

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

DISSERTATION

***Genexpressionsanalyse der angiogenetischen Marker
Robo1, Robo4 und Slit2 beim kolorektalen Karzinom***

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Oliver Döbler

aus
Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. H.-J. Buhr
 2. Prof. Dr. med. H. Allgayer
 3. Priv.-Doz. Dr. C. Pilarsky

Datum der Promotion: 09.09.2011

Erklärung

„Ich, Oliver Döbler erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Genexpressionsanalyse der angiogenetischen Marker Robo1, Robo4 und Slit 2 beim kolorektalen Karzinom**, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	01
1.1 Kolorektales Karzinom	01
1.1.1 Epidemiologie	01
1.1.2 Ätiologie	01
1.1.2.1 Ernährungsfaktoren	01
1.1.2.2 Genetische Faktoren	02
1.1.2.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	02
1.1.3 Pathogenese	03
1.1.4 Lokalisation	03
1.1.5 Klassifikation	03
1.1.6 Prognose des kolorektalen Karzinoms	05
1.1.7 Chirurgische Therapie	06
1.1.8 Adjuvante-, neoadjuvante- und palliative Therapie	07
1.1.8.1 Adjuvante Therapie Kolonkarzinom	07
1.1.8.2 Adjuvante- und neoadjuvante Therapie Rektumkarzinom	08
1.1.9 Monoklonale Antikörper in der Therapie des kolorektalen Karzinoms	08
1.1.9.1 Cetuximab	09
1.1.9.2 Panitumumab	09
1.1.9.3 Bevacizumab	09
1.2 Angio- und Tumorangiogenese	10
1.2.1 Tumorproliferation	10
1.2.2 Molekulare Mechanismus der Tumorangiogenese	11
1.2.2.1 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	11
1.2.2.2 Das Angiopoietin- / Tie-System	12
1.2.2.3 Neue molekulare Signalwege der Angiogenese	12
1.3 Roundabout- und Slit-Signalweg	12
1.3.1 Robo-Slit in der Neurogenese	13
1.3.2 Robo-Slit in der Angiogenese und Tumorentwicklung	13
1.4 Vorarbeiten: DNA-Chiparray Analyse	15
1.4.1 Chiparray Analyse von Robo1	15
1.4.2 Chiparray Analyse von Robo4	16

1.4.3 Chiparray Analyse von Slit2	16
2. Ziel der Arbeit	18
3. Material	19
3.1 Lösungen und Puffer	19
3.2 Chemikalien	19
3.3 Kits	21
3.4 Sequenzen	21
3.5 Antikörper	22
3.6 Geräte	22
3.7 Materialien	23
3.8 Software	23
4. Methoden	24
4.1 Patienten und Gewebeproben	24
4.1.1 Patienten	24
4.1.2 Gewebeprobenasservierung	24
4.1.3 Makrodissektion	24
4.2 Methoden der RNA/DNA Analyse	25
4.2.1 Gesamt-RNA-Isolierung aus humanem Gewebe	25
4.2.2 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäurelösungen	26
4.2.3 cDNA Synthese	26
4.2.4 Herstellung einer Standard Konzentrationsreihe für Real-Time PCR	26
4.2.4.1 Amplifizierung der Zielsequenzen durch PCR	27
4.2.4.2 DNA-Elution aus Agarosegelen	27
4.2.4.3 Ligation von Nukleotidsequenzen in den Klonierungsvektor	28
4.2.4.4 Transformation von JM109 Zellen	28
4.2.4.5 Plasmidaufreinigung	28
4.2.4.6 Plamidsequenzierung	29
4.3 Real-Time PCR	30
4.3.1 Allgemeines	29
4.3.2 Standardisierungen und Qualitätskontrolle Real-Time PCR	31
4.3.3 Real-Time PCR Reaktionsansatz	31

4.3.4	Datenanalyse der Real-Time PCR Ergebnisse	32
4.3.5	Normalisierung der PCR Ergebnisse	32
4.3.6	Bewertungskriterien der PCR	32
4.4	Immunhistochemie	33
4.4.1	Allgemeines	33
4.4.2	Gewebeschnitte	34
4.4.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	34
4.4.4	Immunhistochemische Färbung	35
4.4.5	Bewertungsskala der immunhistochemischen Färbung	35
4.5	In-Situ Hybridisierung	36
4.5.1	Allgemeines	36
4.5.2	Herstellung der RNA-Sonden	36
4.5.3	DIG-Markierung der RNA-Sonden	36
4.5.4	Qualitätskontrolle der DIG-Markierung	37
4.5.5	Gewebeschnitte für In-Situ Hybridisierung	37
4.5.6	In-Situ Hybridisierung	37
4.5.7	Bewertungsskala der in-situ Hybridisierung	38
4.6	Statistische Methoden	39
5.	Ergebnisse	40
5.1	Patienten und Gewebeproben	40
5.2	Ergebnisse der Real-Time PCR	41
5.3.1	Ergebnisse der Expression von Robo1 auf RNA/DNA Ebene	41
5.3.2	Ergebnisse der Expression von Robo4 auf RNA/DNA Ebene	42
5.3.3	Ergebnisse der Expression von Slit2 auf RNA/DNA Ebene	43
5.4	Immunhistochemie	45
5.4.1	Immunhistochemische Ergebnisse für Robo1	45
5.4.2	Immunhistochemische Ergebnisse für Robo4	47
5.4.3	Immunhistochemische Ergebnisse für Slit2	51
5.5	In-Situ Hybridisierung	53
5.5.1	In-Situ Hybridisierung für Robo1	54
5.5.2	In-Situ Hybridisierung für Robo4	55
5.6	Korrelationsanalysen	58
5.6.1	Korrelation Immunhistochemie / Real-Time PCR für Robo1	58

5.6.2 Korrelation Immunhistochemie / Real-Time PCR für Robo4	59
5.6.3 Korrelation Immunhistochemie / Real-Time PCR für Slit2	60
6. Diskussion	62
6.1 Bewertung des Patientenkollektivs	62
6.2 Expressionsanalyse von Robo1	63
6.3 Expressionsanalyse von Robo4	65
6.4 Expressionsanalyse von Slit2	68
6.5 Robo Proteine - potentielle Ziele der Tumorthherapie	70
7. Zusammenfassung	73
8. Anhang	75
9. Literaturverzeichnis	81
10. Lebenslauf	91
11. Publikationsverzeichnis	94
12. Danksagungen	95

1. Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist mit einer Inzidenz von ca. 37 000 für Männer und ca. 36 000 für Frauen pro Jahr und einer Mortalitätsrate von ca. 30 000 pro Jahr in Deutschland einer der häufigsten malignen Tumoren [1]. Männer erkranken im Mittel mit 69, Frauen mit 75 Jahren. Das kolorektale Karzinom ist darüber hinaus sowohl für Frauen, als auch für Männer die zweithäufigste Krebstodesursache. Die geschätzten Erkrankungsraten von Männern und Frauen bleiben nach einem seit 1980 zunehmenden Trend in den letzten 10 Jahren nahezu unverändert. Im Gegensatz zur Entwicklung der Inzidenz nehmen die Sterberaten an kolorektalem Karzinom für beide Geschlechter ab [2]. Im internationalen Vergleich findet man die höchsten Inzidenzraten in Europa, Nordamerika und Australien. Die niedrigsten Erkrankungsraten werden in Afrika, Asien und Lateinamerika festgestellt [3]. Unter den EU- Ländern liegt die höchste Inzidenz für Männer in Polen und Frankreich, für Frauen in Luxemburg und Belgien. Verhältnismäßig niedrige Erkrankungsraten finden sich in Griechenland, Finnland, Spanien und der Schweiz. Die Inzidenz in Deutschland liegt im mittleren Drittel [2].

1.1.2 Ätiologie

Für die überwiegende Anzahl der kolorektalen Karzinome sind eine Kombination von Umwelteinflüssen, mit dadurch bedingten genetischen Alterationen auf molekularbiologischer Ebene, und ein individuelles Risiko aufgrund einer genetischen Prädisposition ursächlich. 80% der kolorektalen Karzinome treten sporadisch auf. Für etwa 20% der Fälle ist eine familiäre Häufung beim Auftreten des Tumors nachzuweisen. Diese lässt entweder auf eine genetische Ursache oder eine gemeinsame Exposition der Familienangehörigen bezüglich externer Risikofaktoren oder auf eine Kombination von beiden schließen [4].

1.1.2.1 Ernährungsfaktoren

Eine erhöhte Menge von Fett in der Nahrung ist ein möglicher Risikofaktor für das kolorektale Karzinom. Eine ballaststoffreiche und vitaminreiche Ernährung, sowie die erhöhte Zufuhr von Obst und Gemüse ist mit einer reduzierten Häufigkeit von Kolonadenomen/-karzinomen assoziiert. Adipositas gilt als Risikofaktor für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms [5,6].

1.1.2.2 Genetische Faktoren

Personen, die aufgrund einer besonderen Prädisposition ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms im Vergleich mit der Normalbevölkerung aufweisen, gehören in der Regel zu einer definierten Risikogruppe.

Beim sporadischen kolorektalem Karzinom mit positiver Familienanamnese ist für Verwandte ersten Grades das mittlere Risiko 2- bis 3fach erhöht. Eine weitere, 3- bis 4fache Risikosteigerung besteht, wenn bei dem Indexpatienten das kolorektale Karzinom vor dem 60. Lebensjahr aufgetreten ist [7,8]. Verwandte zweiten Grades haben ein leicht erhöhtes Karzinomrisiko (1,5fach) [7]. Verwandte dritten Grades zeigten bisher kein erhöhtes Karzinomrisiko [2]. Hereditäre kolorektale Karzinome sind selten (weniger als 5% aller kolorektalen Karzinome). Die Diagnose hat erhebliche Konsequenzen für die Patienten und ihre Verwandten. Die Syndrome und das Risiko für ein Auftreten eines kolorektalen Karzinoms sind in Tab. 1 zusammengefasst.

Syndrom Kurz	Syndrom	Genet. Defekt	Risiko
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis	Defekt des APC Gens auf 5q21-q22	100%
AAPC	Attenuierte Familiäre Adenomatöse Polyposis	Mutation APC-Gen und MUTHY-Gen	ca. 80%
MAP	MUTHY Assoziierte Polyposis	Mutation des MUTHY Gens	ca. 60-80%
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Coli Carcinoma	Defekt DNA Reparatur System, MSI	ca. 60-80%
PJS	Peutz-Jeghers-Syndrom	Mutation STK11/LKB1 auf 19p13.3	ca. 40%
FJP	Familiäre Juvenile Polyposis Coli	Mutation MADH4-Gen	ca. 17-68%
HMPS	Hereditary-Mixed-Polyposis Syndrome	nicht identifiziert	erhöht
HPCS	Hyperplastic Polyposis Coli Syndrome	nicht identifiziert	erhöht

Tab. 1: Übersicht von mit kolorektalem Karzinom assoziierten Syndromen, des genetischen Defektes und des Lebenszeiterkrankungsrisikos.

1.1.2.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen steht besonders die Colitis Ulcerosa im Vordergrund. Patienten mit Colitis Ulcerosa weisen ein erhöhtes Risiko für ein kolorektales Karzinom auf. In einer Metaanalyse betrug das kumulative Karzinomrisiko bei Pancolitis 2% nach 10 Jahren, 9% nach 20 Jahren und 18% nach 30 Jahren [9]. Beim Morbus Crohn ist ebenfalls von einem erhöhten kolorektalen Karzinomrisiko auszugehen. Dieses ist jedoch im Vergleich zur Colitis Ulcerosa noch unzureichend charakterisiert. Möglicherweise aber geringer. Beim Morbus Crohn besteht ein erhöhtes Dünndarmkarzinomrisiko [2].

1.1.3 Pathogenese

Kolorektale Karzinome entstehen aus Epitheldysplasien. 90% aller Dysplasien treten in Form von Adenomen auf. Das kumulative Risiko, dass an der Stelle eines Adenoms ein Karzinom entstehen kann, beträgt nach einem Beobachtungszeitraum von 5 Jahren 2,5%, nach 10 Jahren 7,5% und nach 20 Jahren 25% [10]. Die Tumorprogression vom Normalgewebe über das Adenom zum Karzinom wird verursacht durch eine Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen. Dabei handelt es sich um Aktivierungen von Onkogenen und/oder Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen. Ist eine kritische Gesamtzahl an genetischen Veränderungen eingetreten, kann das anfangs noch kontrollierte Wachstumsverhalten in ein unkontrolliertes malignes Wachstum übergehen. Abbildung 1 zeigt schematisch genetische Veränderungen, die zur Entstehung eines sporadischen kolorektalen Karzinoms führen können.

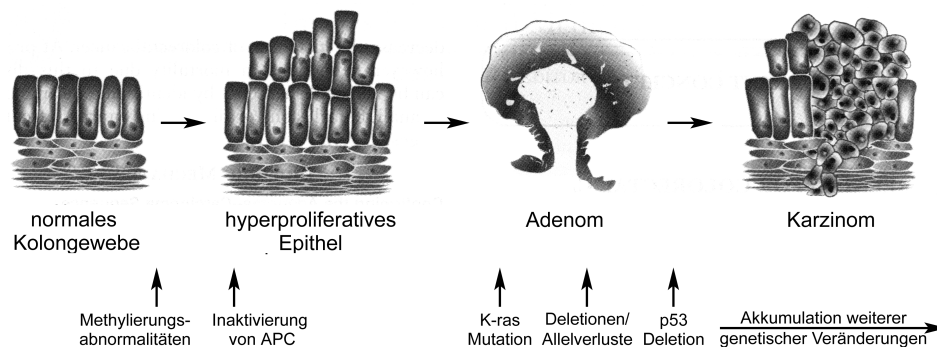


Abb. 1: Modell der Karzinogenese (modifiziertes Modell nach Vogelstein et al.) [11]. Darstellung der molekularbiologischen Mechanismen beim Kolonkarzinom.

1.1.4 Lokalisation

Die kolorektalen Karzinome verteilen sich im Kolon auf das Sigmoideum (35%), Coecum (22%), Kolon ascendens (12 %), Kolon transversum (10%) und Kolon descendens (7%). Von den Karzinomen entfallen 69% auf das Kolon und 31% auf das Rektum [12]. Innerhalb der letzten 40 Jahre wurde eine Veränderung der Verteilung zugunsten proximaler Lokalisationen beobachtet (shift to the right) [13]. Dies lässt sich unter anderem auf die gestiegene Vorsorgeuntersuchungsrate zurückführen [1,2].

1.1.5 Klassifikation

Für die Therapieplanung und die Prognose sind die Klassifikation nach dem TNM-System, die Stadieneinteilung der UICC (Union internationale contre le cancer) (UICC Atlas 2009) und eine Einschätzung der Resektion anhand der R-Klassifikation nötig. Für die Festlegung der N-

Kategorie gilt, dass die Zahl der untersuchten und die Zahl der befallenen Lymphknoten angegeben werden soll. Ein N0-Stadium soll nur dann diagnostiziert werden, wenn mindestens 12 Lymphknoten untersucht und als tumorfrei befundet wurden. Bei weniger als 12 tumorfreien Lymphknoten muss die N-Kategorie mit NX angegeben werden [13]. Die TNM-Klassifikation und die UICC Stadieneinteilung sind in Tabelle 2 und 3 dargestellt.

T-Kategorien	Primärtumor
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
N-Kategorien	Regionäre Lymphknoten
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
M-Kategorien	Fernmetastasen
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

Tab. 2: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (2009)

<u>UICC-Stadium</u>	<u>T-Kategorie</u>	<u>N-Kategorie</u>	<u>M-Kategorie</u>
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

Tab. 3: UICC-Stadieneinteilung (UICC-Atlas 2009)

Die Residualklassifikation der UICC (R-Kategorie) gibt das Fehlen oder Vorhandensein von nachweisbarem Resttumor nach erfolgter chirurgischer Therapie an. Beurteilungsgrundlage dafür sind die histopathologisch begutachteten Resektionsränder des Operationspräparates. Das Fehlen von nachweisbarem Resttumor wird als R-0-Resektion beschrieben, während die R-1-Resektion einen mikroskopisch und die R-2-Resektion einen makroskopisch erfassbaren Residualtumor kennzeichnet [15].

