signaturen	53
3.12.1	Clusteranalyse	53
4	Ergebnisse	55
4.1	Histologische Beurteilung des kolorektalen Gewebes	55
4.2	Mikrodissektion	55
4.3	Quantität der einsträngigen cDNA in der ersten Amplifikationsrunde	56
4.4	Quantität der cRNA nach der ersten IVT	57
4.5	Qualität der einsträngigen cDNA in der zweiten Amplifikationsrunde	58
4.6	Ergebnisse wiederholter Versuche	58
4.7	Quantität der doppelsträngigen cDNA	59
4.8	Quantität der cRNA nach der zweiten und dritten IVT	59
4.9	Affymetrix GeneChip [®] Ergebnisse	60
4.10	Identifikation differenziell exprimierter Gene	60
4.10.1	Differenziell exprimierte Sequenzen der Tumorinvasionsfront	63
4.10.2	Differenziell exprimierte Sequenzen der zentralen Tumorregion	65
4.10.3	Schnittmenge der differenziell exprimierten Sequenzen aus beiden Tumorealen	67
4.11	Chiparray basierte Identifikation von Gewebe spezifischen Expressionsprofilen	70
4.11.1	Clusteranalyse der detektierten Sequenzen	71
4.11.2	Clusteranalyse der DES aus der Tumorinvasionsfront	72
4.11.3	Clusteranalyse der DES aus der zentralen Tumorregion	76
4.11.4	Clusteranalyse der DES aus der Tumorinvasionsfront und der zentralen Tumorregion	81
5	Diskussion	83
5.1	Identifikation differenziell exprimierter Gene	83
5.2	Chiparray basierte Klassifikation von Geweben	88
5.3	Intratumoröse Genexpressionsunterschiede	94
6	Zusammenfassung	97
7	Anhang	99
8	Publikationsliste	105
9	Literaturverzeichnis	108
10	Danksagung	116
11	Lebenslauf	117

Abkürzungsverzeichnis

AdCa	Adenokarzinom
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bcl-2	antiapoptotisch wirksames Protoonkogen
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
CAM	<i>cell adhesion molecule</i> (Zelladhäsionsmolekül)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
C _t -Wert	Threshold Cycle
CTP	Cytosin-Triphosphat
DCC	<i>deleted in colon cancer</i> -Gen (auf Chromosom 18q)
DDT	Dithiothreitol
DEPC	Di-Ethyl-Pyrocbonat
DEG	differenziell exprimiertes Gen
DES	differenziell exprimierte Sequenzen (umfasst sowohl ESTs als auch DEGs)
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat (Mischung aus Adenin-, Cytidin-, Guanin- und Thymidin-Tri-Phosphat)
DTT	Di-Thiothreitol (1,4-Dithiol-2,3-Dihydroxybutan)
E	Normalepithel aus der kolorektalen Mukosa
EDTA	Ethylen-Di-Amin-Tetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
ESS	Erststrangsynthese von einsträngiger cDNA aus mRNA oder cRNA
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FAP	Familiäre Adenomatosis Polyposis Coli
G	<i>Grading</i>
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (<i>Housekeeping</i> -Gen)
GTC	Guanidine-Thiocyanate
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
hMLH1	<i>human Mut-L homologue 1</i> (auf Chromosom 3p)
hMSH2	<i>human Mut-S homologue 2</i> (auf Chromosom 2p)
HNPCC	<i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i>
H ₂ O	Wasser
IT	Gewebe aus der Tumorinvasionsfront
IT/E-Quotient	Quotient der Expressionswerte von einem Gens oder EST in der Tumorinvasionsfront und im Normalgewebe des gleichen Patienten
IVT	in vitro Transkription
kb	Kilo-Basenpaar
KCl	Kalium-Chlorid
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>

