

4 Ergebnisse

4.1 Histologische Beurteilung des kolorektalen Gewebes

Die histologische Beurteilung der kryoasservierten kolorektalen Gewebe erfolgte gemeinsam mit der Pathologin Dr. Irina Klamann, die bei der metaGen GmbH beschäftigt war. Von jedem Patienten wurden 7 µm dicke, HE eingefärbte Schnitte des Tumor- und des Normalgewebes hinsichtlich ihrer Eignung für die Studie begutachtet. Von den insgesamt 45 asservierten Tumor- und Normalgeweben erwiesen sich zehn als ungeeignet für die weitere Aufarbeitung. Dabei führten folgende Kriterien zum Ausschluss: drei vermeintliche Tumorpräparate enthielten ausschließlich adenomatöses Gewebe, ein Tumorpräparat enthielt kein angrenzendes Normalgewebe, so dass die Mikrodisektions-gestützte Entnahme von Tumorzellen der Tumordinvasionsfront nicht möglich war, fünf Tumorgewebe enthielten zu wenig Tumorzellen und eine Normalgewebe wies zahlreiche hydropisch geschwollene Zellareale sowie eckige Zellformationen auf, die als Kryoartefakte gewertet wurden.

4.2 Mikrodisektion

Die Mikrodisektion ermöglichte die Extraktion der gewünschten Zellareale (Normalepithel, Tumorzellen der Invasionsfront, Tumorzellen zentraler Tumorregionen) aus den 7 µm dicken HE eingefärbten kolorektalen Normal- und Tumorgewebsschnitten von 35 Patienten. Die mikrodisezierten Flächensummen der 25 Patienten, deren Proben auf Chips hybridisiert wurden, sind Tabelle 7 im Anhang (Seite 104) zu entnehmen.

Vom Normalepithel wurden zwischen 41,12 mm² und 97,89 mm² (Mittelwert: 77,86 mm², Median: 81,31 mm²) ausgeschnitten. Bei Betrachtung sämtlicher mikrodisezierter Proben der 35 Patienten, also auch derer, die nicht auf den Chip hybridisiert wurden, lag die Flächensumme der mikrodisezierten Normalepithelproben, die in späteren Quantitäts- und Qualitätskontrollen unzureichende Ergebnisse lieferten, mit einem Mittelwert von 69,24 mm² bzw. einem Median von 64,23 mm² deutlich unter der durchschnittlich erarbeiteten Flächensumme (Mittelwert: 80,25 mm², Median: 81,56 mm²) der Normalepithelproben, die gute Quantitäts- und Qualitätsergebnisse zeigten.

Die geschnittene Flächensumme der Epithelien aus der Tumordinvasionsfront und des Zentraltumors lag zwischen 41,73 und 85,30 mm² (Mittelwert: 62,73 mm²,

Median: 62,19 mm²). Hier zeichnete sich ein entgegengesetzter Flächensummenunterschied ab zwischen den Tumorepithelproben, die die Quantitäts- und Qualitätskriterien nicht erfüllten (Mittelwert: 69,87 mm², Median: 69,87 mm²) und den weitergeführten Proben (Mittelwert: 62,37 mm², Median: 61,83 mm²). Allerdings ergaben die Wiederholungen dieser Proben, bei denen größere Flächensummen (Mittelwert: 74,02 mm², Median: 74,02 mm²) mikrodiseziert wurden, gute Resultate in den Quantitäts- und Qualitätskontrollen.

Um die Anzahl der Epithelzellen in den Tumor- und Normalgeweben, die für die Chipexperimente mikrodiseziert wurden, abschätzen zu können, wurde ein Zellzählversuch durchgeführt. Unter dem Mikroskop zählten drei Mediziner unabhängig voneinander die Zellkerne in 1 mm² Gewebe, und zwar in jeweils fünf verschiedenen Tumor- und Normalgeweben mit je fünf Zählwiederholungen, anschließend wurden die Werte gemittelt. In einem 8µm dicken Gewebeschnitt mit einer Fläche von 1 mm² wurden im Tumorgewebe durchschnittlich ca. 5700 Zellen (Min: 5360, Max: 9618, Standardabweichung: 1873) und im Normalgewebe ca. 6700 Zellen gezählt (Min: 3511, Max: 7271, Standardabweichung: 1612).

4.3 Quantität der einsträngigen cDNA in der ersten Amplifikationsrunde

Von 35 Patienten wurde die Menge der aus den mikrodisezierten Proben isolierten mRNA nach der ersten Erststrangsynthese mittels quantitativer Taqman PCR bestimmt, die wie unter 3.8.3 beschrieben unter Verwendung der Primer und Sonden für SUC erfolgte. Die C_t-Werte der Proben, die stets in drei Ansätzen gemessen wurden (Dreifachbestimmung), errechneten sich aus dem arithmetischen Mittel der drei Messergebnisse. Als Voraussetzung für die Auswertbarkeit des Versuchs galt ein C_t-Wert von größer 40 für die Negativkontrolle Wasser und von kleiner bzw. gleich 30 für die Positivkontrolle rt4 (RNA aus Blasenkarzinomzelllinie). Unter diesen Bedingungen wurde als Ausschlusskriterium im Sinne einer zu geringen cDNA respektive mRNA Menge ein C_t-Wert der untersuchten Proben von größer 30 gewertet (siehe Abbildung 11).

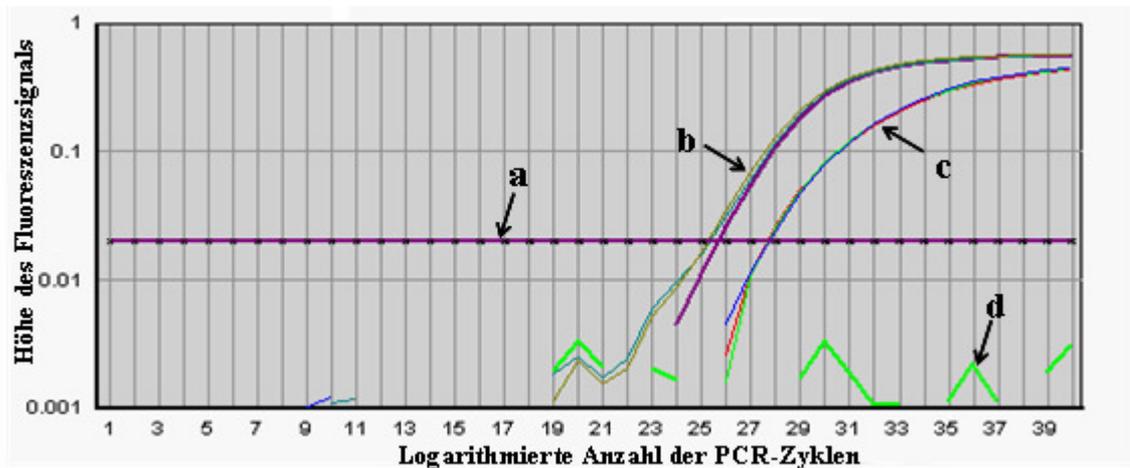


Abbildung 11 Graphische Darstellung einer Taqman PCR unter Verwendung der Primer und Sonden für SUC zur Quantifizierung der einsträngigen cDNA nach der ersten Erststrangsynthese. Der unter 3.7.3 beschriebene Schwellenwert ist mit (a) markiert, (b) kennzeichnet die Kurvenverläufe (Dreifachbestimmung) der Positivkontrolle rt4 (C_T -Wert < 30), (c) die der untersuchten Probe (Dreifachbestimmung) und (d) kennzeichnet den Kurvenverlauf der Negativkontrolle Wasser (C_T -Wert > 40).

Alle durchgeführten Taqman Untersuchungen erfüllten die oben aufgeführten Kriterien der Auswertbarkeit. Da die cDNA der 35 Patienten, aus dem Normalgewebe (E), der Tumorinvasionsfront (IT) und zentralen Tumoranteilen (RT) stammte, ergab sich pro Patient ein Probenriplett bzw. eine Gesamtanzahl von $3 \times 35 = 105$ zu untersuchende Proben. 83 dieser 105 (79,05 %) Proben lieferten C_T -Werte kleiner gleich 30, während 22 (20,95 %) mit C_T -Werten größer 30 die Qualitätskriterien nicht erfüllten. Diese 22 Proben verteilten sich über 15 Patiententriplets. Bei einem dieser 15 Patienten ergaben alle drei Proben (E, IT und RT) C_T -Werte größer 30, bei fünf Patienten je zwei Proben und bei den restlichen neun Patienten je eine Probe. Es fiel auf, dass sich unter den 22 Proben, die nicht die Qualitätskriterien erfüllten, 14 Normalgewebeproben (63,63 %), fünf Proben (22,72 %) aus der Tumorinvasionsfront und drei Proben (13,63 %) aus zentralen Tumorregionen befanden. Eine tabellarische Übersicht über die Messwerte der Proben der 25 Patienten, die auf den Chip hybridisiert wurden, liefert Tabelle 7 im Anhang (Seite 104).

4.4 Quantität der cRNA nach der ersten IVT

Die nach der ersten IVT vorliegende cRNA Menge wurde durch eine Ribogreen Messung bestimmt. Es wurden Werte zwischen 12,93 ng und 4519,20 ng gemessen, der Mittelwert lag

bei 1305 ng, der Median bei 997 ng (Standardabweichung: 998 ng). Von den 75 Proben, die auf Chips hybridisiert wurden, lieferten 55 Proben Mengen von 500 ng und mehr, so dass es möglich war, wie unter Abschnitt 3.7.1 beschrieben, 500 ng der cRNA für die folgende Erststrangsynthese einzusetzen. Die restlichen 20 Proben, deren cRNA Menge unter 500 ng lag, wurden vollständig für die Erststrangsynthese eingesetzt. Die nach der ersten IVT gemessenen cRNA Mengen von den 25 Patienten, deren Proben auf die Chips hybridisiert wurden, sind Tabelle 7 im Anhang (Seite 104) zu entnehmen.

4.5 Qualität der einsträngigen cDNA in der zweiten Amplifikationsrunde

Die quantitative Taqman PCR mit den Sonden und Primern für GAPDH ermöglichte, wie in Abschnitt 3.8.3.1 beschrieben, die Beurteilung der Qualität der einsträngigen cDNA. Als Voraussetzung für die Auswertbarkeit der Versuche sowie für den Ausschluss einer Probe galten die gleichen Kriterien wie bei der quantitativen Taqman PCR mit Sonden und Primern für SUC (siehe oben).

Die insgesamt 83 untersuchten Proben, die von 30 Patienten stammten, erfüllten alle die oben aufgeführten Kriterien der Auswertbarkeit. 78 dieser 83 (93,98 %) Proben lieferten C_T -Werte kleiner 30, während fünf (6,02 %) mit C_T -Werten größer 30 die Qualitätskontrolle nicht bestanden. Diese fünf Proben verteilten sich über vier Patiententriplets. Bei einem dieser vier Patienten lieferten zwei Proben C_T -Werte größer 30, bei den restlichen drei Patienten je eine Probe. Unter den fünf Proben, die nicht den Qualitätskriterien entsprachen, befanden sich zwei Normalgewebeproben, eine weitere Probe aus der Tumorinvasionsfront und die restlichen zwei aus zentralen Tumorregionen. In der Tabelle 7 des Anhangs (Seite 104) sind die GAPDH C_T -Werte der auf den Chip hybridisierten Proben zu finden.

4.6 Ergebnisse wiederholter Versuche

Auf die Chips konnten aus Kostengründen lediglich vollständige Patiententriplets hybridisiert werden. Von den 35 untersuchten Patienten entsprachen 27 Proben, die von 18 Patienten stammten, nicht den mittels der Taqman PCR ermittelten Quantitäts- und Qualitätskriterien. Von diesen 27 Proben bestanden 22 Proben nicht die quantitative Taqman PCR (SUC) und weitere fünf Proben nicht die qualitative Taqman PCR (GAPDH).

Zur Vervollständigung von 25 Patiententriplets sollten zusätzlich zu den insgesamt 17 erfolgreich isolierten vollständigen Patiententriplets weitere acht unvollständige Triplets durch wiederholte Mikrodisektion und mRNA Isolation komplettiert werden. Dazu wurden 14 ausgewählte Proben wiederholt, von denen 12 Proben unzureichende Ergebnisse in der quantitativen Taqman PCR (SUC) lieferten und die restlichen 2 die Qualitätskontrolle (Taqman PCR mit GAPDH) nicht erfüllten. Bei der Wiederholung dieser Proben wurden vom Normalgewebe ca. $93,10 \text{ mm}^2$ (Median: $95,10 \text{ mm}^2$), demnach durchschnittlich etwa 15 mm^2 mehr als beim ersten Versuch, und vom Tumorgewebe ca. $74,02 \text{ mm}^2$, also durchschnittlich ca. 12 mm^2 größere Areale als beim ersten Versuch, mikrodiseziert. Die Wiederholung der 14 Proben war in 12 Fällen erfolgreich, nur 2 Proben zeigten auch bei der wiederholten quantitativen Taqman PCR (SUC) C_t -Werte größer 30. Somit konnten die fehlenden acht Triplets vervollständigt werden. Bei den 2 Proben, die trotz der Wiederholung die Quantitätskriterien nicht erfüllten, handelte es sich um eine Normalgewebeprobe und eine Probe aus der Tumordinvasionsfront. Aus der Tabelle 7 des Anhangs (Seite 104) gehen die erfolgreich wiederholten Versuche der auf den Chip hybridisierten Proben hervor.

4.7 Quantität der doppelsträngigen cDNA

In der zweiten Amplifikationsrunde wurde nach der Zweitstrangsynthese die synthetisierte doppelsträngige cDNA durch eine Picogreen Messung quantifiziert. Die Messwerte lagen zwischen $11,30 \text{ ng}$ und $5457,22 \text{ ng}$, mit einem Mittelwert von 916 ng und einem Median von 391 ng (Standardabweichung: 1.226 ng) und sind Tabelle 7 im Anhang (Seite 104) zu entnehmen.