1.1.6 Prognose des kolorektalen Karzinoms

Die anatomische Ausbreitung stellt für das kolorektale Karzinom den wichtigsten prognostischen Faktor dar. Ist der Tumor noch auf die Darmwand beschränkt, ist dies ein günstiger prognostischer Faktor. Dies ist bei 40% der Kolonkarzinome bei Erstdiagnose der Fall (UICC-Stadium I:13%, UICC-Stadium II: 27%). Lymphknotenmetastasen (UICC-Stadium III: 32%) oder Fernmetastasen (UICC-Stadium IV: 28%) bei Erstdiagnose stellen prognostisch ungünstige Situationen dar. Die 5-Jahres-Überlebenschance im Stadium I beträgt 80–100%, im Stadium II 60–80%, bei Lymphknotenbefall im Stadium III nur noch 30–60% und bei Vorliegen von Fernmetastasen weniger als 30% [13]. Die Erfahrung und Sorgfalt des Chirurgen beeinflusst die Prognose erheblich [17]. Die R-Situation ist bei der Prognose des kolorektalen Karzinoms eben-

falls von entscheidender Bedeutung. Liegt eine R-0 Situation vor, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 70%. In einem R-1 / R-2 Stadium liegen die 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 4,6% und 10,7% [18].

1.1.7 Chirurgische Therapie

Die chirurgisch-onkologische Therapie ist bislang das einzige potenziell kurative Behandlungsverfahren des kolorektalen Karzinoms. Das operative Vorgehen umfasst dabei die Resektion des Primärtumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand im Gesunden und die En-bloc-Entfernung des regionären Lymphabflussgebietes. Da sich der lymphatische Abfluss nach dem Verlauf der arteriellen Gefäße richtet, ist eine zentrale Ligatur und Durchtrennung der arteriellen Versorgung nötig. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über das therapeutische Vorgehen beim Kolonkarzinom.

<u>Lokalisation</u>	<u>Empfohlene Therapie</u>	<u>Postoperative Situation</u>
Coecalpol	Hemikolektomie rechts	Ileotransversostomie
Colon ascendens	Hemikolektomie rechts	Ileotransversostomie
Karzinom an der rechten Flexur	Erweiterte Hemikolektomie rechts	Ileotransversostomie nahe linker Flexur
Rechtsseitiges Colon transversum	Erweiterte Hemikolektomie rechts	Ileotransversostomie nahe linker Flexur
Linksseitiges Colon transversum	Erweiterte Hemikolektomie links	Transversorektostomie oder Aszendorektostomie
Karzinom an der linken Flexur	Erweiterte Hemikolektomie links	Transversorektostomie oder Aszendorektostomie
Colon descendens	Hemikolektomie links	Transversorektostomie
Colon sigmoideum	Hemikolektomie links	Transversorektostomie

Tab. 4: Therapeutisches Vorgehen in Abhängigkeit von der Lokalisation eines Kolonkarzinoms [13].

Die Therapie des Rektumkarzinoms erfordert neben der Resektion des Primärtumors im Gesunden die partielle oder totale Entfernung des regionären Lymphabflussgebiets im Mesorektum [16]. Im T1N0M0 Stadium ist eine kurative Resektion durch lokale Maßnahmen möglich. Die therapeutische Strategie richtet sich nach dem präoperativ erhobenen Befund der Tumorlokalisierung, der Tiefeninfiltration, der Sphinkterfunktion und des Lymphknotenstatus [1]. Als operative Möglichkeiten stehen die transanale endoskopische Mikrochirurgie (TEM), die anteriore Rektumresektion mit partieller mesorektaler Exzision (AR), die tiefe anteriore Rektumresektion mit totaler mesorektaler Exzision (TAR) und die abdominoperineale Rektumextirpation (APR) zur Verfügung. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die therapeutische Strategie nach TNM-Stadieneinteilung für das Rektumkarzinom.

<u>Klinische Situation</u>	<u>Empfohlene Therapie</u>
Intraperitonealer Tumor uT1N0M0	TEM, endoskopische Mukosektomie
Extraperitonealer Tumor uT1N0M0	Lokale transanale Exzision
Ohne Sphinkterinfiltration uT2N0M0 uT3N0/uT1-3N1-2 Alternativ uT4Nx uTxNxM1	TAR TAR + adjuvante (Radio-/)Chemo-Therapie Neoadjuvante (Kurzzeit-)Radio-/Chemo-Therapie + TAR Neoadjuvante (Langzeit-)Radio-/Chemo-Therapie + TAR TAR ± Metastasenresektion ± palliative Chemotherapie
Mit Sphinkterinfiltration Alle Stadien (außer uT1N0M0) Alternativ	APR ± adjuvante/palliative (Radio-/)Chemo-Therapie Neoadjuvante (Langzeit-)Radio-/Chemo-Therapie + APR

Tab. 5: Therapeutisches Vorgehen bei Rektumkarzinom [14].

1.1.8 Adjuvante-, neoadjuvante- und palliative Therapie

Voraussetzung für eine adjuvante Therapie ist die R0-Resektion des Primärtumors. Die Indikation zur adjuvanten Therapie wird anhand der UICC-Stadieneinteilung vorgenommen [1]. Beim Rektumkarzinom wird stadienabhängig (UICC) die Indikation zur neoadjuvanten Therapie vor Resektion gestellt [1]. Beim metastasierten kolorektalen Karzinom ist neben der Möglichkeit einer operativen Therapie bei resektablen Metastasen eine systemische Therapie grundsätzlich indiziert. Ein Überlebensvorteil konnte in Studien nachgewiesen werden [21]. Die Auswahl des Verfahrens sollte sich nach dem Therapieziel z. B. Tumorremission mit dem Ziel einer sekundären Resektion oder alleinige Verlängerung des Überlebensvorteils richten und die Toxizität der unterschiedlichen Verfahren mit einbeziehen.

1.1.8.1 Adjuvante Therapie Kolonkarzinom

Im UICC-Stadium I ist für das kurativ resezierte Kolonkarzinom keine Indikation für eine adjuvante Therapie gegeben. Im UICC-Stadium II kann eine adjuvante Therapie erfolgen, ist aber nach den S3-Leitlinien zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms nicht obligat. In Studien und gepoolten Analysen von Studien bei Patienten mit einem Kolonkarzinom im Stadium II fand sich kein signifikanter Überlebensvorteil durch eine postoperative adjuvante Chemotherapie [1]. Ein Nutzen der adjuvanten Therapie im Stadium II kann jedoch nicht ausgeschlossen werden und sollte daher dem Patienten als Option dargelegt werden [19]. Im UICC-Stadium III ist eine adjuvante Therapie indiziert. Randomisierte Studien zeigten einen signifikanten Überlebensvorteil

für Patienten mit reseziertem Karzinom im Stadium III und adjuvanter Chemotherapie [20]. Die S3 Leitlinien empfehlen für das Stadium III eine oxaliplatinhaltige Therapie nach dem FOLFOX4 Schema: 5-Fluoruracil (5-FU) + Folinsäure (FS) + Oxaliplatin. Alternativ dazu oder als Empfehlung für die Therapie des Stadiums II kann eine orale Monotherapie mit Fluoropyrimidinen durchgeführt werden.

1.1.8.2 Adjuvante- und neoadjuvante Therapie Rektumkarzinom

Im UICC-Stadium I ist weder eine neoadjuvante noch adjuvante Therapie indiziert. Im Stadium II und III ist eine neoadjuvante Radio-Chemo-Therapie indiziert und sollte eine 5-FU Monotherapie und/oder eine Kombination mit FS beinhalten [1]. Im UICC-Stadium II und III postoperativ ohne vorhergegangene neoadjuvante Therapie und in allen Stadien nach neoadjuvanter Therapie, (einschließlich einem postoperativen UICC-Stadium I nach neoadjuvanter Therapie) sollte eine adjuvante Radio-Chemo-Therapie mit 5-FU oder einer 5-FU/FS Kombination als Chemotherapeutikum erfolgen.

1.1.9 Monoklonale Antikörper in der Therapie des kolorektalen Karzinoms

Monoklonale Antikörper kommen in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms als neue Möglichkeiten der Ergänzung von Standardtherapieverfahren bzw. als Alternativen bei Therapieversagen von Standardprotokollen seit 2004 zum Einsatz. Das Prinzip der Therapie mit monoklonalen Antikörpern beruht auf der selektiven Bindung mit spezifischen Zelloberflächenepitopen und der Initiierung bzw. der Blockung von Zell-Zell Interaktionen bzw. intrinsischen Zellfunktionen und damit zur Unterbindung bzw. Abschwächung von Wachstumsvorgängen der Tumorzellen. Das spezifische Antigen wird für die Herstellung des monoklonalen Antikörpers zunächst in eine Maus injiziert. Die als Immunantwort entstehenden B-Zellen isoliert und ein B-Zellklon mit einer Plasmazytomzelle fusioniert. Die dabei entstehende Hygrydiomzelle produziert nun den monoklonalen Antikörper [22]. Je höher der Anteil der Mausproteine des monoklonalen Antikörpers ist, desto stärker fällt eine Immunantwort gegen das Therapeutikum selbst aus und erhöht die Nebenwirkungen der Therapie. Man unterscheidet murine monoklonale Antikörper, chimäre Antikörper (nur der variable Teil des Antikörpers ist Mausprotein), humanisierte Antikörper (nur die Antigenbindungsstelle ist Mausprotein) und humane Antikörper (hergestellt in transgenen Mäusen) [23]. Für die Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms sind bisher drei monoklonale Antikörper zugelassen: Cetuximab, Panitumumab und Bevacizumab.

1.1.9.1 Cetuximab

Cetuximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper gegen eine Tyrosinkinase auf der Zelloberfläche, die als Rezeptor für einen epidermalen Wachstumsfaktor dient. Dieser EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ist bei kolorektalem Karzinom in der Zellmembran überexprimiert [24]. Durch die Interaktion von Cetuximab und EGFR wird das Tumorzellwachstum inhibiert, Angiogenese reduziert, Tumorzellinvasion und Metastasierung gehemmt und Zellapoptose initiiert [25]. Cetuximab ist bei der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms als Erstlinientherapie mit Oxaliplatin und als Zweitlinientherapie, in Kombination mit Irinotecan, bei Tumorprogress bei vorbestehender irinotecanhaltiger Therapie seit 2004 in Deutschland zugelassen. Ein signifikanter progressionsfreier Überlebensvorteil konnte in der BOND-1-Studie gezeigt werden [26].

1.1.10.2 Panitumumab

Panitumumab ist ein vollständig humaner monoklonaler Antikörper der an den EGFR bindet. In einer Phase III Studie an Patienten mit einem Therapieversagen auf zytostatische Standardtherapie mit 5-FU/FS, Irinotecan und Oxaliplatin konnte gegenüber der Kontrollgruppe mit Panitumumab eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens erreicht werden [27]. Die Wirksamkeit von Panitumumab war auf Tumore beschränkt, die ein bestimmtes genetisches Expressionsprofil aufwiesen (keine k-ras-Mutation [28]). In den USA wurde Panitumumab im September 2006, in Europa im Dezember 2007 zugelassen. Die Zulassung ist auf Patienten mit Tumoren beschränkt, die ein Wildtyp-k-ras-Gen exprimieren und bei denen fluoropyrimidin-, oxaliplatin- und irinotecanhaltige Chemotherapieregime versagt haben (Drittlinientherapie) [1].

1.1.10.3 Bevacizumab

Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper der an den VEGF-Rezeptor (Vascular Endothelial Growth Factor), einen Rezeptor der Angiogenese bindet. VEGF wird in beinahe 50% der kolorektalen Tumoren exprimiert mit im Vergleich nur geringer bis fehlender Expression in normaler Kolonmukosa und Adenomen [29]. Die Bevacizumab-Interaktion mit dem VEGF-Rezeptor verhindert die Neubildung von Blutgefäßen. Die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff ist unterbrochen und das Tumorwachstum wird gehemmt. Bevacizumab ist als Erstlinientherapie seit 2005 in Deutschland in Kombination mit 5-FU/FS bzw. 5-FU/FS + Irinotecan bzw. 5-FU/FS + Oxaliplatin zugelassen. In zahlreichen Studien konnte ein hoch signifikanter bzw. signifikanter Vorteil für das progressionsfreie Überleben nachgewiesen werden [30,31]. Bevacizumab kann als Zweitlinientherapie mit Oxaliplatin und 5-FU/FS eingesetzt werden. Eine

Monotherapie mit Bevacizumab hat keinen klinischen Stellenwert [32].

1.2 Angio- und Tumorangiogenese

Blutgefäße entstehen im Rahmen der Embryogenese aus Vorläuferzellen aus denen sich Endothelzellen entwickeln oder im Rahmen der Angiogenese bei der neue Kapillaren aus vorhandenen Blutgefäßen entstehen. Eine Angiogenese kommt im normalen physiologischen Rahmen nur selten vor, z. B. bei der Endometriumproliferation während des weiblichen Reproduktionszyklus oder bei der Wundheilung. Im Gegensatz dazu tritt Angiogenese bei vielen pathologischen Zuständen z.B. diabetischer Retinopathie, Arthritis, Arteriosklerose, Psoriasis und Tumorwachstum auf [33]. Die Angiogenese wird durch unterschiedliche Stimulatoren und Inhibitoren reguliert und kontrolliert. Eine Auswahl der wichtigsten endogenen Angiogenesestimulatoren und Angiogeneseinhibitoren zeigt Tabelle 6.

Angiogenesestimulatoren	Angiogeneseinhibitoren
Fibroblast growth factors (FGF's)	Thrombospondin 1 und 2
Vascular endothelial growth factors (VEGF-A,B,C,D)	Interferone α , β , γ
Angiopoietine (Ang-1, Ang-2)	Tissue inhibitor of metalloproteinasis (TIMP's)
Mickine	Urokinase Receptor Antagonist
Pleiotropine	Platelet factor 4
Platelet derived endothelial cell growth factors	Interleukins 1, 4, 12
Transforming growth factor (TGF α , β)	Interferon gamma inducible protein 10 (IP-10)
Hepatocyte growth factor (HGF)	Endostatin
Platelet derived growth factor (PDGF)	Angiostatin
Epidermal growth factor (EGF)	Fragmente von Laminin, Fibronektin
Interleukin 8	Prolaktin
Placental growth factor	
Granulocyte colony stimulation factor (G-CSF)	
Tumor necrosis factor α (TNF α)	
Angiogenin	
Proliferin	

Tab. 6: Endogene Stimulatoren und Inhibitoren der Angiogenese

1.2.1 Tumorproliferation

Tumorzellen sind aufgrund ihres gesteigerten Metabolismus auf eine erhöhte Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen angewiesen. Ab einer bestimmten Größe (ca. 1-2 mm³) kann dieser Bedarf nicht mehr allein durch Diffusion gedeckt werden [34]. Der Tumor ist damit auf die Versorgung durch das Gefäßsystem angewiesen. Dies kann durch Angiogenese, also durch das Aussprossen von Kapillaren aus präexistenten Blutgefäßen, aufgrund von angiogenen Stimuli erfolgen [35]. Weitere Möglichkeiten der Anbindung an das Gefäßsystem sind die Vaskulogenese, d.h. die

Neusynthese von Blutgefäßen aus hämatogenen Vorläuferzellen [36], das Tumorwachstum im Verlauf von bereits bestehenden Blutgefäßen [37] oder die Entwicklung von Gefäßnetzwerken durch Tumorzellen ohne die Beteiligung von Gefäßzellen (vaskuläre Mimikry) [38]. Der Mechanismus der Angiogenese läuft nach einer genau definierten Sequenz ab. Überwiegen proangiogenetische Stimuli, aktiviert durch exogene Faktoren wie z. B. Hypoxie im Tumor, metabolisch bedingte Tumorzellapoptose und die kritische Tumormasse [39] oder werden spezifische Tumoronkogene aktiviert oder Tumorsuppressorgene gehemmt, kommt es zum Umschalten auf den Angiogenesemechanismus. Dies wird als „angiogentischer Switch“ bezeichnet [39]. Als erstes lösen Metalloproteinasen die extrazelluläre Matrix und die vaskuläre Basalmembran bereits vorhandener Blutgefäße auf. Endothelzellen wandern aus dem Zellverbund aus und orientieren sich, vergleichbar mit der Neurogenese, in Richtung proangiogenetischer Faktoren, die von den Tumorzellen sezerniert werden. Die Endothelzellen proliferieren und bilden im Tumor gefäßähnliche Strukturen, welche den metabolischen Bedarf der Karzinomzellen decken. Des Weiteren produzieren die Endothelzellen eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die ebenfalls einen stimulierenden Effekt auf die Tumorprogression haben.