m	milli, 10^{-3}
μ	mikro, 10^{-6}
M	Mol
Max	Maximum
MCC	<i>mutated in colorectal cancer</i>
MES	Morpholinoethanosulfonsäure
Mg	Magnesium
$MgCl^2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
Min	Minimum
MMP	Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
n	nano, 10^{-9}
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natronlauge
NaH_2PO_4	Natrium-Di-Hydrogen-Phosphat-Mono-Hydrat
Na_2HPO_4	Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat-Di-Hydrat
NTP	Nukleosid-Triphosphat (Mischung aus Adenin-, Cytidin-, Guanin- und Thymidin-Tri-Phosphat)
p	pico, 10^{-12}
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Gewebe aus zentralen Tumoranteilen
RT/E -Quotient	Quotient der Expressionswerte von einem Gen oder EST im zentralen Tumorgewebe und im Normalgewebe des gleichen Patienten
SA-PMP	<i>Streptavidin Paramagnetic Particles</i>
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>saline sodium chloride</i>
SSPE	Saline-Sodium-Phosphat-EDTA-Puffer
SUC	Succinyl-Aldehyd-Dehydrogenase (<i>Housekeeping</i> -Gen)
T	Tumorgewebeprobe
TE	Tris-EDTA Puffer
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TME	totale mesorektale Exzision
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
TNM-Klassifik.	Stadieneinteilung maligner Neoplasien, entsprechend den Richtlinien der UICC
T/E-Quotient	Quotient der Expressionswerte von einem Gen oder EST im Tumorgewebe und im Normalgewebe des gleichen Patienten
Tween	Polyoxyethylen-Sorbitan-Mono-Laurat
U	Unit
UICC	<i>Union Internationale contre le Cancer</i>
UTP	Uracil-Triphosphat
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
ZSS	Zweistransynthese, Synthese einer doppelsträngigen cDNA aus einer einsträngigen cDNA

6 Zusammenfassung

Die differenzielle Genexpression als Folge der molekularen Alteration in Karzinomen spielt eine entscheidende Rolle für das Verständnis der Tumorbilogie und bildet die Grundlage für die Entdeckung neuer diagnostischer Biomarker und therapeutischer Zielgene. Die Chiparray Technologie, welche die simultane Expressionsanalyse tausender Gene in einem Versuch ermöglicht, fand bereits zur Identifikation differenziell exprimierter Gene für verschiedene Tumorentitäten erfolgreich Anwendung.

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von differenziell exprimierten Genen und ESTs (DES) beim kolorektalen Karzinom durch die vergleichende Analyse Chiparray basierter Genexpressionsdaten von korrespondierenden Normal- und Tumorgewebe nach Laser gestützter Mikrodisektion. Zudem wurde die Homogenität der Expression der identifizierten DES innerhalb des Tumorgewebes untersucht, indem definierte Tumorareale, nämlich die an das Normalgewebe grenzende Tumordinvasionsfront sowie zentrale Tumorregionen, mittels Laser gestützter Mikrodisektion getrennt voneinander aufgearbeitet wurden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, unter Verwendung der Clusteranalyse zu untersuchen, inwiefern die kolorektalen Tumor- und Normalgewebe anhand der Genexpressionsdaten nach histopathologischen Kriterien klassifiziert werden konnten.

Die in dieser Arbeit verwendeten GeneChips (HG-U133) von Affymetrix ermöglichten es, die Expression von etwa 33.000 bekannten Genen in den kolorektalen Tumor- und Normalgeweben von 25 Patienten zu messen. Für sämtliche detektierte Sequenzen ist gemäß eines heuristischen Verfahrens eine Rangfolge berechnet worden, anhand derer mittels eines arbiträr gewählten „*cut-offs*“ 200 DES identifiziert wurden, die in den untersuchten kolorektalen Karzinomgeweben überexprimiert waren, sowie 200 weitere, die unterexprimiert waren.

Unter den identifizierten DES fanden sich 42 Gene, die bereits aus der Literatur als im kolorektalen Karzinom differenziell exprimiert bekannt waren, und weitere 43 Gene, die in anderen Tumorentitäten als differenziell exprimiert beschrieben wurden. 182 der in dieser

Arbeit identifizierten DES, darunter 77 überexprimierte sowie weitere 105 unterexprimierte Sequenzen, waren zuvor noch nicht als tumorassoziiert beschrieben worden.