4.8 Quantität der cRNA nach der zweiten und dritten IVT

Die photometrisch gemessenen cRNA Mengen nach der zweiten IVT lagen zwischen $1,77 \mu\text{g}$ und $106,08 \mu\text{g}$, der Mittelwert lag bei $33,94 \mu\text{g}$, der Median bei $31,50 \mu\text{g}$ (Standardabweichung: $32.518 \mu\text{g}$). Folglich lieferten alle untersuchten Proben nach der zweiten IVT ausreichende Mengen an cRNA, um für die anschließende dritte Erststrangsynthese 500 ng cRNA einzusetzen.

Nach der dritten IVT betragen die Mengen der biotinmarkierten cRNA zwischen 27,5 µg und 110 µg mit einem Mittelwert von 73 µg und einem Median von 75 µg (Standardabweichung: 16,37 µg). Da für die Chiphybridisierung 15 µg biotinmarkierte cRNA erforderlich waren, konnten nach der dritten IVT sämtliche Proben auf den Chip hybridisiert werden.

Die photometrisch gemessenen cRNA Mengen nach der zweiten und biotinmarkierten dritten IVT sind in Tabelle 7 im Anhang (Seite 104) wiederzufinden.

4.9 Affymetrix GeneChip[®] Ergebnisse

Die Probentriplets von 25 Patienten, demnach insgesamt 75 Proben, wurden auf die Affymetrix GeneChips[®] U133A und U133B hybridisiert. Nach der in Abschnitt 3.10 beschriebenen Datennormalisierung der 44.928 Probensätze (U133A und U133B Chip) wurden für die weitere Datenauswertung nur solche Gen- bzw. Transkript spezifischen Probensätze verwendet, die in mindestens 80 %, also bei mindestens 60 der 75 Proben, detektiert waren, das heißt, deren Hybridisierung, welche mittels des Wilcoxontests beurteilt wurde (siehe Abschnitt 3.10.3), sich als spezifisch erwies. Es resultierten 11.903 Probensätze, die dieses Kriterium erfüllten, darunter waren 7.715 Probensätze nach der RefSeq Datenbank (www.nlm.nih.gov/RefSeq) für bekannte Gene spezifisch, wohingegen die restlichen 4.188 Probensätze expressed sequence tags (ESTs) repräsentierten. ESTs sind Expressionsprodukte, deren Sequenz bekannt ist, aber deren Zuordnung zu einem Gen oder Protein nicht definiert ist (120).

4.10 Identifikation differenziell exprimierter Gene

Der Vergleich der Expressionswerte im Tumor- und Normalgewebe ergab erwartungsgemäß, dass die Mehrzahl der Sequenzen in beiden Gewebetypen gleich oder ähnlich exprimiert waren siehe Abbildung 12 a und b.

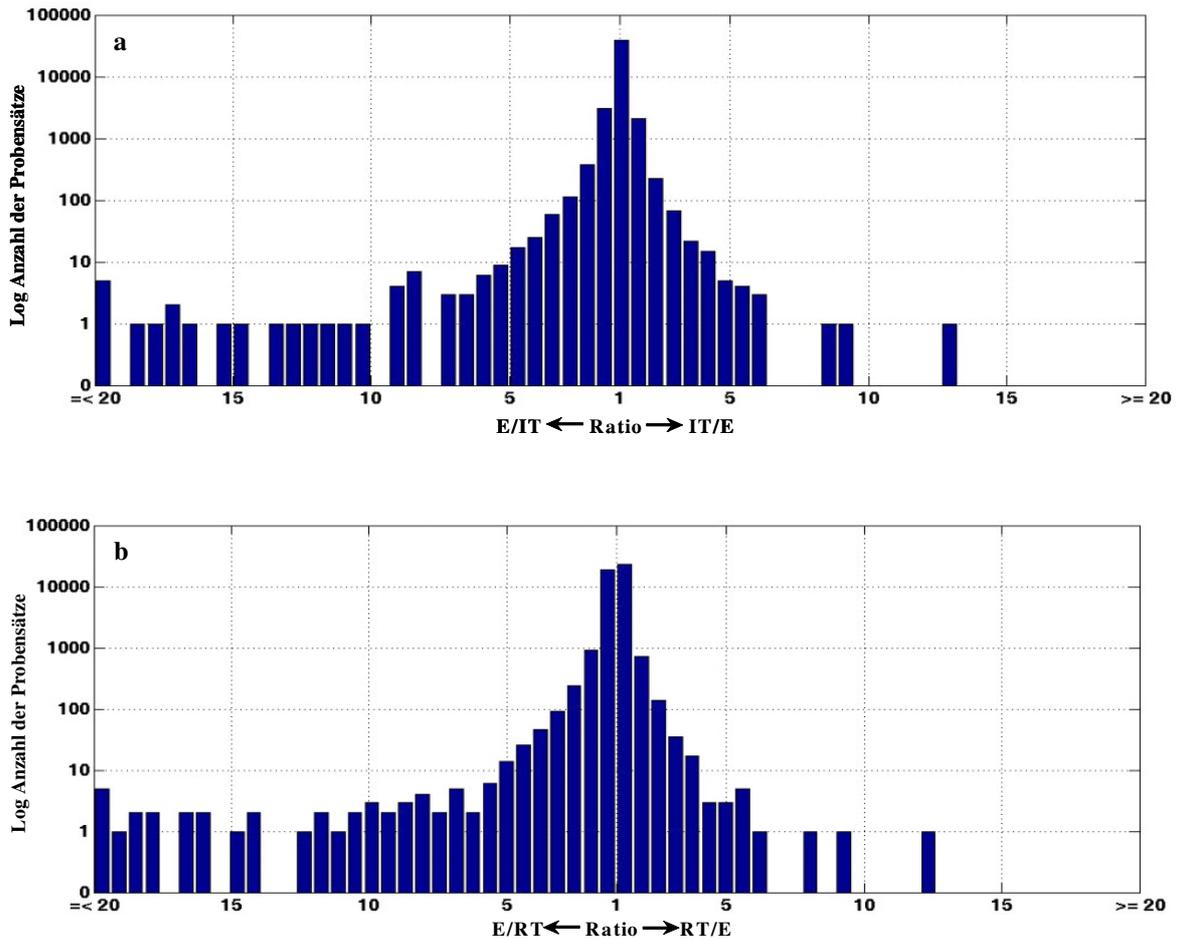


Abbildung 12 Vergleich der Expressionswerte im Tumor- und Normalgewebe. Auf der x-Achse sind die Tumor-Normalgewebequotienten (a) der Tumorinvasionsfront (E/IT bzw. IT/E) und (b) zentraler Tumorregionen (E/RT bzw. RT/E) abzulesen, auf der y-Achse, die logarithmierte Anzahl der Probensätze, das heißt der Gene und ESTs, die den definierten Tumor-Normalgewebequotienten aufweisen. Die Mehrzahl der Sequenzen sind im Tumor- und Normalgewebe gleich oder ähnlich exprimiert, so dass der Tumor-Normalgewebe-Quotient etwa 1 beträgt.

Sowohl in der Tumorinvasionsfront als auch in der zentralen Tumorregion wurden unter Anwendung des in Abschnitt 3.11 beschriebenen Verfahrens 100 über- und 100 unterexprimierte Gene und ESTs als differenziell exprimierte Sequenz (DES) identifiziert. Aus den 100 überexprimierten DES der Tumorinvasionsfront und den 100 der zentralen Tumorregionen, ergab sich eine gemeinsame Schnittmenge von 72 Sequenzen, die sowohl in der Tumorinvasionsfront als auch in zentralen Tumorregionen differenziell überexprimiert waren. Die restlichen 28 überexprimierten Sequenzen zeigten sich in nur einer der beiden Tumoranteile als differenziell überexprimiert. Die gemeinsame Schnittmenge der je 100

differenziell unterexprimierten Sequenzen der Tumorinvasionsfront und der zentralen Tumorregionen umfasste 61 Gene und ESTs. Die restlichen 39 Sequenzen waren entweder in der Tumorinvasionsfront oder in zentralen Anteilen der kolorektalen Tumore differenziell unterexprimiert. Eine Übersicht über die identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen ist Tabelle 8 und Abbildung 13 zu entnehmen.

		insgesamt		gemeinsame Schnittmenge	ausschließlich	
		Invasionsfront	zentrale Tumoranteile		Invasionsfront	zentrale Tumoranteile
überexprimiert	Gene	71	73	51	20	22
	ESTs	29	27	21	8	6
	Summe	100	100	72	28	28
unterexprimiert	Gene	54	56	35	19	21
	ESTs	46	44	26	20	18
	Summe	100	100	61	39	39

Tabelle 8 Tabellarische Übersicht über die identifizierten differenziell über- (a) und unterexprimierten (b) Sequenzen (DES) der Tumorinvasionsfront (IT) und zentraler Tumorregionen (RT), sowie der gemeinsamen Schnittmenge.

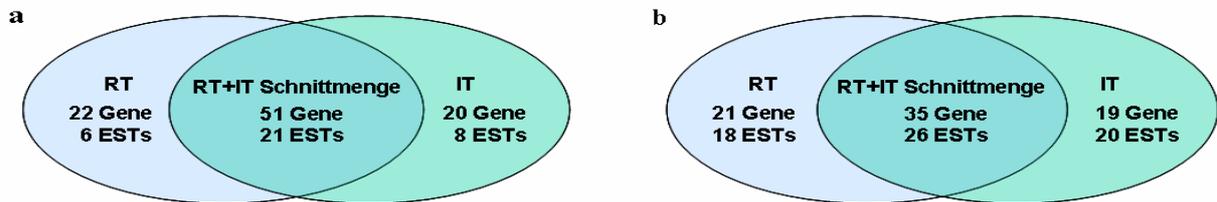


Abbildung 13 Schematische Übersicht der identifizierten differenziell überexprimierten (a) und unterexprimierten (b) Sequenzen (DES) der Tumorinvasionsfront (IT) und zentraler Tumorregionen (RT), sowie der gemeinsamen Schnittmenge.

4.10.1 Differenziell exprimierte Sequenzen der Tumorinvasionsfront

In der Tumorinvasionsfront wurden 28 Gene und ESTs identifiziert, die gegenüber dem Normalgewebe differenziell überexprimiert waren und sich nicht unter den identifizierten überexprimierten DES der zentralen Tumoranteile befanden. Nach Recherchen in der RefSeq Datenbank waren unter diesen 28 überexprimierten Sequenzen 20 bekannte Gene und acht ESTs, die Tabelle 9 Entnommen werden können.

Name des Gens / Probensatznummer des ESTs	Median ± Standardabweichung (Min- Max)	IT / E – Quotient		Wilcoxonstest
		≥ 2	≤ 0,5	
ALEX3 protein (ALEX3)	2,08 ± 1,16 (0,64-4,92)	14	0	<0,0001
Amphiregulin (schwannoma-derived growth factor, AREG)	2,41 ± 2,78 (0,36-12,38)	15	2	0,0001
Claudin 1 (CLDN1, SEMPI)	4,84 ± 5,51 (0,07-18,04)	19	3	<0,0001
7-Dehydrocholesterol reductase (DHCR7)	2,34 ± 0,92 (0,44-3,71)	14	2	<0,0001
Epiregulin (EREG)	4,47 ± 4,93 (0,38-17,09)	17	2	<0,0001
Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma (ETEF1G)	2,51 ± 1,23 (0,27-5,56)	14	1	<0,0001
Macrophage migration inhibitory factor (Glycosylation-inhibiting factor, MIF)	2,78 ± 3,10 (0,34-16,8)	19	2	<0,0001
Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase, MMP12)	3,26 ± 4,11 (0,27-20,85)	19	2	<0,0001
Minichromosome maintenance deficient 2 (Mitotin, MCM2)	2,37 ± 2,15 (0,31-8,72)	16	3	<0,0001
Plastin 3 (PLS3)	2,37 ± 1,71 (0,24-5,35)	14	2	<0,0001
Pleckstrin homology-like domain family A member 1 (PHLDA1), Probensatznummer: 217996_at	3,10 ± 2,32 (0,18-9,08)	15	1	<0,0001
Prefoldin 2 (PFDN2)	2,18 ± 0,99 (0,45-4,36)	15	1	<0,0001
Prefoldin 4 (PFDN4), Probensatznummer: 205362_s_at	2,10 ± 1,16 (0,70-4,98)	13	0	<0,0001
RNA polymerase I, 16 kDa subunit	2,14 ± 1,80 (0,74-10,43)	16	0	<0,0001
Roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (ROBO1)	2,65 ± 1,80 (0,38-7,17)	13	2	0,0001
Sin3-associated polypeptide (SAP18)	2,50 ± 1,78 (0,53-9,19)	13	0	<0,0001
Topoisomerase II alpha (TOP2A)	2,38 ± 1,63 (0,49-7,23)	15	1	<0,0001
Transmembrane 4 superfamily member 1 (TM4SF1), Probensatznummer: 209386_at	3,01 ± 2,27 (0,23-9,92)	19	3	<0,0001
Transmembrane 4 superfamily member 1 (TM4SF1), Probensatznummer: 215034_s_at	3,76 ± 3,25 (0,16-11,37)	18	3	<0,0001
Transmembrane prostate androgen induced (TMEPAI, STAG1, PMEPA1)	4,05 ± 6,03 (0,09-22,19)	17	4	0,0001
213320_at	2,00 ± 0,85 (0,46-3,88)	9	3	<0,0001
214193_s_at	2,04 ± 1,12 (0,40-4,92)	12	2	<0,0001
221922_at	2,74 ± 1,41 (0,23-5,53)	17	2	0,0001
225295_at	4,36 ± 3,36 (0,22-12,52)	18	3	<0,0001
225541_at	3,04 ± 3,47 (0,22-17,42)	17	1	0,0001
235573_at	1,87 ± 1,23 (0,45-5,36)	11	2	<0,0001
235749_at	2,16 ± 1,71 (0,31-8,48)	12	1	<0,0001
241782_at	1,96 ± 1,77 (0,32-7,08)	13	2	0,0001

Tabelle 9 Tabellarische Übersicht über die als differenziell überexprimiert identifizierten Gene und ESTs der Tumorinvasionsfront (IT). Der IT/E–Quotient beschreibt den Quotient der Expressionswerte von einem Gen oder EST in der Tumorinvasionsfront und im Normalgewebe (E) des gleichen Patienten.