1.2.2 Molekulare Mechanismen der Tumorangiogenese

1.2.2.1 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Der Wachstumsfaktor VEGF ist einer der wichtigsten Regulatoren der Angiogenese und Tumorangiogenese. Die Expression von VEGF-A ist bei vielen Tumorentitäten hochreguliert z.B. beim Mammakarzinom [40], beim Adenokarzinom der Lunge [41], beim Nieren- und Blasenkarzinom [42], beim Ovarial- und Endometriumkarzinom [43, 44, 45] und beim kolorektalen Karzinom [29]. VEGF-A wird von Tumorzellen sezerniert, tritt in die Blutbahn und bindet an die Rezeptoren VEGFR-1, die lösliche Variante sVEGFR-1 und VEGF-2, der nahezu ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert wird. Die Genexpression des VEGF-A durch Tumorzellen wird durch unterschiedliche Mechanismen verstärkt. Eine zentrale Rolle spielt die Hypoxie und der durch Hypoxie aktivierte HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor -1). Eine Reihe von Wachstumsfaktoren, die während der Tumorprogression sezerniert werden wie EGF, TGF- α , TGF- β etc. aber auch Interleukine z. B. IL-6, IL-1 α triggern die VEGF Expression [46,47]. Die Blockade des VEGF durch monoklonale Antikörper wird in der Therapie des kolorektalen Karzinoms genutzt.

1.2.2.2 Das Angiopoietin/Tie System

Als ein zweites System neben dem VEGF/VEGFR mit einer gefäßspezifischen Rezeptor-Tyrosinkinase wurden die Angiopoietine (Ang) und ihre korrespondierenden Rezeptoren die Tie-Proteine identifiziert [48]. Die Tie-2 Rezeptoren werden fast ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert [49]. Die Aktivierung der Tie-2 Rezeptoren induziert Zellwanderung und Verbreitung der Endothelzellen und das Aussprossen von Kapillaren. Bei erhöhter Angiogeneseaktivität ist eine hohe Expression von Tie-2 Rezeptoren nachweisbar [50]. Die lösliche Variante sTie-2 ist vermehrt im Blut nachweisbar [51]. In Interaktion mit Ang-2 wird Tie-2 aktiviert und die Sensitivität für proangiogenetische Faktoren wie z. B. VEGF noch weiter erhöht [52]. Ang-2 ist in verschiedenen Tumorentitäten z.B. gastrointestinalen Stromatumoren, Schwannomen, kolorektalen Karzinomen vermehrt exprimiert [53,54]. Es laufen klinische Phase I Studien an Patienten mit AMG 386 einem Inhibitor für Ang-2 bei soliden Tumoren [55].

1.2.2.3 Neue molekulare Signalwege der Tumorangiogenese

Im Rahmen der Suche nach neuen therapeutischen Zielstrukturen für eine antiproliferative Tumorthherapie wurden einige neue Signalwege identifiziert, die eine Rolle in der normalen und pathologischen Angiogenese spielen. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht dieser Signalwege.

Signalweg	Rezeptor	Ligand	Nachweis in Tumoren (Auswahl)
Ephrine (Eph)	Eph 1-6	Ephrin A1-A5; B1-B3	Melanom, Brust, Magen, Kolon, Prostata
Notch / Delta	Notch 1-4	Jagged 1,2 ; Delta 1,3,4	T-Zell Leukämie, Brust, Kolon
Hedgehog (hh)	Patched 1	Shh, Dhh, Ihh	Gehirn, Lunge Brust , Prostata
Roundabout / Slit	Slit 1-3	Robo 1-4	Melanom, Haut, Prostata, Kolon, Lunge

Tab. 7: Übersicht von an Angiogenese beteiligten Signalwegen, welche in verschiedenen Tumorgeweben mit erhöhter Expression nachgewiesen werden konnten.

1.3 Roundabout- und Slit-Signalweg

Die Roundabout-Proteine umfassen eine Familie von transmembranen Rezeptoren, die zuerst 1998 in *Drosophila melanogaster* identifiziert und isoliert wurden [56]. Vier Roundabout-Rezeptoren konnten bisher identifiziert werden: Robo1, Robo2, Robo3 und Robo4. Robo1-3 setzten sich aus fünf Immunglobulin (Ig) Domänen und drei Fibronectin Domänen in der extrazellulären Region zusammen. Die intrazelluläre Region besteht aus vier zytoplasmatischen An-

teilen die CC0, CC1, CC2 und CC3 bezeichnet werden. Robo4, welches auch als „Magic Roundabout“ bezeichnet wird, ist kleiner. Die extrazelluläre Region besteht nur aus drei Igs und zwei Fibronektinen. Intrazellulär besteht Robo4 aus den CC0 und CC2 Mustern. Die Slit-Proteine stellen die Liganden der Robo-Rezeptoren dar. Die Bindungsstelle für die Robo-Rezeptoren ist eine leuzinreiche Domäne. Es existieren 3 Homologe der Slit-Protein Familie: Slit1, Slit2 und Slit 3. Der Robo-Slit Signalweg spielt bei der Neurogenese, der Angiogenese und Tumorpherifation eine bedeutende Rolle. Für das Robo-Slit-System konnte ebenfalls wichtige Funktionen bei der Myogenese und der Leukozytenmigration nachgewiesen werden [57,58].

1.3.1 Robo-Slit in der Neurogenese

Slit Proteine sind an der Regulation der Wegführung der Axone bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems im Bereich der embryonalen Mittellinie beteiligt. Die Slit Proteine werden im Bereich der ventralen Mittellinie sezerniert und verhindern mit der Interaktion von Slit2 und Robo1 das ipsilaterale Axone die Mittellinie kreuzen und das kommissurale Axone die Mittellinie wieder rückkreuzen. [59] Dabei werden die kommissuralen Axone zunächst durch Netrin-1 zur Mittellinie geführt, die bis dahin hochregulierte Expression von Robo3 wirkt dabei einer Robo1/Slit2 Interaktion entgegen. Nach Mittellinienkreuzung wird die Expression von Robo3 herunter reguliert, Robo1 und Robo2 werden vermehrt exprimiert und das Slit2/Robo1 System übernimmt die Axonwegführung [60].

1.3.2 Robo-Slit in der Angiogenese und Tumorentwicklung

Alterationen der Slit-Robo Gene konnten bei vielen Tumoren identifiziert werden. Robo1 Hypermethylationen konnten beim Mammakarzinom, Zervixkarzinom und Nierenkarzinom nachgewiesen werden und spielen eine mögliche Rolle in deren Tumor Progression [61, 62]. Robo1 konnte beim Prostatakarzinom als herunterreguliert nachgewiesen werden [63]. Robo-Slit sind an Angiogenese Mechanismen beteiligt. Eine Interaktion von Slit2, welches z. B. von malignen Melanomzellen sezerniert wird, mit Robo1-Rezeptoren auf Endothelzellen bedingen eine Angiogeneseinduzierung [64]. In derselben Studie konnte durch Robo1-Rezeptorblockade mittels der extrazellulären Domäne von Robo1 (RoboN) die Tumormikrogefäßdichte und die Tumormasse in den Neoplasie tragenden Versuchstieren reduziert werden [64]. Robo1 und Slit Aktivität konnte bei Expressionsanalysen mittels cDNA Chiparray-Technologie von Endothelzellen im proangiogenetischen Stadium und anti-angiogenetischen Stadium eindeutig dem proangiogenetischen Expressionsmuster zugeordnet werden [65].

Robo4 wird ausschließlich in Endothelzellen exprimiert und konnte hochreguliert in Tumorgefäßen von Kolon, Gehirn und Blase detektiert werden [66]. Auf normalen Endothelzellen konnte Robo4 bisher nur in vitro in geringer Expression nachgewiesen werden [67]. Eine 3 kb große Promoterregion vor dem Robo4 Gen konnte für die Endothelspezifität identifiziert werden [68]. In vitro Studien mit Matrigel-Assays, bei denen eine Mikrogefäßbildung induziert wird, zeigte bei Blockung von Robo4 mit siRNA (small interfering RNA) ein reduzierte Aussprossung und verminderte Mikrogefäßbildung [69]. In vivo Studien mit dem löslichen Teil des Robo4 Rezeptors (sRobo4) als Inhibitor für die Robo4 Liganden konnten ebenfalls eine Endothelzellmigrations-Reduzierung zeigen [70]. Die Liganden für Robo4 sind bisher noch nicht eindeutig identifiziert. Strukturanalysen der Robo-Slit Bindungen zeigen, dass wichtige Slit-Verbindungsstrukturen auf den Robo4 Rezeptoren fehlen [71]. Eine alternative Möglichkeit, dass Robo4 keinen Liganden für die Aktivität benötigt, sondern durch regulierte Proteolyse wie z. B. beim Angiopoietin/Tie System, insbesondere Tie1, funktioniert, wird diskutiert [72, 73]. Neuere molekularbiologische Studien geben Hinweise auf den intrazellulären Signalweg von Robo1 und Robo4 [69]. Dieser ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

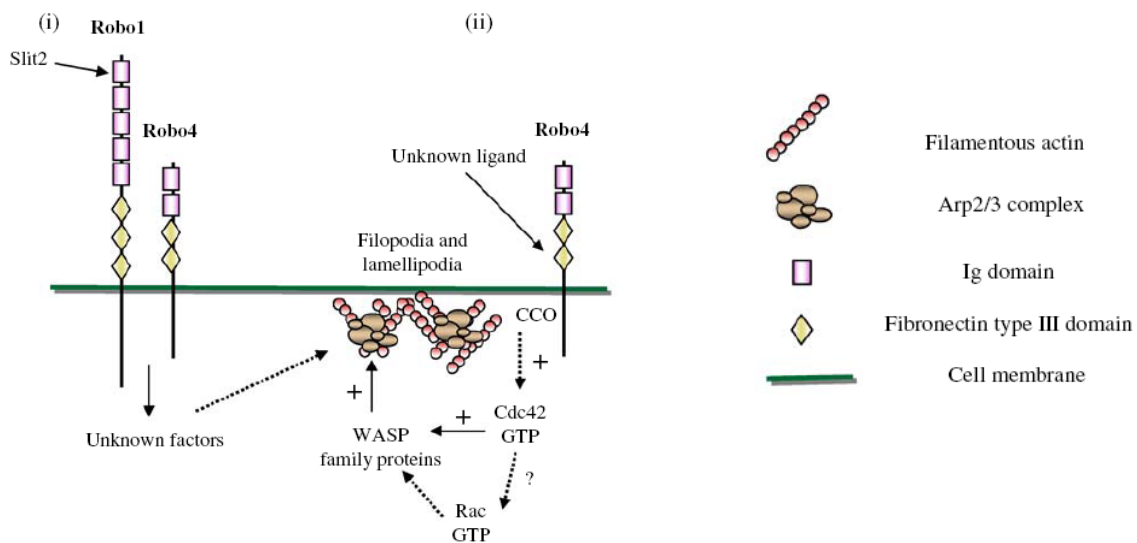


Abb. 2: Slit2 bindet als Ligand an Robo1 bzw. fraglich an Robo4. Es kommt durch unbekannte Faktoren zur Aktivierung des Arp2/3 Komplexes und zur Induktion der Filopodien und Lamellipodien, welche die Zellmigration ermöglichen. Alternativ führt eine Aktivierung von Robo4 zur Initiierung der Cdc42 und Rac-Kaskade die ein WASP (Wiscott-Aldrich-Syndrom-Protein) aktivieren welches Arp2/3 initiiert [73].

1.4 Vorarbeiten: DNA-Chiparray Analyse

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe mit DNA-Chiparray Technologie, mit deren Hilfe die Expression mehrerer tausend Gene simultan gemessen werden kann, wurden Robo1, Robo4 und Slit2 analysiert [74]. Für diese Untersuchungen wurde ein Affymetrix U133-A Chip mit 45 000 Testfeldern verwendet. Bei der DNA-Chiparray Analyse werden sogenannten Microarrays verwendet. Diese bestehen aus einem Chip mit mehreren tausend Testfeldern, die mit einzelsträngiger DNA bestückt sind und die Signatur eines Genes aufweisen. Auf diese Testfelder werden fluoreszenzmarkierte Patientenproben aufgetragen. Dafür wurden die aus den kryokonservierten Gewebeproben mit Mikrodisektion gewonnenen Zellen extrahiert und die mRNA der Zellen isoliert. Nach Transkription in cDNA wurden die Proben in mehreren Runden amplifiziert und fluoreszenzmarkiert. Die auf den Chip aufgebrauchte Patientenproben-DNA bindet an die komplementären Basen der Testfelder-DNA. Die Intensität, Wellenlänge und Position des Fluoreszenz Signals wird mit einer hochauflösenden Kamera detektiert und Expressionswerte der einzelnen Gene des Chips können für die Patientenproben ermittelt werden

1.4.1 Chiparray Analyse von Robo1:

Robo1 konnte in 54 von 60 untersuchten Patientenproben aus kolorektalem Tumor- und Normalgewebe detektiert werden. In mehr als 47% der 30 Probenpaare war Robo1 im Tumor mehr als doppelt so hoch exprimiert, in mehr als 17% war Robo1 mehr als vierfach höher im Tumor verglichen mit dem Normalgewebe exprimiert [74]. Eine graphische Übersicht der Chip-Array Ergebnisse zeigt Abbildung 3.

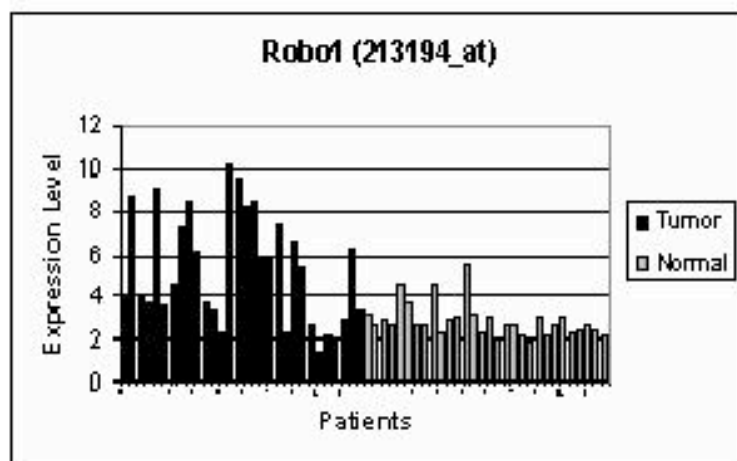


Abb. 3: Relative Expression von 30 Patientenprobenpaaren für Robo1. Für jede Patientenprobe werden die Expressionswerte für Tumor (schwarz) und Normalgewebe (grau) gezeigt [74].

1.4.2 Chiparray Analyse von Robo4:

In den Chiparray Analysen zeigte sich, dass das Probenset für Robo4 in Zweidritteln der Patientenproben nicht detektiert werden konnte (40/60). Eine Hochregulation von Robo4 im Tumorgewebe konnte nur bei einem Patienten festgestellt werden. Der Expressionswerte-Quotient von Tumor- gegenüber Normalgewebe, der Foldchange (FC), lag hier bei 2,06. Der durchschnittliche FC-Wert lag bei 1,10. Eine Downregulation für Robo4 im Tumorgewebe mit einem FC-Wert von kleiner 0,5 ließ sich ebenfalls nicht zeigen [74]. Eine graphische Übersicht der Chip-Array Ergebnisse zeigt Abbildung 4.