Der Vergleich der identifizierten DES aus der Tumordinvasionsfront und aus der zentralen Tumorregion ergab eine gemeinsame Schnittmenge von nur ca. 50 % der DES, die sich in beiden Tumorarealen als gleichartig differenziell exprimiert erwiesen. Die restlichen 50% erfüllten zwar nicht in beiden Tumorarealen die in dieser Arbeit festgelegten heuristischen Kriterien der differenziellen Expression, waren aber dennoch in den unterschiedlichen Tumorregionen ähnlich exprimiert.

Die untersuchten kolorektalen Gewebeproben ließen sich anhand ihrer gesamten Expressionsprofile in der Clusteranalyse sämtlicher 11.903 detektierter Probensätze eindeutig einer Tumor- und einer Normalgewebegruppe zuordnen.

Es gelang nicht, die untersuchten Gewebeproben anhand ihrer differenziellen Expressionsprofile in der Clusteranalyse der identifizierten DES entsprechend ihrer histopathologischen Eigenschaften zu gruppieren bzw. identifizieren.

Die Normalgewebeproben ließen sich anhand ihrer differenziellen Expressionsprofile nicht reproduzierbar als Gewebeprobe der entwicklungsgeschichtlich unterschiedlichen Darmabschnitte, proximal des Kolon descendens bzw. distal des Kolon transversum, identifizieren.

Die Clusteranalysen ergaben zudem, dass die Gewebe unterschiedlicher Tumorareale, der Tumordinvasionsfront (IT) und der zentralen Tumorregionen (RT), keine eigenständigen Gruppen bildeten, sondern die IT und RT Proben des gleichen Patienten innerhalb des Tumorgewebeclusters in den meisten Fällen korrespondierende Dupletts bildeten und somit bezüglich ihrer Genexpression einander ähnlicher waren als im interindividuellen Vergleich.

Um die statistische Aussagekraft dieser Arbeit weiter zu stärken, wird das Patientenkollektiv auf 75 Patienten erweitert. Des Weiteren werden einzelne identifizierte DES, wie z.B. Claudin 1, auf RNA- und Proteinebene validiert. Der geplante Abgleich der Expressionsprofile mit der 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten wird zeigen, ob sich prognoserelevante Expressionsprofile mit einer von den herkömmlichen histopathologischen Prognoseparametern unabhängigen Aussagekraft ergeben. Inwiefern die in dieser Arbeit identifizierten DES als neue potenzielle Tumormarker bedeutsam sind oder potenziell therapeutische Zielgene darstellen, muss noch weiter evaluiert werden.

10 Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Professor Buhr für die Möglichkeit danken, dass ich im Rahmen meiner Dissertation in der Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, am Campus Benjamin Franklin arbeiten konnte.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Privatdozent Mann. Durch die Überlassung des Themas dieser Arbeit ermöglichte er mir, selbstständig und eigenverantwortlich experimentell zu arbeiten und dadurch einen Beitrag für seine Arbeitsgruppe zu leisten. Herr Privatdozent Mann verfolgte das Entstehen dieser Arbeit mit großem Interesse und förderte es mit vielen wertvollen Anregungen, aufmunternden Worten und konstruktiver Kritik.

Für die außergewöhnlich freudige und anregende Zusammenarbeit, sowie die vielen nützlichen Hilfestellungen und kostbaren Ratschläge, ohne die diese Arbeit nie zu der hier vorliegenden Form gefunden hätte, möchte ich mich herzlich bei Dr. Jörn Gröne bedanken.

Für die nette Arbeitsatmosphäre, sowie die freundliche Unterstützung danke ich Mandy Magbagbeolu, die mir besonders rat- und tatkräftig beiseite stand, Frau Dr. Irina Klamann, Manuela Topp, Marcel Simon, Frau Dr. Simone Kaiser und Herrn Dr. Stefan Röpke.

Des weiteren danke ich sehr herzlich meinem Freund, Gregor Karras, für seine Hilfestellungen bei computertechnischen Notfällen, die vielen wertvollen Ratschläge und die aufmunternden Worte.

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass die von mir vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel: „Chiparray basierte Genexpressionsanalysen beim kolorektalen Karzinom nach Laser gestützter Mikrodissektion“ nur von mir und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Sowohl die benutzten Hilfsmittel als auch die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 17.04.2006

Maya Heinze