Weitere 39 Sequenzen, darunter 19 Gene und 20 ESTs, wurden identifiziert, die in der Tumorinvasionsfront gegenüber dem Normalgewebe differenziell unterexprimiert waren, nicht jedoch in den zentralen Tumoranteilen. Diese Sequenzen sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Name des Gens / Probensatznummer des ESTs	Median \pm Standardabweichung (Min- Max)	IT / E – Quotient		Wilcoxonstest
		≥ 2	$\leq 0,5$	
Abhydrolase domain containing 3 (ABHD3)	0,36 \pm 0,42 (0,10-1,84)	0	17	<0,0001
B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2)	0,38 \pm 0,57 (0,16-2,11)	1	18	<0,0001
Butyrophilin-like 3 (BTNL3)	0,43 \pm 0,94 (0,18-4,06)	2	16	<0,0001
Fatty acid binding protein 1 (FABP1)	0,34 \pm 5,38 (0,02-27,38)	5	16	0,0006
Fibrinogen-like 2 (FGL2)	0,41 \pm 0,54 (0,18-2,78)	1	17	<0,0001
Growth hormone receptor (GHR)	0,44 \pm 1,52 (0,08-6,51)	3	16	0,0024
Human heat shock protein 2 (HSPA2)	0,43 \pm 1,44 (0,13-5,89)	2	16	0,0005
Human rearranged immunoglobulin lambda light chain	0,16 \pm 15,80 (0,02-69,98)	3	19	0,0006
Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (NR3C1)	0,35 \pm 1,06 (0,08-5,40)	1	20	<0,0001
Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2 (NR5A2)	0,33 \pm 1,52 (0,10-5,76)	3	18	<0,0001
O-acetyltransferase (CAS1)	0,49 \pm 0,43 (0,22-1,86)	0	17	0,0002
Phospholipase C, gamma 2 (PLCG2)	0,48 \pm 1,26 (0,09-5,76)	2	16	0,0004
Selenium binding protein 1 (SELENBP1)	0,29 \pm 3,47 (0,08-12,75)	3	17	0,0002
Synaptotagmin-like 2 (SYTL2)	0,35 \pm 0,65 (0,12-2,52)	2	17	<0,0001
Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6 (TRPM6)	0,14 \pm 7,81 (0,02-37,15)	3	20	<0,0001
Tripartite motif-containing 36 (TRIM36)	0,32 \pm 0,67 (0,09-3,26)	1	17	<0,0001
UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (UGT1A1), Probensatznummer: 215125_s_at	0,30 \pm 1,40 (0,07-6,51)	2	20	<0,0001
UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (UGT1A1), Probensatznummer: 207126_x_at	0,45 \pm 0,99 (0,15-4,63)	2	17	<0,0001
UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A9 (UGT1A9)	0,43 \pm 0,87 (0,13-3,83)	2	16	<0,0001
204687_at	0,40 \pm 1,22 (0,19-5,32)	3	16	0,0001
206461_x_at	0,22 \pm 1,83 (0,05-6,82)	3	19	<0,0001
212859_x_at	0,19 \pm 3,79 (0,05-18,06)	3	18	<0,0001
214669_x_at	0,24 \pm 11,85 (0,02-60,19)	3	18	0,0005
214836_x_at	0,22 \pm 5,39 (0,04-27,24)	3	18	0,0001
220723_s_at	0,20 \pm 1,08 (0,08-5,07)	2	19	<0,0001
221696_s_at	0,48 \pm 0,67 (0,24-3,13)	1	18	<0,0001
221841_s_at	0,25 \pm 1,95 (0,08-8,03)	3	19	<0,0001
226519_s_at	0,44 \pm 0,75 (0,16-2,86)	3	17	<0,0001
228707_at	0,28 \pm 1,88 (0,11-8,50)	2	17	<0,0001
229070_at	0,08 \pm 7,64 (0,02-29,81)	3	21	<0,0001
229659_s_at	0,27 \pm 3,20 (0,03-12,96)	4	16	0,0009
230757_at	0,37 \pm 0,73 (0,13-2,69)	2	17	<0,0001
231120_x_at	0,16 \pm 1,25 (0,08-4,39)	3	19	<0,0001
235349_at	0,42 \pm 0,40 (0,11-2,07)	1	16	<0,0001
235350_at	0,40 \pm 5,51 (0,12-28,41)	3	17	<0,0001
236313_at	0,18 \pm 1,18 (0,03-4,95)	3	19	<0,0001
238846_at	0,32 \pm 2,39 (0,13-11,37)	3	17	0,0001
240770_at	0,36 \pm 1,91 (0,17-9,64)	3	17	<0,0001
36920_at	0,36 \pm 0,76 (0,15-3,44)	2	17	<0,0001

Tabelle 10 Tabellarische Übersicht über die differenziell unterexprimierten Gene und ESTs der Tumorinvasionsfront. Der IT/E-Quotient beschreibt den Quotient der Expressionswerte von einem Gen oder EST in der Tumorinvasionsfront und im Normalgewebe (E) des gleichen Patienten.

4.10.2 Differenziell exprimierte Sequenzen der zentralen Tumorregion

In zentralen Tumorregionen wurden 28 Gene und ESTs als gegenüber dem Normalgewebe differenziell überexprimiert identifiziert, die sich nicht unter den überexprimierten DES der Tumorinvasionsfront befanden. Nach Recherchen in der RefSeq Datenbank waren unter diesen 28 überexprimierten Sequenzen 22 bekannte Gene und sechs ESTs, die in Tabelle 11 aufgelistet sind.

Name des Gens / Probensatznummer des ESTs	Median ± Standardabweichung (Min- Max)	RT / E-Quotient ≥ 2	≤ 0,5	Wilcoxonstest
Annexin A3 (ANXA3)	1,98 ± 1,18 (0,63-5,20)	17	0	<0,0001
Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	2,23 ± 2,17 (0,76-10,94)	16	0	<0,0001
CDC28 protein kinase 1 (CKS1)	2,39 ± 1,37 (0,89-6,48)	21	0	<0,0001
Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3)	2,21 ± 1,78 (0,77-7,83)	18	0	<0,0001
Down syndrome critical region gene 2 (DSCR2)	2,17 ± 2,87 (0,60-15,45)	18	0	<0,0001
Glutamine PRPP amidotransferase (GPAT)	2,08 ± 0,94 (0,45-4,42)	13	1	<0,0001
Guanine monphosphate synthetase (GMPS)	2,31 ± 1,18 (0,50-6,13)	22	1	<0,0001
Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM, HMMR)	3,22 ± 3,04 (0,43-13,65)	23	1	<0,0001
Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2)	1,99 ± 2,05 (0,82-10,80)	18	0	<0,0001
Karyopherin alpha 2 (KPNA2)	2,65 ± 1,72 (0,69-8,72)	23	0	<0,0001
Member RAS oncogene family (RAN)	2,57 ± 1,27 (0,89-5,74)	18	0	<0,0001
Nucleolar protein family A, member 2 (NOLA2)	2,21 ± 1,01 (0,86-5,25)	18	0	<0,0001
Nucleosome assembly protein 1-like 1 (NAP1L1) (204528_s_at2)	2,44 ± 1,16 (0,60-4,95)	22	0	<0,0001
Nucleosome assembly protein 1-like 1 (NAP1L1) (208752_x_at2)	2,65 ± 1,06 (0,74-4,49)	23	0	<0,0001
Nucleosome assembly protein 1-like 1 (NAP1L1) (213864_s_at2)	2,90 ± 1,23 (0,55-5,33)	25	0	<0,0001
Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	2,52 ± 2,22 (0,67-10,16)	19	0	<0,0001
Replication factor C3 (RFC3)	2,05 ± 0,70 (0,85-4,08)	19	0	<0,0001
Ribonuclease P, 40kD subunit (RPP40)	2,47 ± 1,37 (0,63-6,60)	21	0	<0,0001
Ribonucleotide reductase M2 (RRM2)	3,29 ± 4,04 (0,49-20,63)	21	1	<0,0001
Solute carrier family 12A, member 2 (SLC12A2)	2,40 ± 1,36 (0,44-5,69)	17	1	<0,0001
Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase, SCD), Probensatznummer: 223839_s_at	2,85 ± 4,82 (0,54-22,83)	23	0	<0,0001
Transketolase (TKT)	2,49 ± 1,67 (0,93-6,59)	16	0	<0,0001
218542_at	2,75 ± 1,96 (0,41-8,92)	20	1	<0,0001
224601_at	2,13 ± 0,72 (0,74-3,69)	23	0	<0,0001
227475_at	9,24 ± 6,64 (0,86-25,51)	27	0	<0,0001
227759_at	2,05 ± 1,36 (0,67-4,92)	19	0	<0,0001
228754_at	5,71 ± 6,25 (0,59-31,87)	26	0	<0,0001
229215_at	6,19 ± 6,08 (0,71-24,93)	25	0	<0,0001

Tabelle 11 Tabellarische Übersicht über die als differenziell überexprimiert identifizierten Gene und ESTs der zentralen Tumorregionen (RT). Der RT/E-Quotient beschreibt den Quotient der Expressionswerte von einem Gen oder EST im zentralen Tumorgewebe (RT) und im Normalgewebe (E) des gleichen Patienten.

In den zentralen Tumorregionen waren gegenüber dem Normalgewebe weitere 39 Sequenzen differenziell unterexprimiert, die sich nicht in der Tumorinvasionsfront als differenziell unterexprimiert zeigten. Von diesen repräsentierten gemäß der RefSeq Datenbank 21

Sequenzen bekannte Gene und weitere 18 ESTs. Es resultierte die Tabelle 12 zu entnehmende Genliste.

Name des Gens / Probenanzahlnummer des ESTs	Median \pm Standardabweichung (Min- Max)	RT / E - Quotient		Wilcoxonstest
		≥ 2	$\leq 0,5$	
Adaptor-related protein, complex 1 gamma, subunit 1 (APIG1)	0,21 \pm 0,33 (0,09-1,33)	0	25	<0,0001
Adenylate cyclase 9 (ADCY9)	0,41 \pm 0,27 (0,19-1,40)	0	23	<0,0001
Amiloride binding protein 1 (ABP1)	0,41 \pm 2,35 (0,12-12,27)	2	21	<0,0001
Amylase, alpha 1A (AMY1A)	0,32 \pm 0,86 (0,08-3,50)	2	21	<0,0001
Carnitine palmitoyltransferase I (CPT1B)	0,31 \pm 0,91 (0,06-4,52)	1	23	<0,0001
CTCL tumor antigen se57-1 (SE57-1)	0,41 \pm 0,35 (0,12-1,49)	0	21	<0,0001
Fucosidase, alpha 1 (FUCA1)	0,35 \pm 0,27 (0,17-1,14)	0	22	<0,0001
Hematopoietic cell-specific Lyn, substrate 1 (HCLS1)	0,44 \pm 0,36 (0,13-1,85)	0	21	<0,0001
Hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD)	0,45 \pm 1,09 (0,08-5,67)	1	21	<0,0001
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (HMGCS2)	0,26 \pm 0,38 (0,02-1,54)	0	22	<0,0001
Matrilin 2 (MATN2)	0,25 \pm 0,40 (0,04-1,53)	0	22	<0,0001
MAWD binding protein (MAWBP)	0,28 \pm 0,64 (0,05-2,52)	1	23	<0,0001
Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS)	0,44 \pm 0,81 (0,13-3,55)	2	21	<0,0001
Peroxisome proliferative activated receptor gamma, coactivator 1 (PPARGC1)	0,41 \pm 0,70 (0,15-3,56)	2	22	<0,0001
3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2 (PAPSS2)	0,33 \pm 0,84 (0,17-4,53)	1	21	<0,0001
Protein tyrosine phosphatase, receptor type C (PTPRC)	0,46 \pm 0,31 (0,09-1,49)	0	21	<0,0001
Rabconnectin-3 (RC3)	0,32 \pm 0,28 (0,13-1,19)	0	22	<0,0001
Sulfotransferase family 1A, member 3 (SULT1A3)	0,32 \pm 0,49 (0,14-2,03)	1	21	<0,0001
Synaptotagmin-like 2 (SYTL2)	0,34 \pm 0,26 (0,05-1,11)	0	21	<0,0001
Tetraspan 1 (TSPAN-1)	0,23 \pm 0,63 (0,07-3,15)	1	23	<0,0001
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (TNFRSF6), (Fas (CD95, Apo-1) protein is encoded by the TNFRSF6 gene)	0,34 \pm 0,36 (0,08-1,73)	0	21	<0,0001
212980_at	0,42 \pm 0,42 (0,12-1,88)	0	23	<0,0001
213340_s_at	0,49 \pm 0,22 (0,23-1,02)	0	23	<0,0001
220041_at	0,29 \pm 0,42 (0,07-1,96)	0	25	<0,0001
221610_s_at	0,41 \pm 0,51 (0,15-2,33)	1	21	<0,0001
223449_at	0,37 \pm 0,49 (0,12-1,88)	0	22	<0,0001
224823_at	0,29 \pm 0,20 (0,12-0,86)	0	22	<0,0001
224973_at	0,38 \pm 0,51 (0,06-1,94)	0	22	<0,0001
228642_at	0,29 \pm 0,36 (0,06-1,72)	0	22	<0,0001
229111_at	0,36 \pm 0,29 (0,19-1,38)	0	22	<0,0001
231899_at	0,28 \pm 0,57 (0,04-2,69)	1	23	<0,0001
231925_at	0,16 \pm 3,22 (0,04-16,63)	2	22	<0,0001
232707_at	0,23 \pm 0,59 (0,07-2,34)	1	25	<0,0001
235264_at	0,43 \pm 0,31 (0,16-1,38)	0	21	<0,0001
235299_at	0,39 \pm 0,42 (0,09-2,18)	1	22	<0,0001
237521_x_at	0,25 \pm 2,21 (0,06-10,29)	2	22	<0,0001
239587_at	0,44 \pm 0,24 (0,15-1,13)	0	21	<0,0001
242317_at	0,35 \pm 0,33 (0,17-1,48)	0	21	<0,0001
33494_at	0,45 \pm 0,29 (0,16-1,26)	0	23	<0,0001

Tabelle 12 Tabellarische Übersicht über die als differenziell unterexprimierten identifizierten Gene und ESTs der zentralen Tumorregionen (RT). Der RT/E-Quotient beschreibt den Quotient der Expressionswerte von einem Gen oder EST im zentralen Tumorgewebe (RT) und im Normalgewebe (E) des gleichen Patienten.