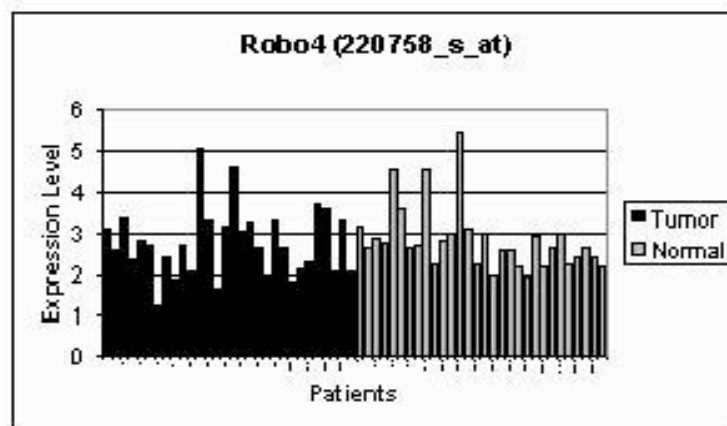


Abb. 4: Relative Expression von 30 Patientenprobenpaaren für Robo4. Für jede Patientenprobe werden die Expressionswerte für Tumor (schwarz) und Normalgewebe (grau) gezeigt [74].

1.4.3 Chiparray Analyse von Slit2:

In den Chiparray Analysen der eigenen Arbeitsgruppe zeigte sich, dass Slit2 im Tumorgewebe nicht signifikant zum Normalgewebe herunter reguliert ist. Slit2 konnte in 31 von 60 Patientenproben detektiert werden. Die durchschnittliche Expression von Slit2 im Tumorgewebe war auf demselben Niveau wie im Normalgewebe. Im Median konnte ein FC-Wert von 0,95 ermittelt werden. In keinem der 30 Patientenprobenpaaren konnte ein FC-Wert Tumor- gegenüber Normalgewebe von größer 2 ermittelt werden [74]. Eine graphische Übersicht der Chip-Array Ergebnisse zeigt Abbildung 5.

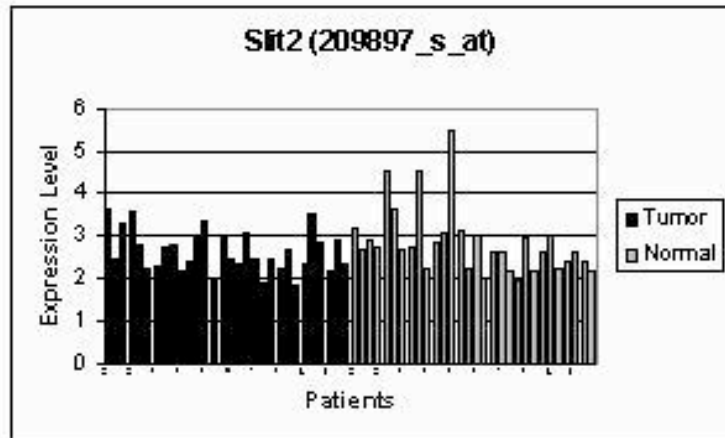


Abb. 5: Relative Expression von 30 Patientenprobenpaaren für Slit2. Für jede Patientenprobe werden die Expressionswerte für Tumor (schwarz) und Normalgewebe (grau) gezeigt [74].

2. Ziel der Arbeit

Ein wesentlicher Faktor für die Progression maligner Neoplasien, wie dem kolorektalen Karzinom, ist die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Anschluss an das körpereigene Gefäßsystem durch Neubildung von Gefäßen. Diese sogenannte Angiogenese wird durch verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt. Der Robo-Slit Signalweg stellt einen dieser Signaltransduktionswege dar. Die Unterbrechung der Signaltransduktion bei der Angiogenese stellt daher ein potentielles Ziel für eine antiproliferative Tumorthherapie dar. Robo1 und sein Ligand Slit2, sowie der Rezeptor Robo4 sind an Angiogenese-Mechanismen beteiligt und zeigten eine differentielle Gewebeexpression zwischen Tumor- und Normalgewebe von Tumoren unterschiedlicher Entitäten.

Es stellt sich nun die Frage ob Robo1, Robo4 und Slit2 auch im Gewebe des kolorektalen Karzinoms eine differentielle Gewebeexpression zeigen und damit als potentielle Zielstrukturen für eine anti-proliferative Tumorthherapie in Frage kommen.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, mittels molekularbiologischer und proteinbiochemischer Techniken:

1. Die differentielle Expression von Robo1, Robo4 und Slit2 beim kolorektale Karzinom erstmalig an einem größeren Patientenkollektiv mittels Real-Time PCR nachzuweisen und damit Vorversuche zur differentiellen Genexpression mittels DNA-Chiparray Technologie aus der eigenen Arbeitsgruppe zu validieren.
2. Die Expression von Robo1, Robo4 und Slit 2 in Gewebeschnitten in situ zu analysieren und die Zellstrukturen an denen die Genprodukte exprimiert werden mittels Immunhistochemie und In-situ Hybridisierung zu identifizieren und darzustellen.
3. Die Rolle von Robo1, Robo4 und Slit 2 als potentielle Prognosemarker und als Zielstruktur für eine antiproliferative bzw. anti-angiogenetische Therapie im Hinblick auf das kolorektale Karzinom zu bewerten.

3. Material

3.1 Lösungen und Puffer

<u>Lösungen und Puffer</u>	<u>Zusammensetzung/Herstellung</u>
DNA Loading Buffer	4 mM Bromphenol Blau + 5 mM Xylene Cyanol + 0,4 mM Ficoll® 400 in ddH ₂ O
Eosin-Färbelösung	16mM Eosin in ddH ₂ O
TBS	50 mM Trizma Base + 150 mM NaCl in ddH ₂ O bei pH 7,6
TBS-Tween	50 mM Trizma Base + 150 mM NaCl + 0, 01 % Tween 20 in ddH ₂ O bei pH 7,6
PBS-Tween	0, 58 % 200mM NaH ₂ PO ₄ H ₂ O + 1,92% 230 mM NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O + 0, 01% Tween 20 in ddH ₂ O
Hämalaun Färbelösung nach Meyer	3 mM Hämatoxylin + 10 mM Natriumiodat + 100 mM KAl(SO ₄) ₂ + 300 mM Chloralhydrat + 5 mM Zitronensäure in ddH ₂ O
20x SSC Puffer	3 M NaCl + 340 mM Natriumcitrat in ddH ₂ O
50x TAE Puffer	2 M Tris Base + 6% Essigsäure + 10% 0, 5 M EDTA bei pH 8,0 in ddH ₂ O
LB-Medium	10g Bactotryptone + 5g Bacto-Yeast Extract + 5g NaCl in 1l ddH ₂ O bei pH 7,0 autoklavieren

3.2 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Aquapoly mount	Polysciences (Warrington, USA)
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
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)
DAB	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
DMPC	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Deoxynucleotide Mix (dNTP's)	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
EDTA 0,5M	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)

Eosin	Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, D)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe, D)
Essigsäureanhydrid	Roth (Karlsruhe, D)
Ficoll	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
HCl	Roth (Karlsruhe, D)
Hot Star Taq Polymerase	Qiagen (Hilden, D)
Hybridisierungspuffer	Roche-Applied Science (Mannheim, D)
Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
LB-Agar	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
LB-Broth	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
MLV – Reverse Transkriptase	Promega (Mannheim, D)
NBT/BCIP Tablets	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumcitrat	Roth (Karlsruhe, D)
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
NaH ₂ PO ₄ 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Natriumiodat	Roth (Karlsruhe, D)
NaOH	Roth (Karlsruhe, D)
Oligo dt15 Primer	Promega (Mannheim, D)
Powerblock Immunhisto	Bio Genex (San Ramon, USA)
Prehybridization Mix Reagenz	Roche Applied Science (Mannheim, D)
Robo1, Robo4, Slit2 Primer	TIB Molbiol (Berlin, D)
Streptavidin-Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Tritirachium Album Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Tris Pufferan®	Roth (Karlsruhe, D)
Triethanolamin	Roth (Karlsruhe, D)
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Tween 20	Roth (Karlsruhe, D)
Tryptone	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)
Xylene Cyanol	Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, D)

Xylol	Roth (Karlsruhe, D)
Zitronensäure	Roth (Karlsruhe, D)

3.3 Kits

Kits	Hersteller
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Foster City, USA)
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Roche Applied Science (Mannheim, D)
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche Applied Science (Mannheim, D)
NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel (Düren, D)
pGEM® T-Easy Vector Systems	Promega (Mannheim, D)
NucleoSpin® Plasmid Purification	Macherey-Nagel (Düren, D)
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, D)

3.4 Sequenzen

Primer und Sonden	Sequenz
Beta 2 Mikroglobulin Forward	5'-CCAGCAGAGAATGGAAAG TC-3'
Beta 2 Mikroglobulin Reverse	5'-GATGCT TACATGTCTCG-3'
Robo 1 Forward	5'-GGAAATCCTCAACCAGCTAT-3'
Robo 1 Reverse	5'-CGATCTGCAATCACATCTGTAAC-3'
Robo 1 Light Cycler Sonde	5'-LC Red640-GGAAGCATCATCACAAAGGCA TATT-PH-3'
Robo1 Fluorescein Sonde	5'-ACATCTGCCAGACTT TAAATGTTGC-FL-3'
Robo 1 Plasmid Forward	5'-GCTGGTGACATGGGTTCATAG-3'
Robo 1 Plasmid Reverse	5'-CATTCTCGCTACGGTCTGC-3'
Robo 4 Forward	5'-GCTCTCCAGCCCCTGTT-3'
Robo 4 Reverse	5'-ACCAGAGCTTGGGGCAC-3'
Robo 4 Light Cycler Sonde	5'-LC Red640-CTCCAAGGAGTGGCTGCCCC-PH-3'
Robo 4 Fluorescein Sonde	5'-TTCCTAACTCACAGGCCCGGA-FL-3'
Robo 4 Plasmid Forward	5'-GGACCTGAGCAGCAGC-3'
Robo 4 Plasmid Reverse	5'-GCTGGGTCTGTTGACTCTG-3'
Slit 2 Forward	5'-CAGGACTTCCAGAAGGTGC-3'

Slit 2 Reverse	5'-TAGGAGAACGCATTGATGGG-3'
Slit 2 Light Cycler Sonde	5'-LC Red640-GACCCTTGCCTTGCCTTGGAAATA AAATGCG-PH-3'
Slit 2 Fluorescein Sonde	5'-CCCTCTGTGACCAACGGACCAA-FL-3'
Slit 2 Plasmid Forward	5'-CTTTGTCCGTGGATGGTGG-3'
Slit 2 Plasmid Reverse	5'-CCTTTCCCCTCGACAAGAG-3'

3.5 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Primärantikörper:	
Robo 1 (I-20) goat Ig-G	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Robo 4 rabbit Ig-G	Abcam (Cambridge, UK)
Slit 2 (E-20) goat Ig-G	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
CD 31 PECAM-1 (C-20) goat Ig-G	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Sekundärantikörper:	
Goat anti-rabbit biotin	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
Rabbit anti-goat biotin	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)

3.6 Geräte

Geräte	Hersteller
ABI PRISM 300 DNA Analyzer	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Bio Photometer	Eppendorf (Hamburg, D)
Eismaschine Scotsman AF10	Scotsman Ice Systems (Vernon Hills, USA)
Electrophorese Documentation and Analysis System 120	Kodak (Stuttgart, D)
Heizplatte/Magnetprüher MR3001	Heidolph (Kelheim, D)
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, D)
Heizblock ThermoStat plus	Eppendorf (Hamburg, D)
HP Deskjet 970 Cxi	Hewlett-Packard GmbH (Böblingen, D)
Kryo-Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus (Hanau, D)
Kryostat Microm HM 560	Microm (Walldorf, 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)
Mikrowelle M1727N 800W	Samsung Deutschland (Schwalbach, D)
Mikroskop Axioskop 2	Carl-Zeiss AG (Jena, D)
Mikrotom Leica RM 2125 RT	Leica Microsystems (Wetzlar, D)
pH Meter CG840	Schott AG (Mainz, D)
Pipettierboy Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Schüttler Polymax 1040	Heidolph (Kelheim, D)
Vortex Mixer Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Wasserbad GFL 1086	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, D)
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg, D)

3.7 Materialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Eppendorf Gefäße 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
E. P. Tipps Pippetierspitzen	Eppendorf Hamburg, D)
U.Vette ® Küvetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)

3.8 Software

Software	Hersteller
Microsoft Word 2003/2007/2008	Microsoft Germany (Unterschleißheim, D)
Microsoft Excel 2003/2007/2008	Microsoft Germany (Unterschleißheim, D)
Endnote Vers. 9.0-X1	Thomson ResearchSoft (Carlsbad, USA)
Relative Quantification Software V1.0	Roche Applied Sciences (Mannheim, D)
SysStat 12	Sys Stat Software (Erkrath, D)
Sigma Plot 10.0	Sys Stat Software (Erkrath, D)

4. Methoden

4.1 Patienten und Gewebeproben

4.1.1 Patienten

Das für die experimentelle Untersuchung verwendete humane Gewebe entstammt der Tumorbank der chirurgischen Klinik der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (CBF). Die Entnahme der Gewebe sowie die damit durchgeführten Untersuchungen sind von der Ethikkommission, CBF, Charité, Universitätsmedizin Berlin am 08.01.2001 genehmigt worden. Die Probeentnahme erfolgte nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten (Aufklärungs- und Studieninformationsbögen im Anhang). Aus datenschutztechnischen Gründen wurden die Gewebeproben anonymisiert. Die Patienten wurden im Zeitraum 2001 bis 2002 in der Charité Campus Benjamin Franklin in kurativer oder palliativer Absicht operiert.

4.1.2 Gewebeprobenasservierung

Unmittelbar nach der chirurgischen Resektion wurde das Präparat ex situ längs der taenia libera eröffnet und die lumenale Seite des Darmes mit Wasser gespült. Von einem Pathologen wurden jeweils Vollwand-Tumorgewebe und korrespondierendes, makroskopisch tumorfreies Gewebe (Normalepithel) entnommen. Beide Proben wurden unmittelbar postoperativ in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte in der Tumorbank der Chirurgischen Klinik stabil bei -80 °C. Des Weiteren wurden Teile der Proben für die Immunhistochemie (IHC) formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Die Zeitspanne zwischen der chirurgischen Resektion und der Lagerung in flüssigem Stickstoff betrug max. 30 min, um die Ischämie bedingte RNA-Degeneration zu minimieren. Das kolorektale Tumorgewebe wurde routinemäßig durch die Pathologen der Charité anhand von in Paraffin eingebetteten Schnitten des entsprechenden Gewebes hinsichtlich des Tumorstadiums und des Differenzierungsgrades beurteilt.

4.1.3 Makrodissektion

Von den bei -80 °C gelagerten Gewebelöcken mit Tumor- und gesundem Kolonepithel der Patienten wurden mittels Gefriermikrotom 6-8 µm dicke Schnitte erstellt. Je ein Kontrollschnitt wurde mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbt (siehe 4.4.3). Die Tumor und Normalgewebeabschnitte auf den angefertigten Präparaten wurden durch einen erfahrenen Pathologen identifiziert und die tumortragenden Gewebeabschnitte mit einem wasserfesten dünnen Filzstift markiert. Daraufhin wurden von den Gewebelöcken, je nach Tumorfläche des Präparates 10-15 Schnitte

von 20 µm Dicke angefertigt und die tumorhaltigen Gewebeabschnitte mit einem sterilen Skalpell disseziert. Diese Präparat-Dissekte wurden daraufhin unmittelbar in ein Eppendorfgesäß überführt und mit 350 µl Lyse-Puffer RA1 nach dem Protokoll des Total-RNA-Isolation Kits (NucleoSpin® RNA II) versetzt. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Lysate mit flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren und bei -80 °C konserviert. Die Verarbeitung der korrespondierenden Normalgewebeproben wurde auf die gleiche Weise durchgeführt. Von den Tumor- und Normalgewebeproben wurden alle 200 µm ein neuer 6-8 µm dicker Schnitt angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, um die Tumor- und Normalgewebeflächengrößen und Lage zu kontrollieren.