4.10.3 Schnittmenge der differenziell exprimierten Sequenzen aus beiden Tumorarealen

Von den im kolorektalen Karzinomgewebe identifizierten differenziell überexprimierten Sequenzen waren 72 Sequenzen, darunter 51 Gene und 21 ESTs, sowohl in der Tumorinvasionsfront als auch in den zentralen Tumorregionen differenziell überexprimiert. Eine Übersicht hierzu liefert Tabelle 13.

Name des Gens / Probensatznummer des ESTs	Median ± Standardabweichung (Min- Max)		T / E – Quotient				Wilcoxonstest	
	IT	RT	IT ≥ 2	IT ≤ 0,5	RT ≥ 2	RT ≤ 0,5	IT	RT
5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase (IMP cyclohydrolase,ATIC)	2,30 ± 1,29 (0,41-6,41)	1,99 ± 0,99 (0,76-4,98)	14	1	19	0	<0,0001	<0,0001
Anillin (ANLN)	3,21 ± 2,91 (0,14-9,40)	4,22 ± 6,24 (0,48-33,46)	18	2	24	1	<0,0001	<0,0001
ATP-binding cassette, sub-family E, member 1 (ABCE1)	2,15 ± 0,99 (0,49-3,91)	2,13 ± 0,92 (0,70-4,75)	12	2	19	0	<0,0001	<0,0001
Centromere protein A (CENPA)	3,01 ± 1,67 (0,27-5,95)	2,35 ± 2,02 (0,55-10,10)	14	2	20	0	<0,0001	<0,0001
Centromere protein F (mitosin, CENPF)	2,77 ± 1,86 (0,28-7,82)	2,63 ± 2,18 (0,67-11,72)	16	1	20	0	<0,0001	<0,0001
c-Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	3,05 ± 1,29 (0,30-5,23)	2,47 ± 1,58 (0,54-5,83)	20	1	22	0	<0,0001	<0,0001
Collagen, type I, alpha 2 (COL1A2)	4,21 ± 6,50 (0,10-24,74)	4,04 ± 6,48 (0,25-32,18)	20	1	25	2	<0,0001	<0,0001
Core-binding factor, subunit beta (CBFB)	2,74 ± 1,09 (0,33-4,60)	2,39 ± 0,84 (0,61-3,57)	19	3	21	0	<0,0001	<0,0001
CSE1 chromosome segregation 1-like (CSE1L), Probensatznummer: 201111_at	3,99 ± 2,51 (0,13-9,72)	3,68 ± 2,47 (0,59-10,80)	19	1	26	0	<0,0001	<0,0001
CSE1 chromosome segregation 1-like (CSE1L), Probensatznummer: 201112_s_at	2,83 ± 1,69 (0,27-6,56)	2,77 ± 1,31 (0,89-6,52)	19	1	23	0	<0,0001	<0,0001
CSE1 chromosome segregation 1-like (CSE1L), Probensatznummer: 210766_s_at	2,81 ± 1,73 (0,38-6,63)	2,73 ± 1,31 (0,74-6,24)	19	1	22	0	<0,0001	<0,0001
Cyclin B1 (CCNB1)	2,73 ± 3,43 (0,28-16,16)	2,75 ± 3,80 (0,72-19,20)	16	1	20	0	<0,0001	<0,0001
Dachshund homolog (DACH)	3,29 ± 4,22 (0,13-18,03)	3,60 ± 3,18 (0,44-13,81)	18	4	23	2	0,0012	<0,0001
DNAJ domain-containing (MCJ)	2,77 ± 2,27 (0,35-10,05)	2,48 ± 3,11 (0,40-14,80)	18	1	19	1	<0,0001	<0,0001
Dyskeratosis congenita 1 (Dyskerin, DKC1), Probensatznummer: 201478_s_at	2,55 ± 1,33 (0,11-5,93)	2,29 ± 1,56 (0,57-7,88)	15	3	20	0	<0,0001	<0,0001
Dyskeratosis congenita 1 (Dyskerin, DKC1), Probensatznummer: 201479_at	2,68 ± 1,28 (0,20-5,15)	2,52 ± 1,16 (0,96-5,94)	19	1	21	0	<0,0001	<0,0001
Epithelial stromal interaction 1 (EPSTI1)	2,33 ± 1,54 (0,53-6,02)	2,00 ± 1,55 (0,37-6,44)	13	0	20	1	0,0003	<0,0001
Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (EIF2S2)	2,61 ± 1,34 (0,15-5,08)	2,38 ± 0,94 (0,86-4,71)	18	2	22	0	<0,0001	<0,0001
General transcription factor IIIA (GTF3A), Probensatznummer: 201338_x_at	2,20 ± 0,86 (0,72-4,00)	2,07 ± 0,89 (0,87-4,40)	17	0	20	0	<0,0001	<0,0001
General transcription factor IIIA (GTF3A), Probensatznummer: 215091_s_at	2,42 ± 0,96 (0,77-4,03)	2,33 ± 0,91 (0,60-4,18)	18	0	22	0	<0,0001	<0,0001
Glucosamine-6-phosphate isomerase (GNPI)	3,04 ± 1,82 (0,35-7,56)	2,75 ± 1,38 (0,72-6,22)	16	2	20	0	<0,0001	<0,0001
Heat shock protein (HSP105B)	3,66 ± 1,97 (0,25-8,37)	3,90 ± 1,77 (0,65-7,55)	21	3	26	0	<0,0001	<0,0001
Hypothetical protein HSPC014, Probensatznummer: 217769_s_at	2,00 ± 1,03 (0,52-3,70)	1,98 ± 0,92 (0,72-4,36)	15	0	19	0	<0,0001	<0,0001
Interferon induced transmembrane protein 1 (IFITM1)	4,12 ± 3,38 (0,28-12,00)	4,13 ± 3,37 (0,45-14,82)	18	2	25	1	<0,0001	<0,0001
Interferon induced transmembrane protein 2 (IFITM2)	3,85 ± 2,94 (0,20-12,50)	3,83 ± 2,88 (0,48-11,00)	19	2	24	1	<0,0001	<0,0001
Karyopherin, beta 3 (Importin, KPNB3)	3,26 ± 1,99 (0,38-8,42)	2,99 ± 1,92 (0,68-7,85)	18	2	24	0	<0,0001	<0,0001
MAC30, Probensatznummer: 212281_s_at	2,87 ± 2,07 (0,31-11,26)	2,85 ± 1,89 (0,65-9,60)	17	1	21	0	<0,0001	<0,0001
MAC30, Probensatznummer: 212282_at	2,68 ± 1,64 (0,41-8,37)	2,70 ± 1,71 (0,72-8,03)	18	1	23	0	<0,0001	<0,0001
Mitochondrial ribosomal protein S23 (MRPS23)	2,87 ± 2,29 (0,27-11,55)	2,64 ± 1,49 (0,83-7,48)	19	2	21	0	0,0001	<0,0001
Nebulette (NEBL), Probensatznummer: 203961_at	2,96 ± 2,88 (0,30-11,89)	2,81 ± 2,88 (0,83-12,98)	21	1	24	0	<0,0001	<0,0001
Nebulette (NEBL), Probensatznummer: 203962_s_at	2,79 ± 1,89 (0,28-8,28)	2,96 ± 1,51 (0,67-6,05)	17	3	22	0	<0,0001	<0,0001
Never in mitosis (NIMA) gene related kinase 2 (NEK2)	2,47 ± 1,48 (0,27-6,69)	2,30 ± 1,18 (0,39-5,18)	13	2	17	1	<0,0001	<0,0001
Non-metastatic cells 1, protein (NM23A)	3,53 ± 2,53 (0,21-9,28)	2,55 ± 2,73 (0,95-10,91)	17	2	21	0	<0,0001	<0,0001

Name des Gens / Probensatznummer des ESTs	Median ± Standardabweichung (Min- Max)		T / E – Quotient				Wilcoxonstest	
	IT	RT	IT		RT		IT	RT
			≥ 2	≤ 0,5	≥ 2	≤ 0,5		
Nuclear cap binding protein, subunit 2 (NCBP2)	2,42 ± 0,81 (0,79-4,33)	2,18 ± 0,86 (1,13-5,37)	14	0	18	0	<0,0001	<0,0001
Nuclear factor, Erythroid-derived 2, like 3 (NFE2L3)	1,90 ± 1,32 (0,53-5,78)	1,88 ± 1,19 (0,62-6,01)	11	0	14	0	<0,0001	<0,0001
Phosphoserine aminotransferase (PSA)	5,20 ± 5,33 (0,11-24,19)	5,73 ± 4,64 (0,72-14,66)	18	2	26	0	<0,0001	<0,0001
Pituitary tumor-transforming 1 (PTTG1)	2,38 ± 1,63 (0,48-7,21)	2,61 ± 1,51 (0,72-7,10)	15	1	21	0	<0,0001	<0,0001
Pleckstrin homology-like domain family A member 1 (PHLDA1) Probensatznummer: 217997_at	3,98 ± 4,96 (0,12-16,57)	3,24 ± 4,87 (0,55-20,78)	18	2	24	0	<0,0001	<0,0001
Prefoldin 4 (PFDN4) Probensatznummer: 205361_s_at	3,08 ± 1,95 (0,33-7,55)	2,72 ± 2,46 (0,36-11,4)	16	1	21	1	<0,0001	<0,0001
Protein C receptor (EPCR, PROCR)	3,19 ± 3,60 (0,25-16,24)	3,00 ± 2,99 (0,78-14,12)	14	2	16	0	<0,0001	<0,0001
Ran GTP binding protein 5 (RanBP5, Importin5)	2,26 ± 1,07 (0,57-4,99)	2,39 ± 1,15 (0,85-5,42)	16	0	20	0	<0,0001	<0,0001
RA-regulated nuclear matrix-associated protein (RAMP)	2,50 ± 2,68 (0,29-10,98)	2,26 ± 3,14 (0,66-12,46)	15	2	17	0	<0,0001	<0,0001
S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY)	2,34 ± 1,73 (0,26-6,51)	2,39 ± 1,98 (0,62-7,76)	16	2	21	0	<0,0001	<0,0001
Serine-threonine kinase 6 (STK6)	2,20 ± 2,67 (0,29-14,46)	2,35 ± 5,64 (0,56-30,77)	17	1	24	0	<0,0001	<0,0001
Stearyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase, SCD) , Probensatznummer: 200832_s_at	3,68 ± 6,90 (0,13-24,30)	3,73 ± 6,37 (0,88-23,88)	20	2	23	0	<0,0001	<0,0001
Suppressor of G2 allele of SKP1 (SGT1)	2,29 ± 1,43 (0,56-5,68)	2,13 ± 1,43 (0,87-7,29)	16	0	17	0	<0,0001	<0,0001
Teratocarcinoma-derived growth factor 1 (TDGF1)	3,84 ± 3,12 (0,57-14,11)	2,93 ± 4,90 (0,45-19,67)	18	0	22	1	<0,0001	<0,0001
Thyroid hormone receptor interactor 13 (TRIP13)	2,83 ± 1,60 (0,24-6,81)	2,82 ± 1,40 (0,65-6,40)	17	2	22	0	<0,0001	<0,0001
Transforming growth factor, beta-induced (TGFB1)	8,35 ± 8,17 (0,06-36,99)	8,00 ± 5,93 (1,02-22,25)	20	3	26	0	<0,0001	<0,0001
Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase, UCHL3)	2,15 ± 1,49 (0,72-6,35)	2,46 ± 1,28 (0,75-5,14)	16	0	18	0	<0,0001	<0,0001
Ubiquitin-conjugating enzyme E2, variant 1 (UBE2V1)	3,31 ± 1,82 (0,27-6,99)	2,86 ± 1,44 (0,73-6,77)	16	2	19	0	<0,0001	<0,0001
212190_at	5,27 ± 3,78 (0,32-12,37)	4,79 ± 3,28 (0,50-11,13)	18	2	19	1	<0,0001	<0,0001
212295_s_at	2,25 ± 0,92 (0,39-3,74)	2,22 ± 0,95 (0,98-5,17)	17	1	22	0	<0,0001	<0,0001
213880_at	5,45 ± 5,31 (0,07-19,66)	4,73 ± 5,70 (0,52-19,49)	18	2	23	0	<0,0001	<0,0001
217774_s_at	3,21 ± 1,73 (0,31-7,75)	3,17 ± 1,69 (0,62-7,58)	18	2	23	0	<0,0001	<0,0001
218145_at	3,47 ± 3,07 (0,19-15,58)	3,47 ± 2,88 (0,78-11,19)	20	1	23	0	<0,0001	<0,0001
218704_at	2,46 ± 1,11 (0,59-4,37)	2,37 ± 1,31 (0,68-6,42)	18	0	22	0	<0,0001	<0,0001
219293_s_at	1,98 ± 0,83 (0,56-4,35)	1,95 ± 0,85 (0,89-3,87)	15	0	20	0	<0,0001	<0,0001
221521_s_at	2,05 ± 1,42 (0,38-7,36)	1,75 ± 2,55 (0,89-13,78)	14	1	15	0	<0,0001	<0,0001
221923_s_at	2,07 ± 0,56 (0,89-3,59)	1,80 ± 0,72 (1,14-3,81)	18	0	22	0	<0,0001	<0,0001
222402_at	2,48 ± 1,81 (0,22-9,76)	2,25 ± 0,99 (0,97-5,39)	18	3	21	0	<0,0001	<0,0001
224523_s_at	3,22 ± 1,75 (0,20-6,60)	2,93 ± 2,14 (0,91-7,84)	18	2	22	0	<0,0001	<0,0001
225520_at	3,64 ± 1,57 (0,16-5,91)	3,59 ± 1,47 (0,99-5,32)	20	2	26	0	<0,0001	<0,0001
225665_at	4,52 ± 3,65 (0,21-16,21)	3,38 ± 3,71 (1,02-16,39)	19	3	24	0	<0,0001	<0,0001
225806_at	2,48 ± 1,91 (0,28-8,09)	2,37 ± 1,41 (0,83-6,52)	18	3	22	0	<0,0001	<0,0001
226448_at	1,92 ± 0,92 (0,63-4,55)	1,90 ± 0,79 (0,83-3,78)	11	1	17	0	<0,0001	<0,0001
226835_s_at	2,33 ± 1,84 (0,45-7,76)	2,67 ± 1,88 (0,75-7,91)	18	1	21	0	<0,0001	<0,0001
227117_at	2,44 ± 0,91 (0,28-4,18)	2,62 ± 1,15 (0,55-4,66)	21	2	21	0	<0,0001	<0,0001
227165_at	2,67 ± 1,18 (0,42-5,00)	2,44 ± 1,93 (0,64-9,29)	16	2	19	0	<0,0001	<0,0001
228273_at	2,25 ± 0,99 (0,78-4,60)	2,15 ± 1,97 (0,51-9,82)	15	0	20	0	<0,0001	<0,0001
230875_s_at	4,41 ± 2,83 (0,04-13,43)	3,50 ± 2,07 (1,03-8,35)	19	3	23	0	<0,0001	<0,0001
236471_at	2,70 ± 2,12 (0,47-8,17)	2,66 ± 1,74 (1,01-6,80)	14	2	18	0	<0,0001	<0,0001

Tabelle 13 Tabellarische Übersicht über die Gene und ESTs, die sowohl in der Tumordinvasionsfront (IT) als auch in der zentralen Tumorregionen (RT) als differenziell überexprimiert identifiziert wurden. Der T/E-Quotient beschreibt den Quotient der Expressionswerte von einem Gen oder EST im Tumorgewebe (T) und im Normalgewebe (E) des gleichen Patienten.

Von den im kolorektalen Karzinomgewebe identifizierten differenziell unterexprimierten Sequenzen waren 61 Sequenzen, darunter 35 Gene und 26 ESTs, sowohl in der Tumordinvasionsfront als auch in den zentralen Tumorregionen differenziell unterexprimiert. Tabelle 14 liefert eine Übersicht über jene Sequenzen.

Name des Gens / Probensatznummer des ESTs	Median \pm Standardabweichung (Min- Max)		T / E – Quotient				Wilcoxonstest	
	IT	RT	IT		RT		IT	RT
			≥ 2	$\leq 0,5$	≥ 2	$\leq 0,5$		
ADAM-like, decysin 1 (ADAMDEC1)	0,23 \pm 4,74 (0,04-24,05)	0,24 \pm 0,29 (0,05-1,11)	3	18	0	24	<0,0001	<0,0001
Calpain 9 (CAPN9)	0,30 \pm 1,10 (0,11-4,31)	0,37 \pm 0,34 (0,14-1,39)	3	19	0	23	<0,0001	<0,0001
Carbonic anhydrase IV (CA4)	0,07 \pm 4,04 (0,02-16,36)	0,07 \pm 0,45 (0,01-1,76)	3	21	0	26	<0,0001	<0,0001
Carbonic anhydrase XII (CA12)	0,31 \pm 1,74 (0,09-6,25)	0,31 \pm 0,37 (0,09-1,46)	3	18	0	23	<0,0001	<0,0001
Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD)	0,41 \pm 0,53 (0,13-2,54)	0,30 \pm 0,30 (0,14-1,44)	1	21	0	27	<0,0001	<0,0001
Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFDH)	0,49 \pm 0,51 (0,25-2,39)	0,48 \pm 0,33 (0,18-1,47)	1	18	0	22	<0,0001	<0,0001
Endothelial differentiation G-protein-coupled receptor 2 (EDG2)	0,39 \pm 0,61 (0,17-2,58)	0,44 \pm 0,30 (0,14-1,23)	1	17	0	24	<0,0001	<0,0001
Endothelin 3 (EDN3)	0,32 \pm 2,33 (0,08-9,52)	0,32 \pm 1,11 (0,07-5,31)	3	20	2	23	<0,0001	<0,0001
Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)	0,40 \pm 1,77 (0,06-8,30)	0,36 \pm 0,40 (0,06-1,37)	4	17	0	22	<0,0001	<0,0001
Four and a half LIM domains 1 (FHL1)	0,30 \pm 1,16 (0,06-5,72)	0,25 \pm 0,20 (0,08-0,88)	2	20	0	27	<0,0001	<0,0001
Integral membrane protein 2A (ITM2A)	0,29 \pm 1,48 (0,08-6,27)	0,30 \pm 0,31 (0,07-1,26)	2	20	0	25	<0,0001	<0,0001
Integral membrane protein 3 (ITM3)	0,28 \pm 1,99 (0,13-8,24)	0,29 \pm 0,36 (0,08-1,45)	4	20	0	24	<0,0001	<0,0001
Interleukin 1 receptor, type II (IL1R2)	0,17 \pm 7,69 (0,05-38,18)	0,22 \pm 0,69 (0,05-3,06)	3	17	2	22	0,0003	<0,0001
Melanophilin (MLPH)	0,40 \pm 0,91 (0,10-4,52)	0,34 \pm 0,39 (0,06-1,76)	1	16	0	22	<0,0001	<0,0001
Metallothionein 1G (MT1G)	0,22 \pm 1,87 (0,06-6,62)	0,30 \pm 0,34 (0,05-1,48)	3	19	0	22	<0,0001	<0,0001
Metallothionein 1L (MT1L)	0,27 \pm 1,66 (0,06-5,89)	0,28 \pm 0,35 (0,06-1,44)	3	18	0	23	<0,0001	<0,0001
Metallothionein 1X (MT1X)	0,18 \pm 2,25 (0,05-8,32)	0,21 \pm 0,40 (0,04-1,89)	3	18	0	25	<0,0001	<0,0001
Mucin 4 (MUC4)	0,09 \pm 22,64(0,02-112,4)	0,10 \pm 1,33 (0,01-6,51)	3	18	2	23	<0,0001	<0,0001
Myeloid ecotropic viral integration site 1 (MEIS1)	0,42 \pm 0,45 (0,16-1,91)	0,37 \pm 0,29 (0,13-1,61)	0	18	0	22	<0,0001	<0,0001
Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2 (NR3C2)	0,27 \pm 1,77 (0,13-8,97)	0,27 \pm 0,31 (0,11-1,53)	3	19	0	24	<0,0001	<0,0001
p300/CBP-associated factor (PCAF)	0,42 \pm 1,01 (0,14-5,25)	0,39 \pm 0,27 (0,12-1,35)	1	19	0	22	<0,0001	<0,0001
Peptidylprolyl isomerase D (cyclophilin D, PPIID)	0,33 \pm 1,08 (0,14-4,99)	0,30 \pm 0,36 (0,13-1,29)	3	18	0	25	<0,0001	<0,0001
Phospholipase A2, group X (PLA2G10)	0,31 \pm 0,91 (0,10-3,66)	0,33 \pm 0,30 (0,09-1,27)	3	17	0	23	<0,0001	<0,0001
Phospholipase C epsilon 1 (PLCE1)	0,28 \pm 2,38 (0,09-10,08)	0,30 \pm 0,66 (0,10-2,83)	3	18	1	24	<0,0001	<0,0001
Programmed cell death 4	0,36 \pm 2,12 (0,11-9,45)	0,29 \pm 0,43 (0,08-1,93)	3	17	0	25	0,0001	<0,0001
Protein kinase inhibitor beta (PKIB)	0,12 \pm 1,89 (0,03-8,94)	0,09 \pm 0,57 (0,03-2,35)	3	20	1	24	<0,0001	<0,0001
Protein tyrosine phosphatase, receptor type H (PTPRH)	0,32 \pm 1,61 (0,17-7,83)	0,31 \pm 1,30 (0,11-6,73)	2	19	1	23	<0,0001	<0,0001
Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4)	0,42 \pm 0,83 (0,06-3,48)	0,36 \pm 0,40 (0,06-2,09)	2	16	1	21	<0,0001	<0,0001
Quinone oxidoreductase homolog (PIG3)	0,36 \pm 1,49 (0,14-7,79)	0,34 \pm 0,69 (0,10-3,56)	3	17	1	21	<0,0001	<0,0001
RNA binding motif protein 8B (RBM8B)	0,15 \pm 2,05 (0,05-10,23)	0,15 \pm 0,18 (0,05-0,74)	2	20	0	27	<0,0001	<0,0001
RNA helicase-related protein (RNAHP)	0,20 \pm 3,13 (0,08-10,83)	0,19 \pm 0,37 (0,05-1,44)	3	20	0	25	0,0001	<0,0001
Serum-glucocorticoid regulated kinase (SGK)	0,24 \pm 0,81 (0,04-4,01)	0,21 \pm 0,28 (0,03-1,19)	1	20	0	24	<0,0001	<0,0001
Solute carrier family 26 sulfate transporter, member 2 (SLC26A2)	0,25 \pm 2,62 (0,02-12,37)	0,23 \pm 0,52 (0,02-1,87)	3	19	0	21	<0,0001	<0,0001
Solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4 (SLC4A4)	0,06 \pm 6,10 (0,03-27,96)	0,05 \pm 0,42 (0,02-1,84)	2	22	0	28	<0,0001	<0,0001
Thymus high mobility group box protein (TOX)	0,33 \pm 0,75 (0,17-2,85)	0,44 \pm 0,64 (0,15-2,26)	1	17	2	21	<0,0001	<0,0001
207761_s_at	0,28 \pm 1,17 (0,06-5,07)	0,24 \pm 0,29 (0,06-1,42)	4	17	0	23	<0,0001	<0,0001
212959_s_at	0,47 \pm 0,55 (0,15-2,34)	0,37 \pm 0,26 (0,12-1,29)	2	17	0	23	<0,0001	<0,0001
213056_at	0,40 \pm 0,46 (0,11-2,50)	0,41 \pm 0,23 (0,12-0,93)	1	17	0	21	<0,0001	<0,0001
213624_at	0,29 \pm 1,75 (0,09-6,99)	0,29 \pm 0,41 (0,08-1,46)	2	18	0	21	<0,0001	<0,0001
213629_x_at	0,21 \pm 3,49 (0,07-14,73)	0,23 \pm 0,44 (0,06-2,05)	3	20	1	26	<0,0001	<0,0001

Name des Gens / Probensatznummer des ESTs	Median ± Standardabweichung (Min- Max)		T / E – Quotient				Wilcoxonstest	
	IT	RT	IT		RT		IT	RT
			≥ 2	≤ 0,5	≥ 2	≤ 0,5		
214164_x_at	0,31 ± 2,41 (0,09-11,41)	0,24 ± 0,37 (0,09-1,57)	3	17	0	25	<0,0001	<0,0001
216336_x_at	0,20 ± 2,77 (0,04-12,36)	0,22 ± 0,34 (0,04-1,31)	3	19	0	23	<0,0001	<0,0001
219014_at	0,27 ± 1,80 (0,05-8,77)	0,20 ± 0,86 (0,04-3,21)	4	18	3	22	<0,0001	<0,0001
219722_s_at	0,30 ± 1,20 (0,13-5,21)	0,32 ± 0,57 (0,13-1,90)	4	17	0	22	0,0001	<0,0001
220030_at	0,32 ± 1,18 (0,06-5,56)	0,25 ± 0,30 (0,05-1,26)	2	18	0	23	<0,0001	<0,0001
220376_at	0,31 ± 2,43 (0,10-12,40)	0,29 ± 1,36 (0,09-7,18)	3	19	1	21	<0,0001	<0,0001
222294_s_at	0,28 ± 1,83 (0,07-8,84)	0,26 ± 0,60 (0,05-2,86)	3	19	1	22	0,0001	<0,0001
224480_s_at	0,24 ± 0,60 (0,04-2,71)	0,19 ± 0,77 (0,05-4,00)	1	19	1	25	<0,0001	<0,0001
225602_at	0,32 ± 0,95 (0,16-3,75)	0,31 ± 0,31 (0,11-1,26)	3	19	0	24	<0,0001	<0,0001
226492_at	0,20 ± 2,76 (0,03-12,74)	0,25 ± 1,69 (0,02-8,57)	1	18	2	23	<0,0001	<0,0001
226594_at	0,30 ± 1,23 (0,09-6,18)	0,25 ± 0,35 (0,10-1,78)	2	18	0	27	<0,0001	<0,0001
228195_at	0,32 ± 0,72 (0,18-3,01)	0,26 ± 0,36 (0,16-1,45)	1	18	0	22	<0,0001	<0,0001
228507_at	0,27 ± 1,21 (0,07-5,74)	0,25 ± 0,35 (0,05-1,16)	3	17	0	23	<0,0001	<0,0001
228528_at	0,43 ± 0,71 (0,08-2,53)	0,30 ± 0,34 (0,07-1,57)	2	16	0	23	<0,0001	<0,0001
235766_x_at	0,31 ± 1,27 (0,10-5,31)	0,29 ± 0,58 (0,10-2,67)	2	18	1	25	<0,0001	<0,0001
237400_at	0,28 ± 0,54 (0,12-2,22)	0,28 ± 0,44 (0,11-2,30)	1	19	1	24	<0,0001	<0,0001
241994_at	0,30 ± 0,85 (0,05-3,21)	0,29 ± 0,84 (0,05-3,19)	3	19	3	21	<0,0001	<0,0001
243582_at	0,31 ± 2,61 (0,08-12,89)	0,23 ± 1,41 (0,09-7,15)	4	18	2	22	<0,0001	<0,0001
43427_at	0,22 ± 1,47 (0,06-6,96)	0,21 ± 0,40 (0,06-1,88)	2	19	0	24	<0,0001	<0,0001
49452_at	0,27 ± 1,80 (0,07-8,25)	0,20 ± 0,52 (0,07-2,49)	2	20	1	24	<0,0001	<0,0001
50965_at	0,33 ± 1,69 (0,12-8,56)	0,37 ± 0,51 (0,15-2,26)	3	18	1	21	<0,0001	<0,0001

Tabelle 14 Tabellarische Übersicht über die Gene und ESTs, die sowohl in der Tumorinvasionsfront als auch in der zentralen Tumorregionen als differenziell unterexprimiert identifiziert wurden. Der T/E-Quotient beschreibt den Quotient der Expressionswerte von einem Gen oder EST im Tumorgewebe (T) und im Normalgewebe (E) des gleichen Patienten.