4.2 Methoden der RNA/DNA Analyse

4.2.1 Gesamt-RNA-Isolierung aus humanem Gewebe

Die Gesamt-Ribonukleinsäure (ribonucleic acid, RNA) aus den makrodissezierten Zellen wurde mit Hilfe des NucleoSpin® RNA II Total RNA Kits isoliert. Das Funktionsprinzip des Kits beruht darauf, dass RNA Moleküle der aufgeschlossenen Zellen reversibel an eine Silizium-Membran binden, von der sie nach mehreren Waschstufen mit Wasser eluiert werden. Dabei erfolgt ein Ausschluss von stark fragmentierten RNA Molekülen mit einer Länge < 200bp. Zur Eliminierung genomischer DNA wurde darüber hinaus nach Herstellerangaben eine DNase Degradierung durchgeführt. Die bei -80 °C in RA1 Puffer gelagerten konservierten Gewebeproben wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 3,5 µl Mercaptoethanol hinzugefügt und durch 30s vortexen homogenisiert. Zur Reduzierung der Viskosität und Reinigung des Zell-Lysates wurde die Mischung in die dafür vorgesehene NucleoSpin® Filtrationseinheit gegeben und für 1 min bei 11000 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Zu dem homogenisierten und filtrierten Lysat wurden nun 350 µl Ethanol (70%) zur Ausfällung der RNA zugefügt und 30s gevortext. Das Lysat wurde in die dafür vorgesehene NucleoSpin® RNA II Sammel-Säule, an der die RNA reversibel an Siliziummaterial bindet, gegeben, und 30s bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Abstand wurde verworfen. Danach wurde die auf der Säule gebundene RNA mit 350µl Membran Entsalzungspuffer (Membran Desalting Puffer – MDB), gewaschen. Die kontaminierende DNA wurde durch 15-minütige Inkubation der RNA mit DNase I bei Raumtemperatur degradiert. Zur Inaktivierung der DNase und zur Aufreinigung der Säulen erfolgten drei Waschküufe. Nach Hinzugeben von 200µl RA2 Puffer wurden die Säulen bei 8000 rpm für 30s zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugierung der Proben nach Hinzugeben von 600µl RA2 Puffer bei 8000rpm für 30s und von 250µl RA3 Puffer für 2min bei 11000 rpm. Abschließend erfolgte die

Elution der reinen Gesamt-RNA nach pipettieren von 60µl RNase-freiem Wasser in die Säulen und Zentrifugierung für 1min bei 11000rpm.

4.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur genauen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurden die Proben photometrisch gemessen. Dazu wurde die Absorption von UV Strahlen der Wellenlänge 260nm und 280nm bestimmt und die Konzentration der RNA errechnet. Bei einer Wellenlänge von 260nm beträgt der molare Extinktionskoeffizient Epsilon für RNA und einzelsträngige DNA 25 cm²/mg. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz lässt sich somit die Konzentration der RNA errechnen. Anschließend wurde durch Verdünnung mit DMPC Wasser die RNA auf 2µg pro Ansatz eingestellt.

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

4.2.3 cDNA Synthese

Die isolierte Gesamt-RNA wurde zu weiteren Untersuchungen für die Real-Time PCR Analyse in komplementäre DNA (complementary desoxyribonucleic acid, cDNA) umgeschrieben. Für die Reverse-Transkription von RNA in doppelsträngige cDNA, wurde eine Reverse-Transkriptase, eine RNA abhängige DNA-Polymerase, verwendet. Die benutzte Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse-Transkriptase (M-MLV-RT) hat eine besonders niedrige RNase H Aktivität und damit eine hohe Syntheseleistung. Für die cDNA Synthese wurden pro Ansatz 2µg isolierter RNA entsprechend der photometrisch bestimmten Konzentration gelöst in DMPC Wasser pipettiert. Danach wurden 1µl Oligo dT's, 1µl dNTP's (10mM) hinzugefügt und der Ansatz auf 18µl mit DMPC Wasser aufgefüllt. Zur Aufspaltung sekundärer Strukturen innerhalb der RNA Probe wurde der Ansatz bei 65° C für 5 min inkubiert. Dann wurde der Ansatz kurz für 5s bei 8000 rpm zentrifugiert und sofort auf Eis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Nachfolgend wurden 5µl 5fach M-MLV-RT Reaktionspuffer und 1µl RNase Inhibitor zum jeweiligen Ansatz hinzugefügt. Die Proben wurden für 2 min bei 37 °C inkubiert und daraufhin 1µl M-MLV Reverse-Transkriptase hinzugefügt. Nach vorsichtigem Schütteln und Vermischen wurden die Proben bei 37 °C für 1 Stunde für die cDNA Synthese inkubiert. Zum Inaktivieren des Enzyms wurden die Proben nach der Synthese für 15min bei 70° C inkubiert und dann zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

4.2.4 Herstellung einer Standard-Konzentrationsreihe für Real-Time PCR

Zur Herstellung einer Standard-Konzentrations Verdünnungsreihe für die Real-Time PCR Analyse der Ziel-Sequenzen von Robo1, Robo4, und Slit2 wurde die Zielgen Sequenz in pGEM® T-

Easy Plasmid eingebracht, kloniert, sequenziert, aufgereinigt und anschließend die Real-Time PCR für unterschiedlichen Verdünnungsstufen durchgeführt. Für $\beta 2$ Mikroglobulin als Kontroll-Sequenz wurde kommerziell erhältliche klonierte cDNA verwendet.

4.2.4.1 Amplifizierung der Zielsequenzen durch PCR

Zunächst wurde die Sequenzen von Robo1, Robo4 und Slit2 durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dafür wurde für einen 100 μ l Ansatz 2 μ l cDNA von Human umbilical vascular endothelial cells (Huvec), in denen Robo1, Robo4 und Slit2 nachgewiesen werden konnten mit 4 μ l Plasmid-Sense Primer und 4 μ l Plasmid-Anti-Sense Primer, sowie 50 μ l Ready Taq Mix und 40 μ l DMPC-Wasser versetzt. Anschließend wurde die PCR Reaktion mittels der HotStar-Taq® Polymerase durchgeführt: Nach einer Enzymaktivierungsphase von 3 min bei 93°C erfolgte in 35 Zyklen die Denaturierungsphase bei 93°C von 1 min, die Annealingphase bei 60° C von 1 min und die Elongationsphase von 1 min. Abschließend folgte die Deaktivierung des Enzyms bei 72 °C für 10 min. Die Proben wurden auf 4 °C zur weiteren Bearbeitung heruntergekühlt. Die amplifizierte DNA wurde dann in einem 1%igen DNA-Agarose Gel elektrophoretisch getrennt und die spezifischen Banden für Robo1, Robo4 und Slit2 mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

4.2.4.2 DNA Elution aus Agarosegelen

Das dissezierte Gel-Stück wurde in ein nach unten offenes, mit Glaswolle gefülltes 0,5 ml Eppendorfgefäß eingesetzt. Dieses wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß eingesetzt und in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren um die Agarosestruktur aufzulösen. Nach Wiederauftauen bei RT erfolgte das zweimalige Zentrifugieren der Probe bei 9000 rpm für 5 min und abpipettieren des sich pro Zentrifugationsrunde gesammelten Lysats in ein Eppendorfgefäß, welches zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert wurde. Zur Extraktion der Proteine wurde 1 Vol Phenol und Chloroform-Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 49:1) zur Probe hinzugefügt, stark gevortext und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die dabei entstehende obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Phenol Entfernung wurde nun 1 Vol CHCl_3 zur Probe hinzugefügt, stark gevortext und 5 min bei 13000 rpm bei RT zentrifugiert. Die dabei entstehende obere Phase wurde wieder in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur DNA Ausfällung wurde dann 2,5 Vol Ethanol (100%) und 0,1 Vol Natriumacetat (5 mM) hinzugefügt, stark gevortext und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Proben bei RT wiederaufgetaut und für 10 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Darauf folgte das Waschen des DNA Pellets mit 500 μ l Ethanol (70%) durch 2-4maliges invertieren

des Eppendorfgesäßes, das Zentrifugieren der Probe für 5 min bei 13000 rpm und das Verwerfen des Überstandes. Anschließend wurde das DNA-Pellet bei RT 3 min getrocknet, in 20 µl dd-H₂O resuspendiert und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Doppelstrang DNA Konzentration in Lösung wurde photometrisch bei $\lambda = 260$ nm gemessen und die Proben bei -20 °C konserviert.

4.2.4.3 Ligation von Nukleotidsequenzen in den Klonierungsvektor

Für Ligation der amplifizierten Robo1, Robo4 und Slit2 DNA Produkte in den Vektor pGEM®-T Easy wurden für einen 10 µl Ansatz 5 µl 2x Rapid Ligationspuffer T4 DNA Ligase, 1 µl pGEM®-T Easy (50ng/µl), 1 µl Robo1, bzw. Robo4, bzw. Slit2 Produkt (50 ng/µl), sowie 1 µl T4 DNA Ligase Enzym in ein Eppendorfgesäß gegeben und mit dd H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Für die Positiv-Kontrolle wurde anstatt des Genproduktes 2 µl Kontroll-DNA verwendet. Für die Hintergrund Kontrolle wurde auf die DNA Zugabe verzichtet. Die Reaktionskomponenten wurden durch auf – und abpipettieren vermischt und für 16 h bei 4°C inkubiert.

4.2.4.4 Transformation von JM109 Zellen

Nach kurzem herunter zentrifugieren des Ligationsansatzes wurden 50 µl JM109 Zellsuspension hinzugefügt, die vorher auf Eis aufgetaut wurden. Zur Kontrolle der Transformationseffektivität wurden 0,1 ng ungeschnittenes Plasmid in ein Eppendorfgesäß gegeben und mit 100 µl JM109 Zellsuspension versetzt. Die Reaktionskomponenten wurden vorsichtig durch pipettieren gemischt und für 20 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben für 40-50s auf 42 °C erhitzt und danach 2 min auf Eis gelagert. Es erfolgte die Inkubation der Proben mit auf Raumtemperatur angeglichenes LB-Medium bei 37°C auf einem Schüttler mit 150 rpm für 1,5 h. Anschließend wurden 100 µl der Transformationskulturen auf Ampicillin-Agarplatten mit einem sterilen Drygalski Spatel ausplattiert und 16h bei 37°C inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze geerntet, mit 3 ml LB-Medium in ein 15 ml Falcongefäß überführt und für 16 h auf einem Schüttler bei 150 rpm inkubiert und anschließend bei 4 °C konserviert.

4.2.4.5 Plasmidaufreinigung

Zur Freisetzung der Plasmid-DNA aus den E. coli Zellen wurde das NucleoSpin® Plasmid Purification Kit benutzt. 2 ml der Zellsuspension aus dem Falcongefäß wurden in ein Eppendorfgesäß überführt und 30s bei 13000 rpm bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Lyse der Zellen wurden 250 µl A1 Puffer hinzugefügt und durch Vortexen resuspendiert. Nachfolgend wurden 250 µl A2 Puffer hinzugefügt 6-8 mal invertiert und 5 min bei RT inkubiert, 300

µl A3 Puffer hinzugefügt 6-8 mal invertiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 11000 rpm bei RT zentrifugiert. Als nächster Schritt wurde die Probe auf eine NucleoSpin® Plasmid Säule gegeben und diese bei 11000 rpm und RT für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend erfolgte das Waschen mit 500 µl AW Puffer, der auf 50°C vorgewärmt wurde und 1 min Zentrifugierung bei 11000 rpm bei RT und das Waschen der Säulenmembran mit 600 µl A4 Puffer der mit 100 % Ethanol versetzt wurde und ebenfalls 1 min Zentrifugieren bei 11000 rpm und Raumtemperatur. Zum Trocknen der Membran wurde der Durchfluss verworfen und die Säule 2 min bei 11000 rpm bei RT zentrifugiert. Abschließend zur Elution der Plasmid DNA wurde 50 µl AE Puffer auf die Säule gegeben und 1 min bei RT inkubiert und bei 11000 rpm bei RT 1 min zentrifugiert und die Proben bei -20 °C konserviert.

4.2.4.6 Plasmid Sequenzierung

Zur Kontrolle des Erfolges der Plasmid Klonierung wurden die Proben sequenziert. Nach dem Protokoll des BigDye® Terminator Vers. 1.1 Sequencing Kits wurden 1,0 µg Plasmid, 1,0 µl spezifischer Plasmid Primer (10pmol/µl), sowie 4 µl BigDye® Ready Reaction Premix in ein steriles Eppendorf Gefäß gegeben und mit DMPC H₂O auf 10 µl Reaktionsansatz aufgefüllt. Danach erfolgte die Amplifizierung des Plasmids mittels Hot Star Taq® Polymerase: Nach einem Aktivierungsschritt von 1 min bei 96 °C, erfolgte in 25 Zyklen die Denaturierungsphase von 10 s bei 96 °C, anschließend die Annealing Phase von 5 s bei 44 °C und die Elongationsphase von 4 min bei 60 °C. Nach einem Deaktivierungsschritt der Polymerase wurden die Proben auf 4 °C zur weiteren Verarbeitung herunter gekühlt. Anschließend wurden aus den Proben über Sepharose Säulen (Qiagen) die fluoreszenzmarkierten Nukleotide entfernt. Das PCR-Produkt wurde auf die Sepharose Säule mittig pipettiert. Anschließend erfolgte das Zentrifugieren von 3 min bei 2700 rpm. Die Säule wurde in ein neues steriles Eppendorfgefäß überführt und 7 min bei 35 °C zentrifugiert. Anschließend wurden 20 µl Big Dye® Sequencing Puffer auf die Säule gegeben und das Eppendorfgefäß bei 96 °C im Thermoblock inkubiert. Nach kurzem herunter zentrifugieren wurde das Zentrifugat in die Sequenziergefäße überführt, mit einem Gummistopfen verschlossen und in dem ABI PRISM 300 DNA Analyzer sequenziert. Die ermittelte Sequenz der spezifischen Plasmide wurde mit dem „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) über das Webinterface <http://www.nih.go.jp/Mypet/blast/> mit den Gensequenzen der entsprechenden Gene aus Datenbanken auf ihre Authentizität überprüft.

4.3.5 Real-Time PCR

4.3.1 Allgemeines

Die Real-Time PCR ist eine automatisierte PCR Reaktion, die mit der Hybridisierungssonden-technik mit dem Lightcycler® System durchgeführt wird. Während der automatischen PCR Reaktion wird simultan das spezifische Produkt amplifiziert und in jedem Zyklus quantifiziert. Das Prinzip der Quantifizierung besteht aus der Messung eines Fluoreszenzsignals. Die für die Real-Time PCR verwendeten sequenzspezifischen Sonden sind fluoreszenzmarkiert. Das Messprinzip der dualen Hybridisierungssonden wird als Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) bezeichnet. Dabei wird die Energie von einem Donor-Fluorophon (Fluorescein) auf ein Akzeptor-Fluorophon (LightCycler® Red640) übertragen. Die Hybridisierungssonden werden so entwickelt, dass die Fluorophore der Sonden nur 1-5 Nukleotide entfernt von einander an die Zielsequenz binden, da die Intensität des FRET-Signals mit der 6. Potenz des Abstandes beider Fluorophore r abnimmt. Die Farbstoffe werden durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt, welcher über fiberoptische Fasern zu jeder Probe geleitet wird. Die emittierte Fluoreszenz wird dann durch die Fiberoptik zurück in eine CCD-Kamera (Charge-coupled Device) geleitet. Diese Kamera misst in der exponentiellen Phase der PCR alle 2-3 Sekunden die Emissionen in einem Bereich zwischen 520 und 640nm (Abb.6).