4.11 Chiparray basierte Identifikation von Gewebe spezifischen Expressionsprofilen

Mit Hilfe der Clusteranalyse, war es möglich, die Proben der 25 Patienten entsprechend ihrer Genexpressionsähnlichkeiten in Gewebe spezifische Gruppen einzuteilen. Vor der Clusteranalyse wurden die korrigierten und normalisierten Daten der ausgewählten Probensätze auf das arithmetische Mittel der Proben und Probensätze standardisiert. Die Clusteranalyse erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, unter Anwendung des Pearson Korrelationseffizienten sowie der Complete Link Methode. Von einem Gewebe spezifischen Cluster (z.B. Tumorgewebecluster bzw. Normalgewebecluster) wird gesprochen, wenn in einer durch das Dendrogramm separierten Gruppe von Patientenproben ein Gewebetyp deutlich überwiegt, der dann die Gesamtgruppe repräsentiert und nach dem das Cluster folglich benannt wird.

4.11.1 Clusteranalyse der detektierten Sequenzen

Nach der in Abschnitt 3.10 beschriebenen Datennormalisierung der 44.928 gemessenen Probensätze resultierten 11.903 Probensätze, die in mindestens 80 %, also bei mindestens 60 der 75 Proben, detektiert waren, das heißt, deren Hybridisierung, welche mittels des Wilcoxontests beurteilt wurde, sich als spezifisch erwies (siehe Abschnitt 3.10.3). Darunter befanden sich 7.715 Gen spezifische Probensätze, wohingegen die restlichen 4.188 Probensätze ESTs repräsentierten. Die Clusteranalyse dieser detektierten 11.903 Sequenzen unter Einbeziehung sämtlicher untersuchter 75 Gewebeproben, darunter 25 Normal- und 50 Tumorgewebeproben, ergab das in Abbildung 14 a bis c zu sehende Resultat. Um den Unterschied hervorzuheben, wird bei den Clusteranalysen sämtlicher detektierter Sequenzen von gesamten Expressionsprofilen gesprochen, bei den Clusteranalysen der identifizierten DES hingegen von differenziellen Expressionsprofilen.

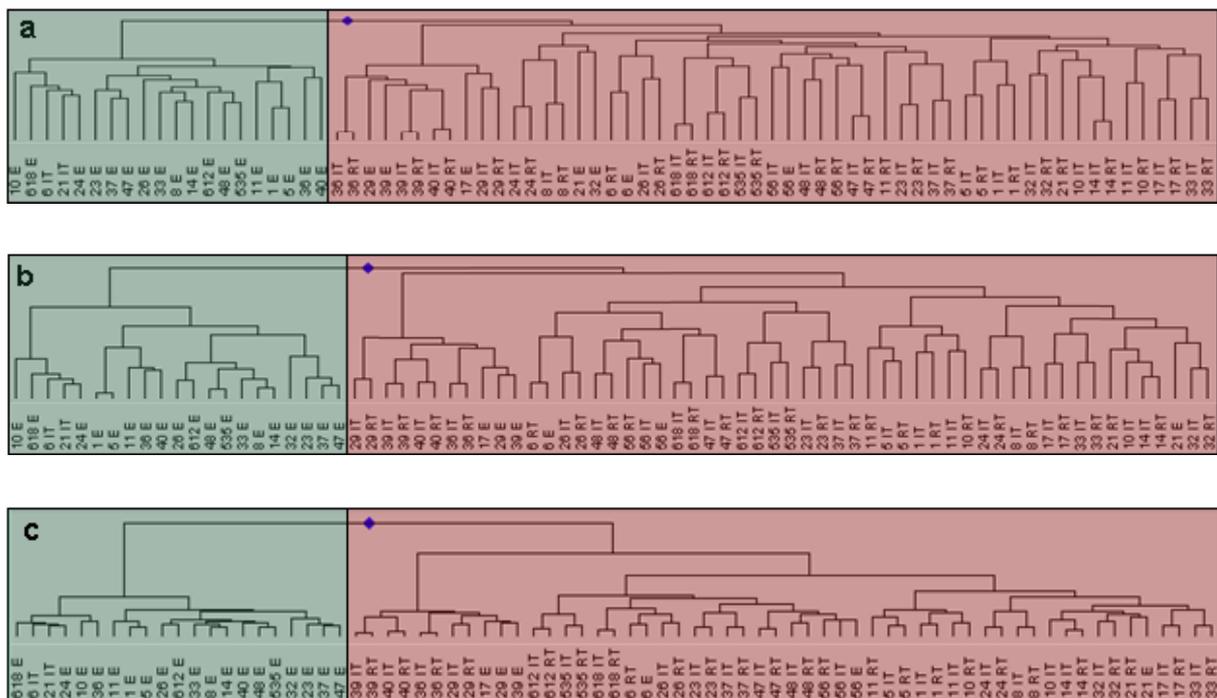


Abbildung 14 Dendrogramme der gesamten Expressionsprofile der Normal- (E) und der Tumorgewebeproben (IT und RT) erstellt durch die Clusteranalyse mit den 11.903 Sequenzen, die in mindestens 80% der untersuchten 25 Proben detektiert waren. Die Normalgewebecluster sind grün, die Tumorgewebecluster rot hinterlegt. Die Clusteranalyseergebnisse unterscheiden sich lediglich durch die Anwendung unterschiedlicher Cluster-Algorithmen: Pearson Korrelationseffizienten und Complete Link Methode (a), Pearson Korrelationseffizienten und Wards Methode (b), Euklidische Distanz und Wards Methode (c).

Die Abbildungen 14 a bis c veranschaulichen, dass die Clusteranalyse die untersuchten Proben anhand ihres gesamten Expressionsprofils in zwei separate Gruppen teilte, von denen die grün hinterlegte vorwiegend Normalgewebeproben (E), die rot hinterlegte hingegen vor allem Tumorgewebeproben (RT, IT) enthielt. Im folgenden wird dementsprechend von Tumorgewebecluster bzw. Normalgewebecluster gesprochen. Des Weiteren zeigt Abbildung 14 a bis 14 c, dass diese auf den Expressionseigenschaften basierende Einteilung nach der Dignität der Gewebe weitestgehend unabhängig von dem für die Clusteranalyse verwendeten Algorithmus war. So gruppierten sich in allen drei grün hinterlegten Normalgewebeclustern zusätzlich zwei der insgesamt 50 Tumorgewebeproben (6 IT und 21 IT). Betrachtet man nun die drei rot hinterlegten Tumorgewebecluster, so stellt man auch hier fest, dass die Trennschärfe unter Anwendung unterschiedlicher Algorithmen nur unwesentlich variiert. Unter Verwendung des Pearson Korrelationskoeffizienten und der Complete Link Methode ordneten sich in das Tumorgewebecluster sieben der insgesamt 25 Normalgewebeproben (siehe Abbildung 14 a), während unter Verwendung des Pearson Korrelationskoeffizienten und Wards Methode bzw. bei der Euklidischen Distanz und der Wards Methode (siehe Abbildung 14 b und c) sechs Normalgewebeproben im Tumorgewebecluster wiederzufinden waren.

4.11.2 Clusteranalyse der DES aus der Tumorinvasionsfront

Unter Verwendung der 200 identifizierten differenziell über- und unterexprimierten Sequenzen aus der Tumorinvasionsfront wurde eine Clusteranalyse mit den korrespondierenden Tumor- und Normalgewebeproben der 25 untersuchten Patienten durchgeführt, die zu dem in Abbildung 15 aufgeführten Ergebnis führte. Um den Unterschied hervorzuheben, wird bei den Clusteranalysen der identifizierten DES von differenziellen Expressionsprofilen gesprochen, bei den Clusteranalysen sämtlicher detektierter Sequenzen hingegen von gesamten Expressionsprofilen. In Abbildung 15 wurden die analysierten Proben durch das Dendrogramm deutlich in zwei separate Gruppen geteilt, wobei die eine Gruppe, die grün hinterlegt ist, vornehmlich Proben des Normalgewebes (E), die andere rot hinterlegte Gruppe hingegen vor allem Proben der Tumorinvasionsfront (IT) enthält. In das Normalgewebecluster gruppierten sich zusätzlich zu den 21 Normalgewebeproben drei Tumorgewebeproben, wohingegen sich in das Tumorgewebecluster (rot hinterlegt) 22 Tumorproben und vier Normalgewebeproben einordneten. Daraus ergaben sich eine

Spezifität von 84 %, eine Sensitivität von 88 %, ein positiver Vorhersagewert von 84 % und ein negativer Vorhersagewert von 87 %.

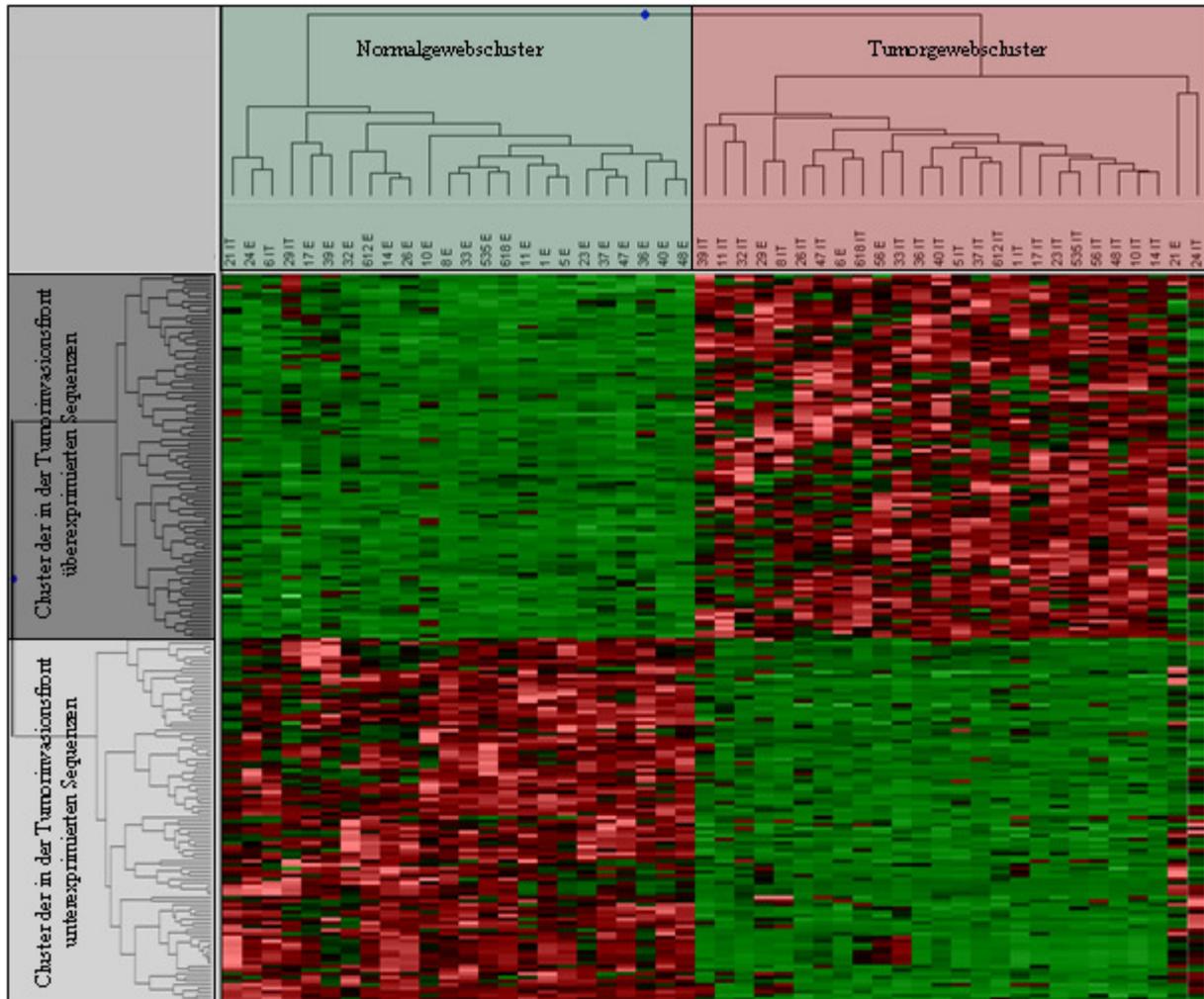


Abbildung 15 Differenzielles Expressionsprofil der Normal- (E) und der Tumorgewebebeobachten aus der Tumordinvasionsfront (IT) erstellt durch die Clusteranalyse mit den 200 in der Tumordinvasionsfront identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen. Das Normalgewebecluster des Dendrogramms ist grün, das Tumorgewebecluster rot hinterlegt. Die Expressionshöhe der Gene bzw. ESTs ist farbkodiert: rote Datenpunkte stehen für ein hohes Expressionsniveau, grüne Datenpunkte für ein niedriges Expressionsniveau im Tumorgewebe relativ zum Normalgewebe. Das weiß hinterlegte Cluster des Dendrogramms umfasst die 100 differenziell exprimierten Sequenzen, die in der Tumordinvasionsfront überexprimiert sind und in Tabellen 9 und 13 aufgeführt sind. Das Cluster der 100 in der Tumordinvasionsfront (IT) unterexprimierten Sequenzen, die im Einzelnen Tabellen 10 und 14 zu entnehmen sind, ist im Dendrogramm schwarz hinterlegt.