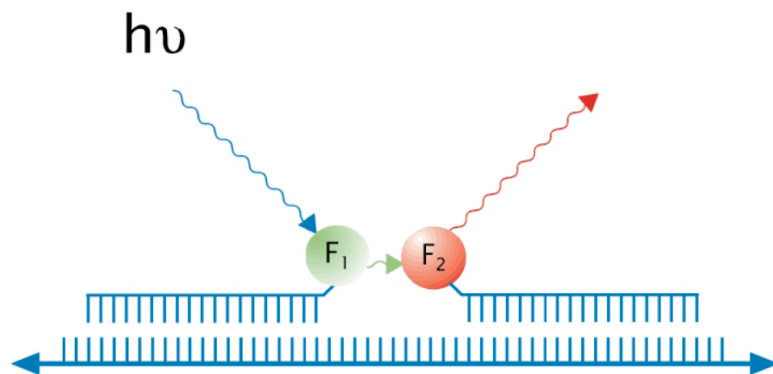


Abb.6: $h\nu$ LED-Licht; F1 Fluorescein ; F2 LightCycler®Red640 (LightCycler 2.0 Users Manual)

Die steigenden Fluoreszenzemissionen während der Quantifizierung zeigen die steigenden Mengen der DNA Amplifizierung an. Die Auswertung der Daten liefert eine logarithmische Funktion, in der das Fluoreszenzniveau bzw. die Menge des amplifizierten PCR Produktes gegen die Zyklenzahl aufgetragen wird. Der C_p -Wert (Crossing Point) ist die Zyklenanzahl, ab der die Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert überschreitet, der gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöht ist.

Bei starker Gewebeexpression eines Gens liegen entsprechend viele cDNA Kopien bei Reaktionsbeginn vor, der Schwellenwert wird nach wenigen Zyklen überschritten und es ergibt sich ein niedriger Cp-Wert. Bei geringer Expression resultiert dementsprechend ein hoher Cp-Wert. Der Cp-Wert dient demnach zur Quantifizierung der Ausgangskonzentration.

4.3.2 Standardisierungen und Qualitätskontrolle Real-Time PCR

Für die absolute Quantifizierung der Menge an cDNA Kopien und die relative Vergleichbarkeit der einzelnen Gene untereinander wurden zunächst die Cp-Werte für Standardverdünnungsreihen der klonierten spezifischen Plasmide (siehe Kapitel 4.2) für Robo1, Robo4 und Slit2 durch Real-Time PCR ermittelt. Dies erfolgte in 9 Konzentrationsstufen von 1:1 Verdünnung aufsteigend bis zu einer Verdünnung von $1:1 \times 10^9$. Um die Qualität der eingesetzten cDNA Patientenproben zu kontrollieren und eventuelle Qualitätsunterschiede bei der Datenauswertung zu relativieren wurde bei der Durchführung der Real-Time PCR Reaktion die Expression eines ubiquitär homogen exprimierten Gens, eines Housekeeping-Gens, für jede Patientenprobe mitgetestet. Als Housekeeping-Gen wurde $\beta 2$ - Mikroglobulin genutzt. Als Normalisierungsstandard und Positivkontrolle wurden die Expressionen von Robo1, Robo4 und Slit 2 außerdem an Huvec cDNA Probenmaterial untersucht.

4.3.3 Real-Time PCR Reaktionsansatz

Für die Reaktion wurden in einen 20 μ l Ansatz für 2 μ l cDNA Untersuchungsmaterial 5,4 μ l 2mM MgCl₂, 0,8 μ l d NTP's, jeweils 1 μ l der sense und anti-sense Primer in einer Konzentration von 10pmol/ μ l, sowie jeweils 1 μ l der Fluorescin und der LightCycler®Red640 Sonden in einer Konzentration von 3pmol/ μ l, sowie 4 μ l 10x Hot Star Taq® Puffer eingesetzt und mit DMPC H₂O auf 19,5 μ l aufgefüllt. Nach kurzem Vortexen wurden abschließend 0,5 μ l Hot Star Taq® Enzym hinzugefügt und diese Mischung in die vorgekühlten Reaktionskapillaren gegeben und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die Real-Time PCR Reaktion mit dem LightCycler® System durchgeführt: Nach einer initialen Enzymaktivierungsphase von 15 min bei 95 °C, erfolgten in 45 Zyklen die Denaturierungsphase bei 95°C von 10 s, die Annealingphase bei 58° C von 30 s und die Elongationsphase von 30 s bei 72°C. Nach einer abschließenden Deaktivierungsphase von 10 min bei 72 °C wurden die Proben auf 4 °C gekühlt. Die Cp-Werte für jede Reaktion wurden mit der Second Derivative Maximum Methode und der Arithmetic Baseline Adjustment Methode der Lightcycler® Software ermittelt. Für die abschließende Analyse der Daten und die relative Quantifizierung der Ergebnisse der Real-Time PCR Reaktion wurde die Relative Quantification Software Version 1.0 benutzt.

4.3.4 Datenanalyse der Real-Time PCR Ergebnisse

Für jede Probe wurden sowohl die Zielgene Robo1, Robo4 und Slit2 als auch das β 2-Mikroglobulin doppelt bestimmt. Der Quotient aus dem Median der Cp-Werte des jeweiligen Zielgens und dem Median der Cp-Werte des humanen β 2-Mikroglobulins gab die relative Konzentrations-Ratio des Zielgens in der jeweiligen Gewebeprobe an.

$$\text{median}(\text{target}) / \text{median}(\text{referenz}) = \text{Ratio}_{\text{conc.}}$$

4.3.5 Normalisierung der PCR Ergebnisse

Bei der Verwendung von Hybridisierungs sonden zur Genexpressionsanalyse kann es zusätzlich zu den Unterschieden in der Probenqualität zu Differenzen bei der Bestimmung des Schwellenwertes für Zielgen und Referenzgen kommen. Dies kann bedingt sein, durch variable Effektivität des Annealings der Proben, durch variable Quantenausbeute des Farbstoffes (bei multiplen Chargen), sowie durch probenbedingte unterschiedliche Effektivität des FRET. Um diese Unterschiede auszugleichen wurden die PCR Ergebnisse durch Mitbestimmung eines einheitlichen Kallibrators, der in jedem Experiment eingesetzt wurde, normalisiert. Als Kallibrator wurde die revers transkribierte cDNA von einer einzelnen Charge HUVEC eingesetzt, in der alle drei Zielgene sowie das Referenzgen nachgewiesen werden konnten. Da der Kallibrator lediglich aus einer Charge entnommen wurde, konnte auf die Bestimmung eines Korrekturfaktors (Correction Factor – CF) zum Ausgleich von Unterschieden bei variablen Kallibratoren verzichtet werden (CF = 1). Der Quotient aus dem Verhältnis des Medians Zielgen/Referenzgen der Probe und des Medians aus dem Verhältnis Zielgen/Referenzgen des Kallibrators stellt die normalisierte relative Konzentrations-Ratio (N-Ratio) des Zielgens in der jeweiligen Gewebeprobe dar.

$$\frac{\text{median}(\text{target}) / \text{median}(\text{referenz})}{\text{median}(\text{target}_{\text{calib}}) / \text{median}(\text{referenz}_{\text{calib}})} \times \frac{1}{CF} = N - \text{Ratio}$$

4.3.6 Bewertungskriterien der PCR

Eine PCR in der exponentiellen Wachstumsphase lässt sich durch folgende Formel beschreiben: $N_n = N_0 \times E^n$. N_n ist hierbei die Kopienzahl des PCR Produkts nach Zyklus n . N_0 ist die initiale Kopienzahl und E ist die Effizienz der PCR. Eine ideale Effizienz würde eine Verdopplung der DNA-Kopien pro Reaktionszyklus bedeuten; E wäre dann 2. Dieser eher abstrakte Zusammenhang gewinnt für die Lightcycler PCR eine anschauliche Bedeutung: N_n ist für den Zeitpunkt des

Schwellenwert-Zyklus für alle Reaktionsansätze unterschiedlicher Startkonzentrationen gleich. Ein gleichstarkes Fluoreszenzsignal bedeutet gleich viele DNA-Kopien. Kennt man nun für Standards bekannter Konzentration die jeweiligen Schwellenwert-Zyklen, kann die Effizienz E berechnet werden. Eine Effizienz von 2 entspricht einem Abstand der Schwellenwert-Zyklen zwischen Zehnerverdünnungen von 3,3 Zyklen. Mit der LCDA-Software kann E auch leicht aus der Standardkurve, bei der die Anzahl der Schwellenwert-Zyklen gegen den Logarithmus der Konzentrationen der Standards aufgetragen wurden, abgelesen werden. Für die Steigung s dieser Standardkurve gilt: $s = -1/\log E$. Eine Effizienz von 2 entspricht einer Steigung von $-3,3$. Da jedoch bei niedriger Konzentration eine Effizienz von 2 und damit ein linearer Anstieg der Kurve nicht zu verzeichnen ist, wurde mit Hilfe der Relative Quantification Software Standardkurven erstellt um die PCR Effizienz mathematisch zu korrigieren. Dazu wurden Proben aus klonierten Plasmiden, welche die spezifische Sequenz von Robo1, bzw. Robo4, bzw. Slit2, bzw. β -Mirkoglobulin enthielten durch 4fache Bestimmung in jeweils 6 Konzentrationsstufen analysiert. Die ermittelten C_p -Werte wurden logarithmisch gegenüber der Konzentration aufgetragen und die aus den Datenpunkten resultierende Kurve mathematisch durch 6 Koeffizienten definiert und gespeichert. Diese gespeicherten Daten für die Standardkurve der jeweiligen Zielgene und des Referenzgens wurde dann bei der Analyse jedes Experimentes automatisch von der Relative Quantification Software angewandt um die PCR Effizienz zu korrigieren. Die Berechnung der Expressionsdaten erfolgte dann letztendlich nach Korrektur durch das Verhältnis zum Referenzgen, der Normalisierung durch den Kallibrator, der Anwendung der Koeffizienten Daten und durch die Korrektur mittels eines frei gewählten Multiplikationsfaktors ($MF = 100$), der allein der Veranschaulichung der Daten dient.

4.4. Immunhistochemie

4.4.1 Allgemeines

Um die in der Real-Time PCR Analyse erhaltenen Ergebnisse auf Proteinebene zu stützen und zu verifizieren und eine Zuordnung der Zielproteine Robo1, Robo4 und Slit2 im Gewebe zu ermöglichen wurde ein immunhistochemischer Nachweis für die 3 Proteine an 25 Patientenproben, die nach dem Zufallsprinzip aus der Grundgesamtheit von 50 Patientenproben ausgewählt wurden, durchgeführt. Beim immunhistochemischen Nachweis können Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden. Es kann spezifiziert 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 für die vorliegenden Gewebeproben angewendete Labelled-Biotin-Streptavidin-Methode beruht auf der starken Affinität des Streptavidins zum Vitamin Biotin. Streptavidin ist ein Glykoprotein, welches aus vier identischen Untereinheiten besteht, die jeweils über eine Biotin-Bindungsstelle verfügen. Nachdem die Bindung eines unkonjugierten Anti-Robo1, Anti-Robo4 oder Anti-Slit2 Primär-Antikörpers an das Gewebsantigen erfolgt ist, wird eine Inkubation mit einem biotinylierten Sekundär-Antikörper vorgenommen. An diesen kann nun im 3. Schritt ein enzymmarkierter Streptavidinkomplex anbinden. Ein zugegebenes Substrat wird oxidiert und somit lichtmikroskopisch sichtbar. Zusätzlich erfolgte das Anfärben der jeweiligen Gewebeproben mit dem Antikörper für das Protein CD 31 als positive Qualitätskontrolle. CD 31, auch bekannt als PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1), ist ein integrales Membran Protein der Immunglobulin Superfamilie, welches an der Herstellung von Zell-Zell Kontakten beteiligt ist und welches regelhaft auf Gefäßendothelzellen zu finden ist und damit ein Markerprotein für Angiogenese Aktivität im Gewebe darstellt.

4.4.2 Gewebeschnitte

Die immunhistochemische Analyse für Robo1, Robo4 und Slit2 wurde an in Formalin fixierten und paraffinisierten Gewebeproben durchgeführt. Am Rotationsmikrotom wurde dafür 3µm dicke Schnitte angefertigt. Zur Behandlung der Objektträger, wurden 5g Gelatine in 1l destilliertem Wasser bei 37°C gelöst. Nach Erhitzen der Lösung auf 42 °C, wurden 0,5g Chromium III Kaliumsulfat Dodecahydrate (98%) hinzugefügt. Nach etwa 4h Abkühlung auf RT wurde der Ansatz filtriert. Die Objektträger wurden für jeweils 5min in die Lösung getaucht und anschließend für 24h bei 37°C getrocknet.

4.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung ist eine histologische Routinefärbung, die auf alle angefertigten Schnitte angewendet wurde. Das Hämatoxylin färbt die Zellkernstrukturen blau, das Eosin dient als Gegenfärbung und kontrastiert das Zytoplasma rot. Zunächst wurden die Schnitte 2 mal 5 min in Xylol entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte jeweils 2 min in 100%, 96% und 70% Ethanol getaucht. Nach Waschen mit dd H₂O wurden die Schnitte für 6 min in Hämatoxylin getaucht um die Zellkerne anzufärben. Als nächstes erfolgte das Wässern der Schnitte unter fließendem dd H₂O zur Entfernung von überschüssigen Farbpartikeln für ca. 5 min. Dann wurden die Schnitte in 0,1% Eosin für ca. 3-5 min gegengefärbt um die restlichen Zellstrukturen darzustellen. Es erfolgte dann die Rehydrierung der Schnitte mit dd H₂O und die anschließende Spülung der Schnitte mit 70%, 96% und 100% Ethanol für jeweils 1 min. Abschließend wurden die Gewe-

beschnitte jeweils 2 mal 5 min in Xylol fixiert eingedeckt.

4.4.4 Immunhistochemische Färbung

Die Schnitte wurden 3 mal 5 min in Xylol entparaffinisiert. Anschließend wurden die Schnitte jeweils 1 min mit 70%, 96% und 100% Ethanol dehydriert und 5 min in destilliertem Wasser rehydriert. Nachfolgend wurden die Schnitte mit 0,01% EDTA pH 8 in der Mikrowelle für 5 min bei 800 W erhitzt, gefolgt von 5 min bei 200 W. Nach einer Abkühlphase von 25 min erfolgte die Unterdrückung der endogenen Phosphataseaktivität durch 1% H₂O₂ Lösung für 25 min. Nachdem die Gewebeschnitte für 5 min in Blocking Medium (10x) geblockt wurden, um unspezifische Antigene zu binden und eine optimale Wirkung des Antikörpers zu gewährleisten wurde der Primärantikörper appliziert. Es wurden 150 l anti-Robo1 bzw. anti-Slit2 in einer 1:100 bzw. 1:200 Verdünnung appliziert, bzw. 150 µl anti-Robo 4 in einer 1:50 Verdünnung bzw. 150 µl dd-H₂O für die Negativkontrolle und 150 µl anti-CD31 Antikörper als Positivkontrolle. Die Gewebeschnitte wurden bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nachfolgend wurden die Schnitte 3mal jeweils 5 min in PBS-Tween Lösung gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte für 20 min mit dem biotinylierten Sekundärantikörper anti-Goat bzw. anti-Rabbit behandelt. Nach wiederholtem 3maligem 5 min Waschen mit PBS-Tween Lösung wurden jeweils 150 µl Streptavidin Peroxidase dazugegeben. Es folgte das Waschen der Schnitte von 2 mal 5 min mit PBS-Tween Lösung und 1mal Waschen von 5 min mit TBS-Tween Lösung. Für die Farbentwicklung wurden die Schnitte für 5 min mit DAB behandelt und anschließend 3 mal 5 min mit TBS-Tween Lösung gewaschen und 30 sec mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt. Anschließend erfolgte die Dehydratation der Schnitte für jeweils 1 min in 70%, 96%, 100% Ethanol und Fixierung 2 mal 5 min in Xylol und Eindeckung.

4.4.5 Bewertungsskala der immunhistochemischen Färbung

Die immunhistochemische Färbung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie Charité Campus Benjamin Franklin evaluiert. Es wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen, die angefärbten Zellstrukturen und die Intensität der positiven Zellfärbung beurteilt. Dazu wurde eine Bewertungsskala erstellt: der Wert (0) entsprach keiner Färbung, (+/-) entsprach keiner eindeutigen Färbung, der Wert (+) einer schwachen Färbung, der Wert (++) einer intermediären Färbung und der Wert (+++) einer starken Färbung.