Betrachtet man nun innerhalb des rot hinterlegten Tumorcluster aus Abbildung 15 die Verteilung der Tumorgewebebeobachten bezüglich des T-Stadiums nach Richtlinien der UICC,

so ergibt sich die in Abbildung 16 ersichtliche Konstellation. In dem Dendrogramm lässt sich keine einheitliche Gruppierung von Tumoren definierter Infiltrationstiefe finden. Die drei Tumorstadien T4 ordneten sich innerhalb des Tumorclusters in völlig unabhängige Subcluster.

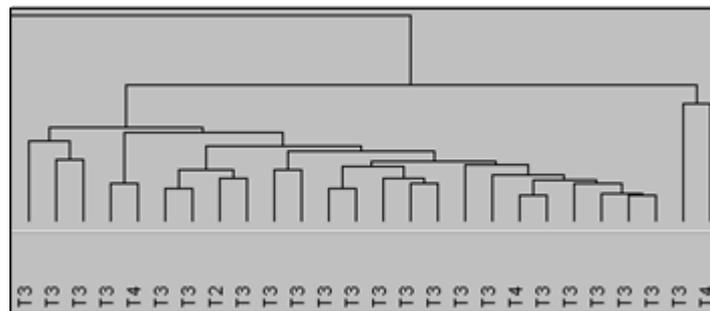


Abbildung 16 Tumorgewebecluster aus der Clusteranalyse der Normal- (E) und Tumorgewebeclustern aus der Tumorinvasionsfront (IT) mit den in der Tumorinvasionsfront identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen (siehe auch Abbildung 15). Anstelle der Tumor- (IT) und Normalgewebebezeichnungen (E) sind der Abbildung die T-Stadien der entsprechenden Gewebeproben nach Richtlinien der UICC zu entnehmen.

Ähnlich verhielt es sich bei der Untersuchung des Tumorgewebeclusters aus Abbildung 15 hinsichtlich des Vorliegens von Lymphknotenmetastasen. Abbildung 17 veranschaulicht, dass sich die Tumorgewebeclustern unabhängig vom Lymphknotenstatus innerhalb des Tumorgewebeclusters verteilen.

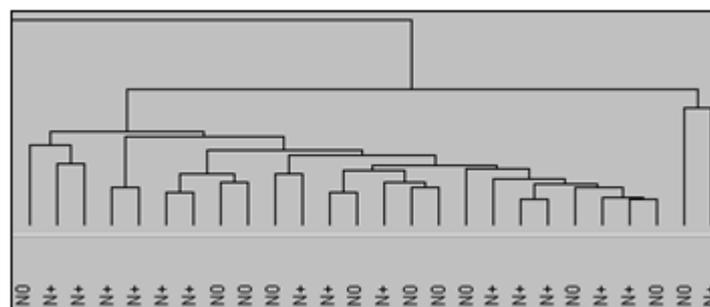


Abbildung 17 Tumorgewebecluster aus der Clusteranalyse der Normal- (E) und Tumorgewebeclustern aus der Tumorinvasionsfront (IT) mit den in der Tumorinvasionsfront identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen (siehe auch Abbildung 15). Anstelle der Tumor- (IT) und Normalgewebebezeichnungen (E) sind der Abbildung die N-Stadien der entsprechenden Gewebeproben zu entnehmen, wobei N0 keine Lymphknotenmetastasierung bedeutet, N+ hingegen für das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen steht.

Innerhalb des Tumorgewebeclusters aus Abbildung 15 liess sich ebenso kein Fernmetastasen spezifisches Subcluster identifizieren. Aus Abbildung 18 geht hervor, dass sich die Tumorproben unabhängig vom Vorliegen von Fernmetastasen im Tumorcluster gruppierten.

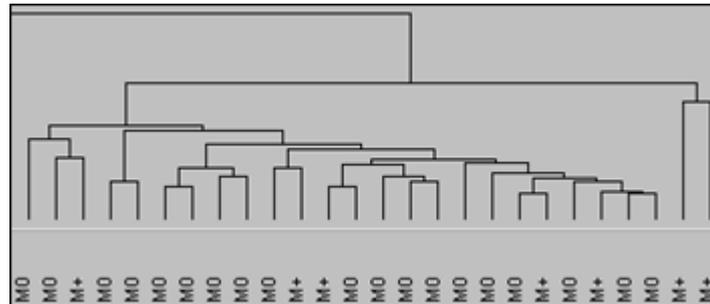


Abbildung 18 Tumorgewebecluster aus der Clusteranalyse der Normal- (E) und Tumorgewebeclustern aus der Tumorinvasionsfront (IT) mit den in der Tumorinvasionsfront identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen (siehe auch Abbildung 15). Anstelle der Tumor- (IT) und Normalgewebebezeichnungen (E) sind der Abbildung die M-Stadien der entsprechenden Gewebeproben zu entnehmen, wobei M0 keine Fernmetastasierung bedeutet, M+ hingegen für das Vorliegen von Fernmetastasen steht.

Darüberhinaus wurde das Tumorgewebecluster aus Abbildung 15 hinsichtlich Subclustern definierter UICC-Stadien untersucht. Die nicht metastasierten UICC-Stadien I und II wurden hierbei der Übersicht halber dem lymphogen metastasierten UICC-Stadium III und dem fernmetastasierten UICC-Stadium IV gegenübergestellt. Die Abbildung 19 zeigt, dass sich die Tumorgewebeclustern unabhängig vom UICC- Stadium über das Tumorcluster verteilen.

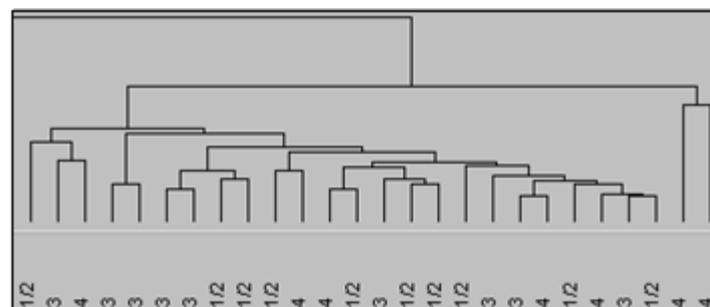


Abbildung 19 Tumorgewebecluster aus der Clusteranalyse der Normal- (E) und Tumorgewebeclustern aus der Tumorinvasionsfront (IT) mit den in der Tumorinvasionsfront identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen (siehe auch Abbildung 15). Anstelle der Tumor- (IT) und Normalgewebebezeichnungen (E) sind der Abbildung die UICC-Stadien der entsprechenden Gewebeproben zu entnehmen, wobei UICC-Stadien 1 und 2 als nicht metastasierte UICC-Stadien zusammengefasst wurden.

(grün hinterlegt) umfasste ausschließlich 22 Normalgewebeproben. Folglich ergab sich eine Spezifität von 88 %, eine Sensitivität von 100 %, ein positiver Vorhersagewert von 89 % und ein negativer Vorhersagewert von 100 %.

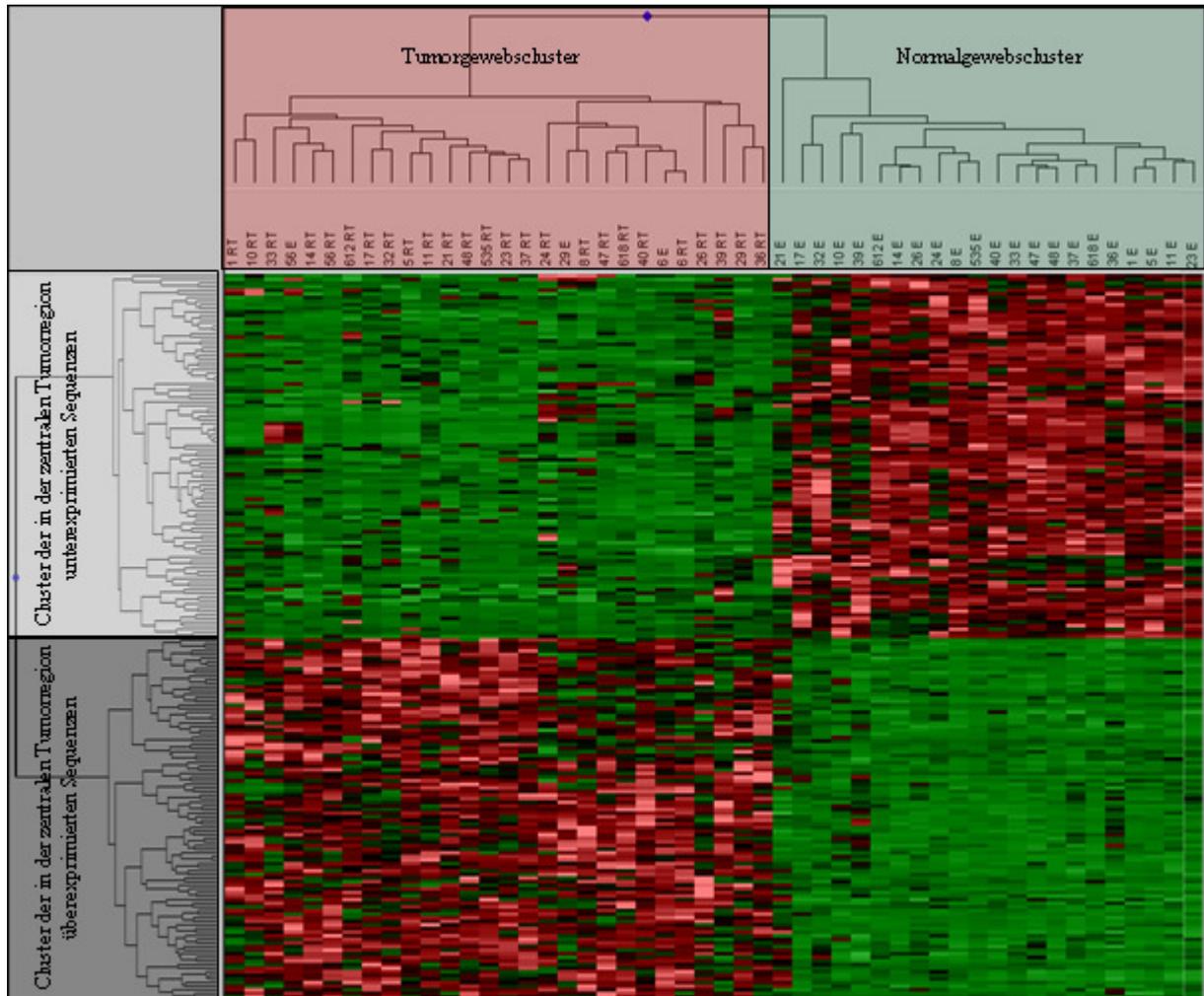


Abbildung 21 Differenzielles Expressionsprofil der Normal- (E) und der Tumorgewebeproben aus der zentralen Tumorregion (RT) erstellt durch die Clusteranalyse mit den 200 in der zentralen Tumorregion identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen. Das Normalgewebecluster des Dendrogramms ist grün, das Tumorgewebecluster rot hinterlegt. Die Expressionshöhe der Gene bzw. ESTs ist farbkodiert: rote Datenpunkte stehen für ein hohes Expressionsniveau, grüne Datenpunkte für ein niedriges Expressionsniveau im Tumorgewebe relativ zum Normalgewebe. Das Cluster der 100 in der zentralen Tumorregion (RT) unterexprimierten Sequenzen, die im Einzelnen Tabellen 12 und 14 zu entnehmen sind, ist im Dendrogramm weiß hinterlegt. Das schwarz hinterlegte Cluster umfasst die 100 differenziell exprimierten Sequenzen, die in der zentralen Tumorregion (RT) überexprimiert sind und in Tabellen 11 und 13 aufgeführt sind.

Die Verteilung der Tumorgewebeprobe bezogen auf das T-Stadiums nach Richtlinien der UICC innerhalb des rot hinterlegten Tumorcluster aus Abbildung 21 ist in Abbildung 22 zu entnehmen. Das Dendrogramm der Abbildung lässt keine einheitliche Gruppe von Tumoren definierter Infiltrationstiefe erkennen. Die drei Tumorgewebeprobe mit dem Tumorstadium T4 ordneten sich innerhalb des Tumorclusters in separate Subgruppen ein.

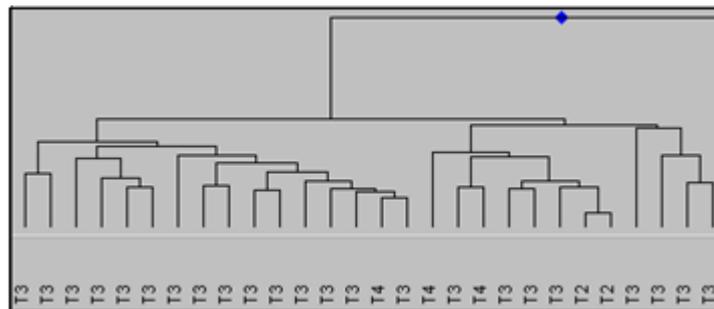


Abbildung 22 Tumorgewebecluster aus der Clusteranalyse der Normal- (E) und Tumorgewebeprobe aus der zentralen Tumorregion (RT) mit den in der zentralen Tumorregion identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen (siehe auch Abbildung 21). Anstelle der Tumor- (RT) und Normalgewebebezeichnungen (E) sind der Abbildung die T-Stadien der entsprechenden Gewebeprobe nach Richtlinien der UICC zu entnehmen.

Die Untersuchung der Tumorgewebeprobe innerhalb des Tumorgewebeclusters aus Abbildung 21 hinsichtlich des Vorliegens von Lymphknotenmetastasen führte zu dem in Abbildung 23 dargestellten Resultat. Abbildung 23 veranschaulicht, dass die Tumorgewebeprobe nicht gemäß ihrem Lymphknotenstatus einheitlichen Gruppen bildeten, sondern sich unabhängig vom Lymphknotenstatus innerhalb des Tumorgewebeclusters verteilten.

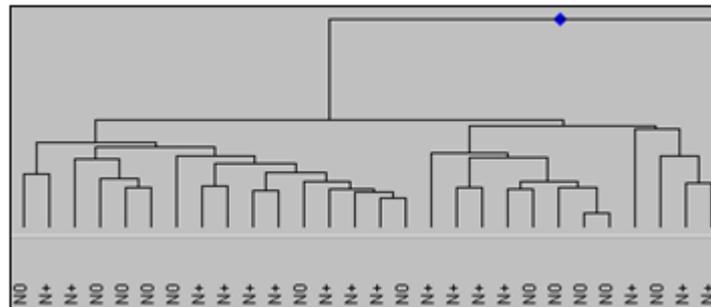


Abbildung 23 Tumorgewebecluster aus der Clusteranalyse der Normal- (E) und Tumorgewebebeurteilungen aus der zentralen Tumorregion (RT) mit den in der zentralen Tumorregion identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen (siehe auch Abbildung 21). Anstelle der Tumor- (RT) und Normalgewebebezeichnungen (E) sind der Abbildung die N-Stadien der entsprechenden Gewebebeurteilungen zu entnehmen, wobei N0 keine Lymphknotenmetastasierung bedeutet, N+ hingegen für das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen steht.

Ebenso ließ sich innerhalb des Tumorgewebeclusters aus Abbildung 21 kein Fernmetastasen spezifisches Subcluster identifizieren. Wie aus Abbildung 24 hervorgeht, gruppierten sich die Tumorproben unabhängig vom Vorliegen von Fernmetastasen innerhalb des Tumorgewebeclusters.

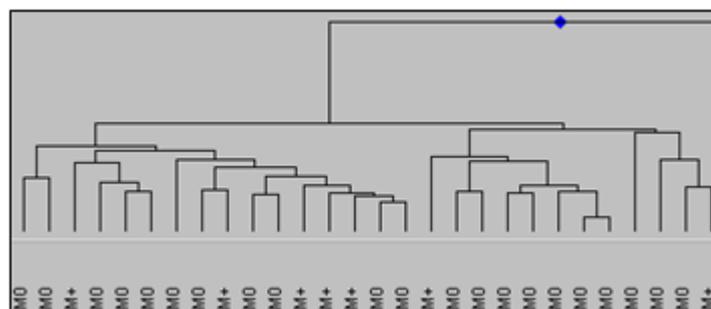


Abbildung 24 Tumorgewebecluster aus der Clusteranalyse der Normal- (E) und Tumorgewebebeurteilungen aus der zentralen Tumorregion (RT) mit den in der zentralen Tumorregion identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen (siehe auch Abbildung 21). Anstelle der Tumor- (RT) und Normalgewebebezeichnungen (E) sind der Abbildung die M-Stadien der entsprechenden Gewebebeurteilungen zu entnehmen, wobei M0 keine Fernmetastasierung bedeutet, M+ hingegen für das Vorliegen von Fernmetastasen steht.

Zudem zeigt die Abbildung 25, dass sich die Tumorgewebebeurteilungen innerhalb des Tumorgewebeclusters aus Abbildung 21 unabhängig vom UICC- Stadium verteilen. Dabei wurden die nicht metastasierten UICC-Stadien I und II der Übersicht halber dem lymphogenen

metastasierten UICC-Stadium III und dem fernmetastasierten UICC-Stadium IV gegenübergestellt.

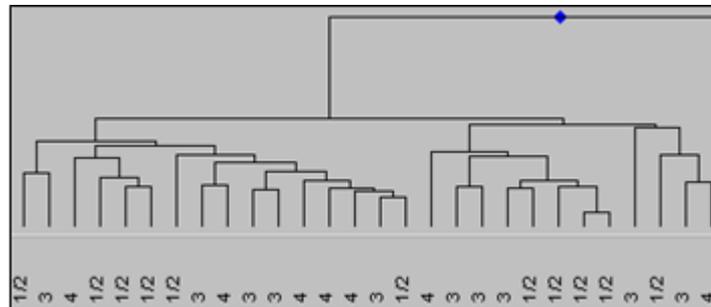


Abbildung 25 Tumorgewebecluster aus der Clusteranalyse der Normal- (E) und Tumorgewebeproben aus der zentralen Tumorregion (RT) mit den in der zentralen Tumorregion identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen (siehe auch Abbildung 21). Anstelle der Tumor- (RT) und Normalgewebebezeichnungen (E) sind der Abbildung die UICC-Stadien der entsprechenden Gewebeproben zu entnehmen, wobei UICC-Stadien 1 und 2 als nicht metastasierte UICC-Stadien zusammengefasst wurden.

Im Gegensatz zu dem in Abbildung 20 identifizierten Gewebeherkunfts spezifischen Subcluster, welches sich aus der Clusteranalyse mit den 200 differenziell exprimierten Sequenzen der Tumordinvasionsfront ergab, zeigt Abbildung 26, dass sich die Normalgewebeproben innerhalb des Normalgewebeclusters aus Abbildung 21 unabhängig von ihrer Herkunft bzw. Lokalisation verteilen.

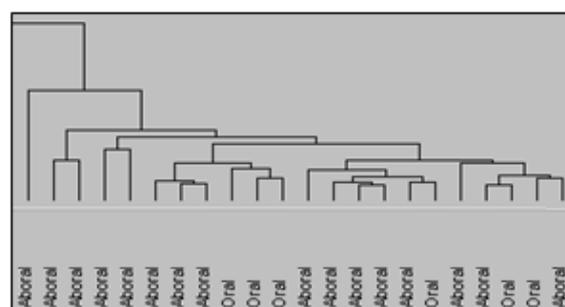


Abbildung 26 Normalgewebecluster aus der Clusteranalyse der Normal- (E) und Tumorgewebeproben aus der zentralen Tumorregion (RT) mit den in der zentralen Tumorregion identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen (siehe auch Abbildung 21). Anstelle der Tumor- und Normalgewebebezeichnungen sind der Abbildung Angaben zur Lokalisation zu entnehmen: Aborale Lage bezeichnet Mukosa, die aus Darmabschnitten distal des Kolon transversum stammt, orale Lage bedeutet, die Mukosa stammt aus Darmabschnitten, die proximal des Kolon descendens gelegen sind.

4.11.4 Clusteranalyse der DES aus der Tumorinvasionsfront und der zentralen Tumorregion

Zudem wurde eine Clusteranalyse durchgeführt mit allen 267 Sequenzen, die in der Tumorinvasionsfront und zentralen Tumorregionen als differenziell exprimiert identifiziert wurden. Die 267 differenziell exprimierten Sequenzen (DES) ergaben sich durch Subtraktion der gemeinsamen Schnittmenge von 133 Sequenzen von den insgesamt 400 identifizierten DES aus den beiden unterschiedlichen Tumorregionen. In diese Clusteranalyse wurden sämtliche Normal- und Tumorgewebeproben (Invasionsfront, zentrale Tumorregion) der 25 Patienten einbezogen, so dass sich eine Gesamtanzahl von 75 Gewebeproben ergab. Das Ergebnis der Clusteranalyse mit dem entsprechenden Dendrogramm ist in Abbildung 27 dargestellt.

Die Gewebeproben wurden auch hier durch die Bildung von zwei Hauptgruppen innerhalb des Dendrogramms gegeneinander abgegrenzt, wobei, ähnlich den zuvor vorgestellten Clusteranalyseergebnissen, die eine Gruppe vornehmlich Normalgewebeproben enthielt, die andere hingegen insbesondere Tumorgewebeproben. Das Normalgewebecluster (grün hinterlegt) umfasste neben 22 Normalgewebeproben fünf Tumorgewebeproben, während das Tumorgewebecluster (rot hinterlegt) neben 45 Tumorgewebeproben drei Normalgewebeproben enthielt. Hierdurch ergab sich eine Spezifität von 88%, eine Sensitivität von 90%, ein positiver Vorhersagewert von 94% sowie ein negativer Vorhersagewert von 81%.

Die Clusteranalyse veranschaulichte, dass sich die Normalgewebe von den Tumorgeweben deutlich unterscheiden bezüglich der Expression der für die Clusteranalyse verwendeten Sequenzen. So ordneten sich die Normalgewebeproben der Patienten in allen durchgeführten Clusteranalysen in ein gemeinsames von den Tumorgewebeproben abzugrenzendes Normalgewebecluster ein. Die Gewebeproben unterschiedlicher Tumorregionen innerhalb des gleichen Tumors, also der Tumorinvasionsfront und der zentralen Tumorregion, ähnelten sich jedoch in ihren Expressionseigenschaften stärker als die entsprechenden Tumorregionen im interindividuellen Vergleich. Dementsprechend bildeten die unterschiedlichen Tumorregionen, nämlich die Tumorinvasionsfront und die zentralen Tumoranteile, kein separates Subcluster, sondern ordneten sich bei 20 der 25 Patienten direkt nebeneinander in das Tumorgewebecluster ein (siehe Abbildung 27). Wie es beispielsweise in Abbildung 27 zu sehen ist, gruppierten sich von dem Patienten 23 die Tumorgewebeprobe der

Tumorinvasionsfront (23 IT) direkt neben die der zentralen Tumorregion (23 RT) innerhalb des rot hinterlegten Tumorgewebecluster. Die korrespondierende Normalgewebeprobe des Patienten 23 (23 E) gruppierte sich jedoch gemeinsam mit den Normalgeweben der anderen Patienten in das deutlich separierte grün hinterlegte Normalgewebecluster. Ähnlich verhielt es sich mit den Gewebeproben der Patienten 1, 8, 14, 17, 33, 40 und so weiter.

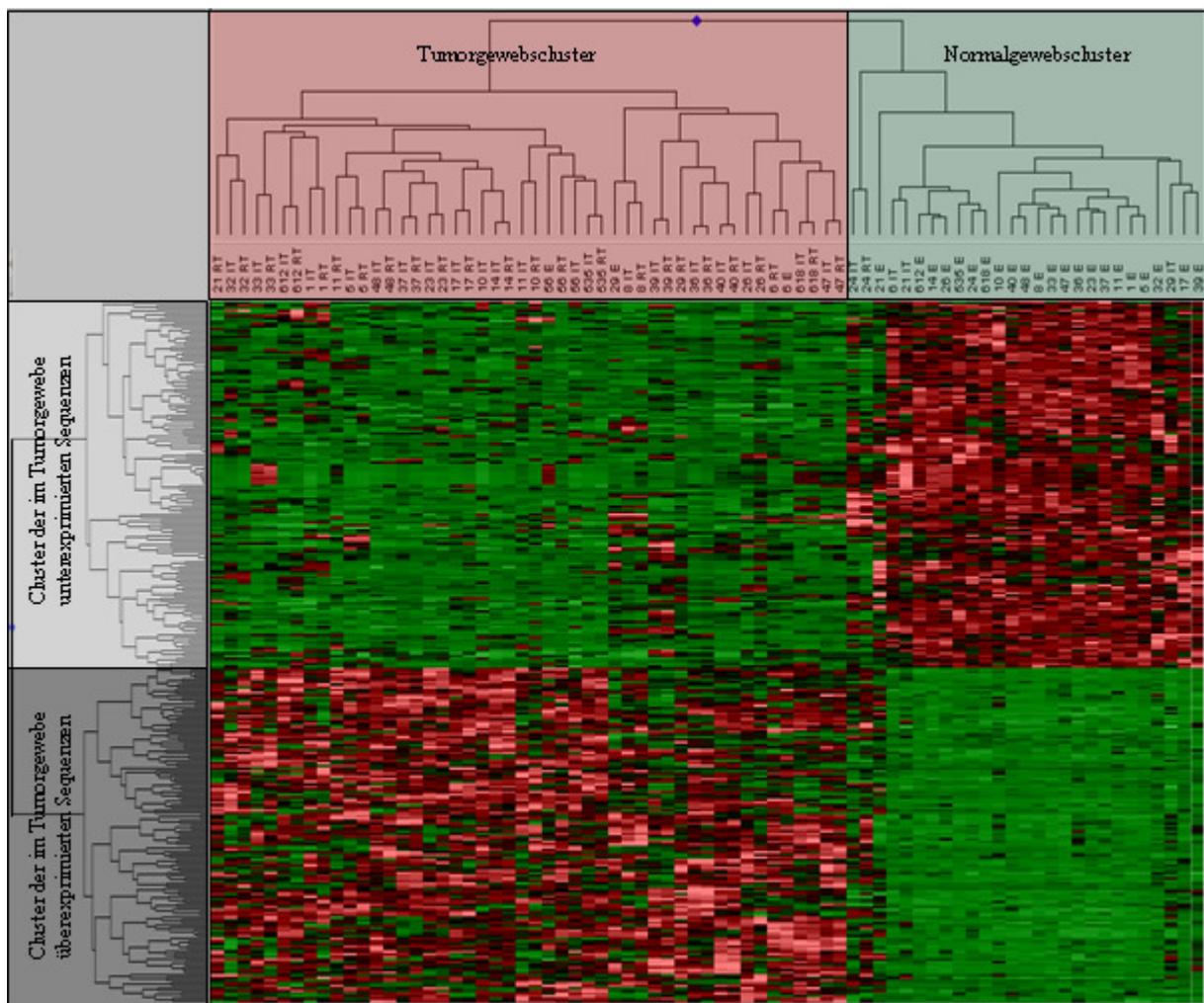


Abbildung 27 Differenzielles Expressionsprofil der Normal- (E) und der Tumorgewebeproben (IT und RT) erstellt durch die Clusteranalyse mit den insgesamt 267 identifizierten differenziell exprimierten Sequenzen der Tumorinvasionfront (IT) und der zentralen Tumorregion (RT). Das Normalgewebecluster ist grün, das Tumorgewebecluster rot hinterlegt. Die Expressionshöhe der Gene bzw. ESTs ist farbkodiert: rote Datenpunkte stehen für ein hohes Expressionsniveau, grüne Datenpunkte für ein niedriges Expressionsniveau im Tumorgewebe relativ zum Normalgewebe. Das Cluster der im Tumorgewebe unterexprimierten Sequenzen, die im Einzelnen Tabellen 10, 12 und 14 zu entnehmen sind, ist im Dendrogramm weiß hinterlegt. Das Cluster der differenziell exprimierten Sequenzen, die im Tumorgewebe überexprimiert sind (siehe Tabelle 9, 11 und 13), ist schwarz hinterlegt.