4.5 In-Situ Hybridisierung

4.5.1 Allgemeines

Die In-situ-Hybridisierung (ISH) ist eine Methode um Nukleinsäuren (RNA oder DNA) in Geweben nachzuweisen. Die in situ Hybridisierung, beruht auf der Paarung von komplementären Basen auf zwei Nukleinsäure-Einzelsträngen. Einer der beiden kommt dabei von einer künstlich hergestellten und markierten Sonde, der andere liegt im Präparat vor und soll nachgewiesen werden. Bei der von uns durchgeführten ISH wurden mit Digoxigenin (DIG) markierte Robo1 und Robo4 RNA Sonden verwendet. Diese Sonden werden mit Hilfe des DIG, welches mit Chromogen Nitroblau Tetrazolium Salz/5-bromo-4-chromo-3-indolyl Phosphat (NBT/BCIP) eine braune Farbreaktion eingeht, sichtbar gemacht.

4.5.2 Herstellung der RNA-Sonden

Die Robo4 Sequenz, sowie die Robo1 Sequenz der Nukleotide 1250 bis 1820 wurden aus Huvec Zellen als RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die Transkriptionsprodukte wurde daraufhin mittels PCR amplifiziert und wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben in pGEM® T-Easy Plasmid kloniert. Die rekombinanten Klone wurden isoliert und die Authentizität der Sequenz durch Sequenzierung bestätigt. Anschließend erfolgte die Linearisierung der Plasmid DNA mittels PstI Restriktionsendonuclease und die Purifizierung der DNA mittels Phenol/Chloroform Extraktion wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, sowie die photometrische Konzentrationsbestimmung der dd-cDNA.

4.5.3 Digoxigeninmarkierung der RNA-Sonden

Die cDNA wurde mittels DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) ® in vitro in cRNA transkribiert und Digoxigenin (DIG) markiert. Dafür wurde 1 µg purifizierte cDNA in ein steriles RNase freies Eppendorf Gefäß überführt und dieses mit DMPC H₂O auf ein Gesamtvolumen von 13 µl aufgefüllt. Das Reaktionsgefäß wurde auf Eis gelagert und 2 µl 10x NTP Labeling mixture Reagenz, 2 µl 10x Transcription Buffer Reagenz, 1 µl Protector RNase Inhibitor Reagenz, sowie 2 µl RNA Polymerase SP6 für die anti-sense cRNA bzw. 2 µl RNA Polymerase T7 für die sense cRNA hinzugefügt. Die Mixtur wurde durch mehrmaliges invertieren gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl DNase I Enzym zur Entfernung von cDNA Restbeständen hinzugefügt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 2 µl 0,2 M EDTA Lösung (pH 8,0) gestoppt. Zur Qualitätskontrolle wurden die Proben mittels Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid Färbung überprüft.

4.5.4 Qualitätskontrolle der DIG-Markierung

Für optimale und reproduzierbare Hybridisierungsresultate wurden die Quantität und die Effektivität der DIG markierten Proben getestet. Dafür wurden zunächst auf eine Nylon Membran jeweils 1 µl DIG Label RNA Proben und 1 µl Kontroll-RNA in unterschiedlichen Konzentrationslösungen (10 ng/µl, 10 pg/µl, 3 pg/µl, 1 pg/µl, 0,3 pg/µl, 0,1 pg/µl, 0,03 pg/µl, 0,01 pg/µl) aufgetragen. Die Nukleinsäuren wurden durch Erhitzen der Nylonmembran für 30 min bei 120°C fixiert. Zur farblichen Identifizierung der Nukleinsäuren auf der Membran wurde nach dem Protokoll des DIG Nucleic Detection Kits die Nylonmembran zunächst kurz in dem DIG Waschpuffer eingeweicht. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membran für 30 min in 100 ml DIG Blocking Lösung. Dafür wurde das im Kit enthaltene DIG Blocking Reagenz in 0,1 M Maleinsäurepuffer in einer Konzentration von 10% (v/v) durch Schütteln und kurzes Erhitzen in der Mikrowelle bei 800 W gelöst und die Lösung autoklaviert. Diese Grundlösung wurde zur Herstellung der DIG Blocking Lösung in einem Verhältnis von 1:10 mit 0,1 M Maleinsäurepuffer verdünnt. Nach der Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Nukleinsäuren erfolgte die Inkubation der Membran für 30 min in 20 ml DIG Antikörper-Lösung zur Bindung der antikörperkonjugierten alkalischen Phosphatase an die Nukleinsäuren. Dafür wurden 4 µl alkalische Phosphatase verbundene Anti-DIG Antikörper in einem Verhältnis von 1:5000 mit Blocking Reagenz verdünnt. Daraufhin erfolgte das Waschen der Membran für 2 mal 15 min mit DIG Waschpuffer. Anschließend wurde die Membran für 5 min in 20 ml DIG Detektionspuffer equilibriert. Abschließend wurde die Membran zur Visualisierung der Antikörper Bindungen in einem lichtundurchlässigen Container in 10 ml frisch zubereiteter Farbreagenz Lösung überführt. Für diese Lösung wurden 200 µl NBT/BCIP Reagenz in 10 ml DIG Detektionspuffer überführt. Nach einigen Minuten zeigte sich eine indigodunkelblaue Färbung der DIG markierten Proben. Anhand des Vergleichs der RNA-Proben mit den Kontroll-RNA Proben konnte so die Effektivität der DIG-Label Prozedur ermittelt werden.

4.5.5 Gewebeschnitte für In-Situ Hybridisierung

Es wurden 1 µm dicke Schnitte mit dem Rotationsmikrotom angefertigt, die auf silanbeschichtete Objektträger aufgetragen wurden und bei 37° C im Inkubator 24 h trockneten.

4.5.6 In-Situ Hybridisierung

Nun erfolgte die eigentliche In-Situ Hybridisierung nachdem modifizierten Protokoll des „non-radioactive In Situ Hybridisation Application Manual (Roche Applied Sciences). Die Gewebeschnitte wurden 16 h in Xylol entparaffiniert und nachfolgend jeweils 5 min in 70%, 96% und

100% Ethanol dehydriert. Daraufhin wurden die Schnitte zweimal 5 min in TBS Lösung gewaschen. Nachfolgend wurden die Schnitte mit 1 µg/ml RNase freie Proteinkinase K, die in 20 mM TBS (pH 7,4) versetzt mit 2 mM CaCl₂ gelöst wurde, für 30 min inkubiert um die Proteinstrukturen um die Nukleinsäuren zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte zweimal 5 min in TBS Lösung gewaschen und danach 10 min in TBS / 0,1 M Triethanolaminpuffer (pH 8,0) + 0,25% (v/v) Acet-Anhydrid Lösung inkubiert. Um Hintergrundfärbungen zu reduzieren wurden die Schnitte für 1 h bei 44 °C prähybridisiert. Dies erfolgte durch Inkubation mit Prehybridization Mix Reagenz (Roche Applied Science), welches 50% (v/v) deionisiertes Formaid enthält. Daraufhin wurden die Schnitte über Nacht für 16 h bei 45°C im Hybridisierungspuffer, welcher 5 µg/ml Digoxigenin markierte RNA enthält, inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das Waschen für 30 min mit 2x SSC Puffer, danach für 1 h mit 1x SSC Puffer, 1,5 h mit 0,5 x SSC Puffer und für 1 h mit 1 x SSC Puffer bei 53° C im Wasserbad. Danach wurden die Schnitte zweimal in 0,5 x SSC Puffer für 10 min gewaschen und anschließend zweimal für 10 min in 0,2 x SSC Puffer. Anschließend wurden die Objektträger 10 min in TBS Lösung gewaschen und mit Block Puffer, welcher 10% Kälberfötus-Serum in TBS gelöst enthält, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer 1:5000 Verdünnung von anti-DIG Fab Fragment Reagenz gelöst in Block Puffer, inkubiert. Dann wurden die Schnitte zur Farbentwicklung mit in 10 ml Aqua Destillate gelöste NBT/BCIP Tabletten behandelt und in einem lichtundurchlässigen Container für 5 min bis zu 48 h, bis zur vollen Farbentwicklung gelagert. Die Farbreaktion wurde beendet durch das Waschen der Schnitte in TBS Lösung. Abschließend wurden die Schnitte mit Aquapolymount eingedeckt.

4.5.7 Bewertungsskala der in-situ Hybridisierung

Die in-situ Hybridisierung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie Charité Campus Benjamin Franklin evaluiert. Es wurde die Farbreaktion mit spezifischen Zellstrukturen als positives Signal (positiv) bzw. bei keiner Farbreaktion als negatives Signal (negativ) bewertet. Als Kontrolle galt die Anfärbung von das Housekeeping-Gen β2-Mikroglobulin exprimierenden Strukturen als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Ein sehr schwache bzw. nicht eindeutige Anfärbung wurde mit dem Wert (+/-) beurteilt.

4.6 Statistische Methoden

Zur deskriptiven und statistischen Analyse der Daten wurde das Programm SysStat 12 und zur graphischen Darstellung das Programm SigmaPlot10.0 verwendet. Alle durch die Analyse der Relative Quantification Software gewonnenen Expressionsdaten wurden zunächst mittels des Kolmogorow-Smirnow-Tests auf Normalverteilung getestet. Zur Überprüfung wurden die Daten ebenfalls mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht. Bei nicht normalverteilten Daten wurde für die Analyse der statistischen Signifikanz der Wilcoxon-Vorzeichen Rangtest verwendet. Für die Korrelationsanalyse der Real-Time PCR Ergebnisse mit den Ergebnissen der Immunhistochemie wurde eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt. Dafür wurde die Evaluierungsskala der Immunhistochemie in Zahlenwerte transformiert: 3 (+++), 2 (++), 1 (+), 0,5 (+/-) und daraus das Verhältnis von Tumorgewebefärbungsintensität gegenüber Normalgewebefärbungsintensität kalkuliert. Die entsprechenden Werte wurden mit dem T/N Quotienten der Real-Time PCR Analyse korreliert.

5. Ergebnisse

5.1 Patienten und Gewebeprobe

Es wurden 50 Patienten mit kolorektalem Karzinom auf ihre Expression der Gene Robo1, Robo4 und Slit2 untersucht. Die Gewebeprobe wurden von zwei unabhängigen Begutachtern vor der Makrodissektion anhand eines Kryoschnittes nach HE-Färbung auf ihre Qualität untersucht. Ausschlusskriterien für die Verwendung zur Makrodissektion waren in den Tumorproben das Vorhandensein von Adenom-Gewebe, sowie zerstörte Gewebezonen (Tumornekrosen bzw. Gefrierartefakte). Die Normalgewebeprobe wurden ebenfalls auf ihre Qualität hinsichtlich Lagerungsartefakte bestimmt. Das mediane Alter der untersuchten Patienten betrug 63 Jahre. 46% der Patienten waren männlich, 54% der Patienten waren weiblich. Damit liegt der mediane Altersdurchschnitt der untersuchten Patienten im Bereich des Medians des Erkrankungsalters in Deutschland von 65,4 Jahren bei Diagnosestellung [1]. Die Verteilung der T-Kategorie im untersuchten Patientengut zeigt für 26% ein T2-Stadium, für 66% ein T3-Stadium und für 8% ein T4-Stadium.

	<u>UICC I</u>	<u>UICC II</u>	<u>UICC III</u>	<u>UICC IV</u>	<u>Gesamt</u>
Patienten	11	15	14	10	50
Alter bei Diagnose	63 (38-87)	66 (39-80)	60 (22-84)	61 (50-76)	63 (22-87)
Geschlecht					
Männlich	5	7	6	5	23
Weiblich	6	8	8	5	27
Tumorlokalisation					
Kolon	2	10	6	5	23
Rektum	9	5	8	5	27
T-Kategorie					
T2	11	0	2	0	13
T3	0	5	11	7	33
T4	0	0	1	3	4
Grading					
G2	9	6	6	3	24
G3	2	9	8	7	26

Tab. 8 : Tabellarische Übersicht der Patienten nach UICC Stadieneinteilung im Hinblick auf Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation, T-Kategorie und Tumor Grading

5.2 Ergebnisse der Real-Time PCR

5.3.1 Ergebnisse der Expression von Robo1 auf RNA/DNA-Ebene

Die mit dem LightCycler® gemessenen und kalkulierten relativen Expressionswerte für Robo1 lagen für die Tumorgewebeproben zwischen minimal 3,24 und maximal 209,0. Das arithmetische Mittel lag bei 40,92; der Median lag bei 25,6 (Standardabweichung 41,49). Die Werte für die Normalgewebeproben lagen zwischen minimal 1,5 und maximal 43,1. Der Mittelwert lag bei 11,3; der Median lag bei 9,8 (Standardabweichung 8,69). Für das Verhältnis Tumor gegenüber Normalgewebe (T/N) ergaben sich ein Minimum von 0,21 und ein Maximum von 45,55. Der Mittelwert betrug 5,82; der Median betrug 8,44. Insgesamt zeigte Robo1 in 78% (39/50) eine Überexpression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe. In 42% der Patienten (21/50) konnte eine 4fache Überexpression von Robo1 im Tumorgewebe demonstriert werden, in 14% der Tumorgewebeproben sogar eine 12fach höhere Expression mit einem Maximum einer 45fach höheren Expression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe. Tumor- und Normalgewebeproben waren nach dem Kolmogorow-Sminnow-Test nicht normalverteilt. Der daraufhin angewandte nicht-parametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für zwei Variablen zeigte ein Signifikanzniveau von $p < 0,00001$. Die Ergebnisse sind in der Anhang-Tabelle 1 genau aufgeführt. Die Analyse der Expressionsverhältnisse von Tumor- gegenüber Normalgewebe (T/N) in Relation zu den UICC Stadien ergab für Robo1 im UICC Stadium I ein Mittelwert von 4,08 und ein Median von 2,95. Im UICC Stadium II ergab sich ein Mittelwert von 6,63 und ein Median von 3,46. Der Mittelwert bzw. Median für UICC III betrug 5,75 bzw. 3,57. Der Mittelwert bzw. Median für UICC IV betrug 6,15 bzw. 3,23. Eine Analyse und Zusammenfassung der nichtmetastatische UICC-Stadien I und II ergab ein Mittelwert bzw. Median von 5,40 und 3,07. Für die metastatischen Stadien UICC III und IV ergaben sich Mittelwert bzw. Median von 5,94 und 3,23. Die statistische Analyse mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen UICC Stadien bzw. zwischen UICC I-II und UICC III-IV. Die N-Ratio Werte im Verhältnis Tumor- gegenüber Normalgewebe für Robo1 sind in Abbildung 7 graphisch dargestellt.

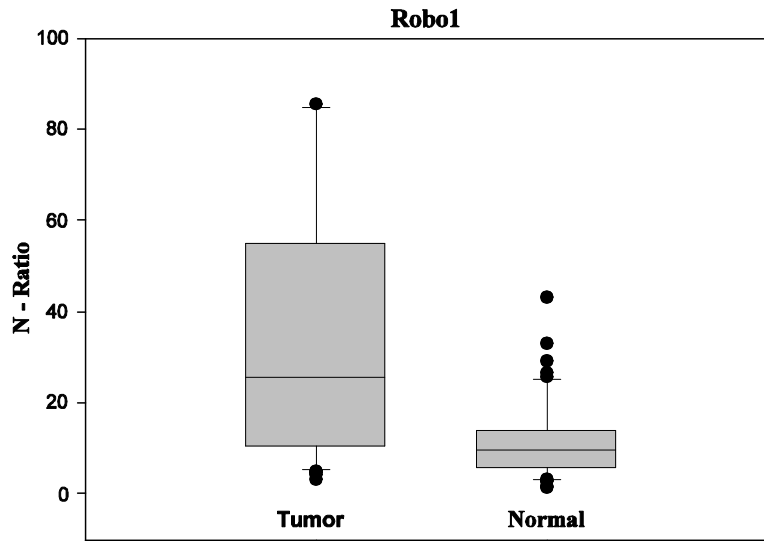


Abbildung 7: Graphische Darstellung der N-Ratio Werte von Robo1, die durch Real-Time PCR ermittelt wurden. Der Boxplot zeigt Median, oberes und unteres Quartil, sowie Minimum und Maximum der Tumor- und Normalgewebeproben.

5.3.2 Ergebnisse der Expression von Robo4 auf RNA/DNA-Ebene

Die mit dem LightCycler® gemessenen und kalkulierten relativen Expressionswerte für Robo4 lagen für die Tumorgewebeproben zwischen 0,06 und 2,1. Der Mittelwert lag bei 0,58; der Median lag bei 0,43 (Standardabweichung 0,499). Die Werte für die Normalgewebeproben lagen zwischen 0,05 und 1,35. Das arithmetische Mittel lag bei 0,32; der Median lag bei 0,22 (Standardabweichung 0,252). Für das Verhältnis Tumor gegenüber Normalgewebe (T/N) ergaben sich ein Minimum von 0,22 und ein Maximum von 18,26. Der Mittelwert betrug 2,67; der Median betrug 1,78. Insgesamt zeigte Robo4 in 72% (36/50) eine Überexpression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe. In 44% der Patienten (22/50) konnte eine 2 fache Überexpression von Robo1 im Tumorgewebe demonstriert werden, in 16% der Tumorgewebeproben eine 4fach höhere Expression mit einem Maximum einer 18fach höheren Expression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe. Tumor- und Normalgewebeproben waren nach Kolmogorow-Sminrnov-Test nicht normalverteilt. Der daraufhin angewandte nicht-parametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für zwei Variablen zeigte ein Signifikanzniveau von $p < 0,001$. Die Ergebnisse sind in der Anhang-Tabelle 2 genau aufgeführt. Bei Analyse des Expressionsverhältnisses von Tumor- gegenüber Normalgewebe (T/N) in Relation zu den UICC Stadien ergab sich für Robo4 im UICC Stadium I ein Mittelwert von 2,40 und ein Median von 1,47. Im UICC Stadium II ergab sich ein Mittelwert von 2,48 und ein Median von 1,57. Der Mittelwert bzw. Median für UICC III betrug 2,34 bzw. 1,98; der Mittelwert bzw. Median für UICC IV betrug 3,71 bzw. 2,06.

Eine Analyse und Zusammenfassung der nichtmetastatische UICC-Stadien I und II ergab ein Mittelwert bzw. Median von 2,45 und 1,77. Für die metastatischen Stadien UICC III und IV ergaben sich Mittelwert bzw. Median von 3,01 und 2,04. Die statistische Analyse mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen UICC Stadien bzw. zwischen UICC I-II und UICC III-IV. Die N-Ratio Werte im Verhältnis Tumor- gegenüber Normalgewebe für Robo4 sind in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

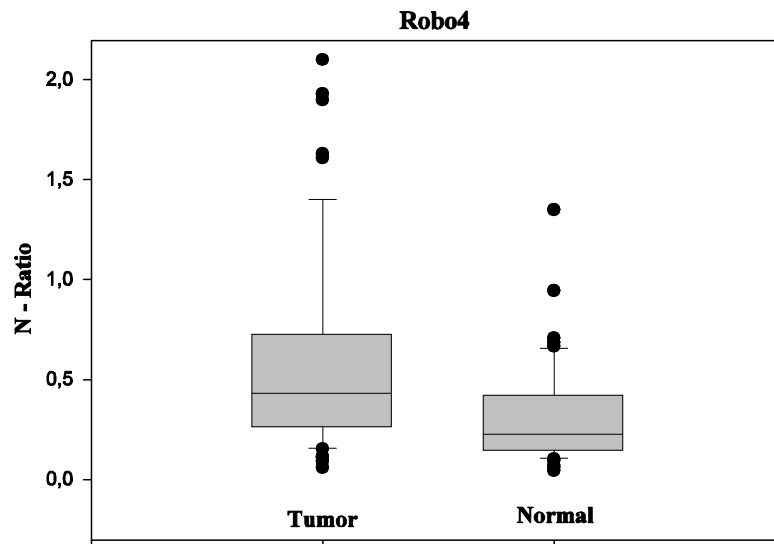


Abbildung 8: Graphische Darstellung der N-Ratio Werte von Robo4, die durch Real-Time PCR ermittelt wurden. Der Boxplot zeigt Median, oberes und unteres Quartil, sowie Minimum und Maximum der Tumor- und Normalgewebeproben.

5.3.3 Ergebnisse der Expression von Slit2 auf RNA/DNA-Ebene

Die mit dem LightCycler® gemessenen und kalkulierten relativen Expressionswerte für Slit2 lagen für die Tumorgewebeproben zwischen 0,08 und 50,1. Der Mittelwert lag bei 7,26; der Median lag bei 3,86 (Standardabweichung 10,31). Die Werte für die Normalgewebeproben lagen zwischen 0,04 und 106. Der Mittelwert lag bei 14,39; der Median lag bei 7,46 (Standardabweichung 20,71). Für das Verhältnis Tumor gegenüber Normalgewebe (T/N) ergaben sich ein Minimum von 0,02 und ein Maximum von 10,36. Der Mittelwert betrug 1,43; der Median betrug 0,62. Insgesamt konnte in 68% (34/50) eine reduzierte Expression von Slit2 im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe nachgewiesen werden. 42% der Patienten (21/50) zeigten eine 2fach herunter regulierte Expression von Slit2 im Tumorgewebe. In 32% (16/50) der Tumorgewebeproben konnte eine mäßige Überexpression von Slit2 detektiert werden. 16% (8/50) zeigten eine 2 fache Überexpression von Slit2 im Tumor- gegenüber dem Normalgewebe. Tumor- und Normalgewebeproben waren nach Kolmogorow-Sminrnrow-Test nicht normalverteilt. Der dar-

aufhin angewandte nicht-parametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für zwei Variablen für die Annahme das Slit2 im Normalgewebe überexprimiert im Vergleich zum Tumorgewebe ist, zeigte ein Signifikanzniveau von $p < 0,005$. Die Ergebnisse sind in der Anhang-Tabelle 3 genau aufgeführt. Bei Analyse des Expressionsverhältnisses von Tumor- gegenüber Normalgewebe (T/N) in Relation zu den UICC Stadien ergab sich für Slit2 im UICC Stadium I ein Mittelwert von 1,05 und ein Median von 0,53. Im UICC Stadium II ergab sich ein Mittelwert von 1,03 und ein Median von 0,62. Der Mittelwert bzw. Median für UICC III betrug 1,53 bzw. 0,41; der Mittelwert bzw. Median für UICC IV betrug 2,30 bzw. 0,99. Eine Analyse und Zusammenfassung der nichtmetastatische UICC-Stadien I und II ergab ein Mittelwert bzw. Median von 1,03 und 0,58. Für die metastatischen Stadien UICC III und IV ergaben sich Mittelwert bzw. Median von 1,89 und 0.65. Die statistische Analyse mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen UICC Stadien bzw. zwischen UICC I/II und UICC III/IV. Die N-Ratio Werte im Verhältnis Tumor- gegenüber Normalgewebe für Slit2 sind in Abbildung 9 graphisch dargestellt.

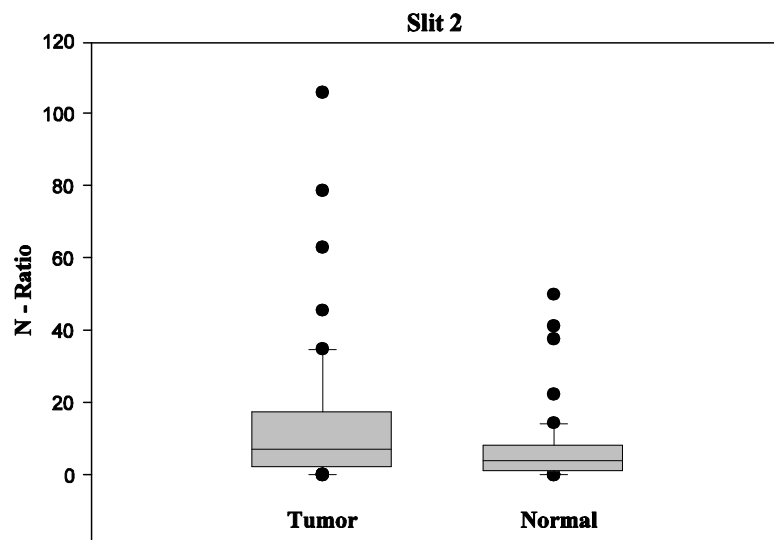


Abbildung 9: Graphische Darstellung der N-Ratio Werte von Slit2, die durch Real-Time PCR ermittelt wurden. Der Boxplot zeigt Median, oberes und unteres Quartil, Minimum und Maximum, sowie die Ausreißer der Tumor- und Normalgewebe-proben.

5.4 Immunhistochemie

5.4.1 Immunhistochemische Ergebnisse für Robo1

Die immunhistochemische Färbung von Robo1 wurde an in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten von 25 Patienten durchgeführt. In 8 Fällen war korrespondierendes Normalgewebe nicht vorhanden. Es zeigte sich eine zytoplasmatische Färbung der normalen Mucosa sowie der Tumorepithelzellen. In allen 25 Gewebeproben ließ sich eine spezifische Färbung der Tumorepithelzellen darstellen. 10 Patientenproben zeigten eine starke Anfärbung (+++), 13 Proben zeigten eine moderate Anfärbung (++) und in 2 Proben ließ sich nur eine schwache Anfärbung (+) der Tumorepithelstrukturen zeigen. Eine spezifische Anfärbung von Gefäßendothelstrukturen ließ sich nicht darstellen. Insgesamt zeigte sich eine durchgehende Anfärbung der Tumorepithelzellen für Robo 1 (70-90%) In der immunhistochemischen Analyse der 25 Patientenproben waren in 17 Fällen sowohl Tumor- als auch Normalgewebe vorhanden. In 64 % (11/17) zeigte sich eine höhere Intensität der Färbung im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe. In 47% (8/17) zeigte sich eine vergleichbare Färbungsintensität. Eine stärkere Anfärbung des Normalgewebes im Vergleich zum Tumorgewebe zeigte sich nicht [Tabelle 9]. Die Abbildungen A und B zeigen die immunhistochemische Färbung für Robo1 im Normalepithel und Tumorgewebe. Das Normalepithel wird in Abb. A schwach in allen Bereichen der Kolonkrypten angefärbt (→). Es zeigt sich eine zytoplasmatische Anfärbung. Der Zellkern wird nicht angefärbt. Insgesamt zeigt sich ein leichtes Überwiegen der Anfärbung der oberflächlichen normalen Kolonepithelzellen. Die Epithelzellen der tiefen Krypten werden vergleichsweise schwächer angefärbt. Da Tumorepithel färbt sich in Abb. B stark an (→). Es zeigt sich ebenfalls eine Anfärbung des Zytoplasmas ohne Kernfärbung. Die Färbungsintensität ist in allen Bereichen der Tumorzellen gleich intensiv ausgeprägt.

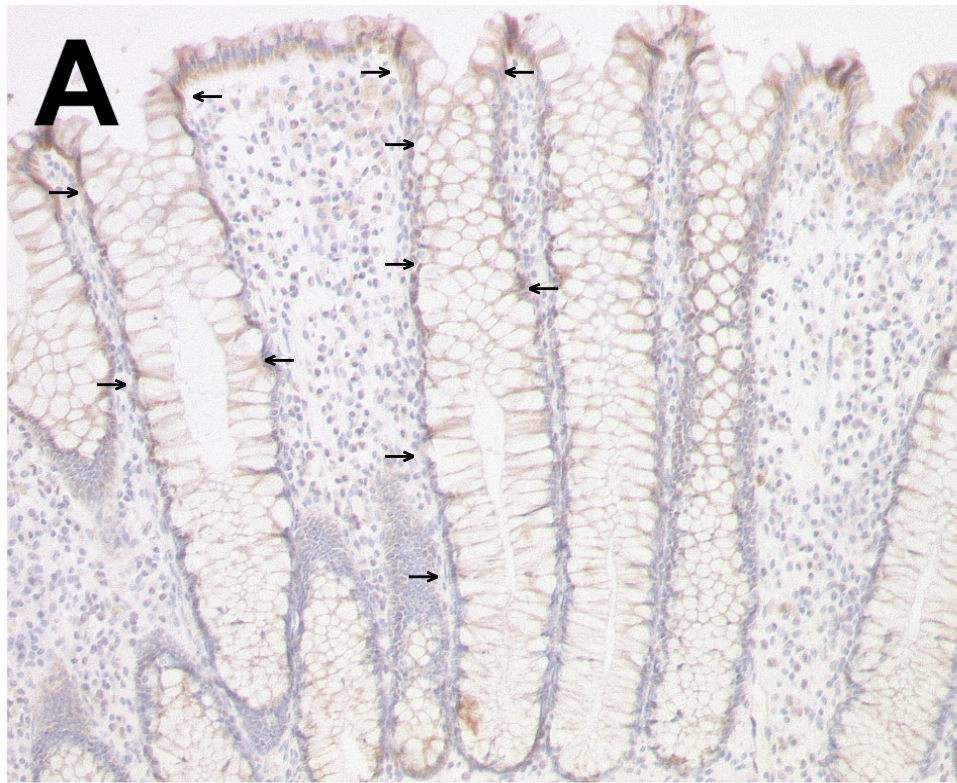


Abb. A: Immunhistochemie für Robo1: Anfärbung des normalen Kolonepithels (→) Antikörper Robo1 (I-20) Goat Ig-G. Vergrößerung 20fach. Zytoplasmatische Färbung.

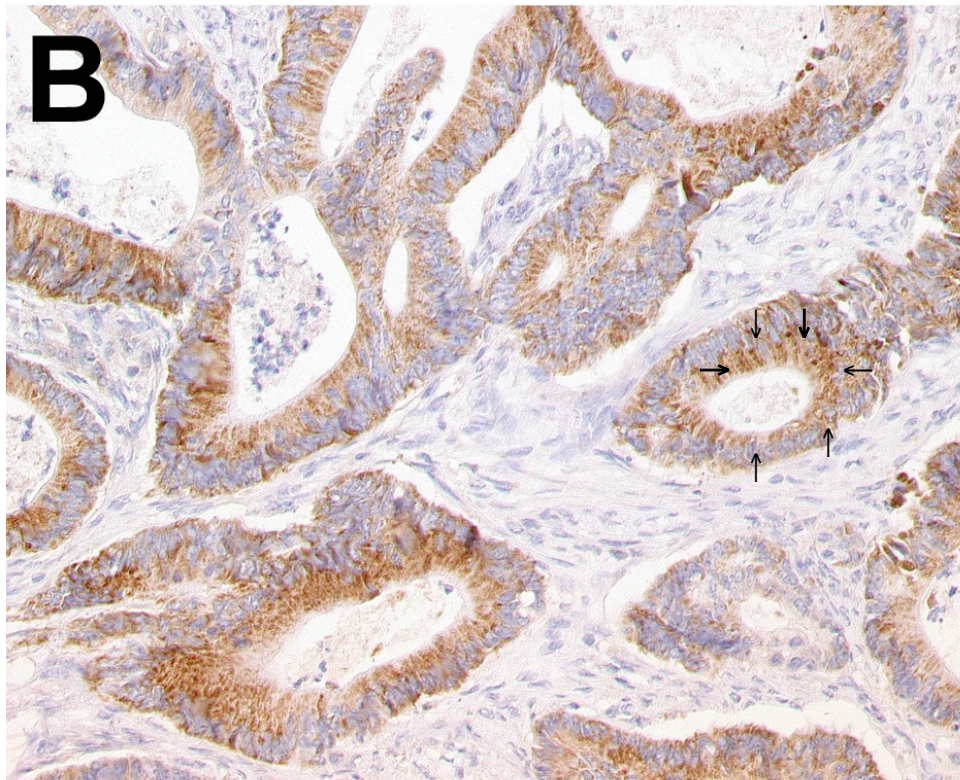


Abb. B: Immunhistochemie für Robo1: Anfärbung des Tumorepithels (→). Antikörper Robo1 (I-20) goat Ig-G. Vergrößerung 20fach. Zytoplasmatische Färbung.

Robo1-Ergebnisse Immunhistochemie

<u>Pat.-Nr.</u>	<u>UICC Stadium</u>	<u>Färbung T in %</u>	<u>Intensität T</u>	<u>Färbung N</u>	<u>Intensität N</u>	<u>CD 31</u>
1	II	90	++	positiv	+	positiv
2	II	90	+++	positiv	+	positiv
3	II	100	++	positiv	++	positiv
4	II	80	+++	positiv	++	positiv
5	III	100	++	n. v.	n. v.	positiv
6	III	100	+++	n. v.	n. v.	positiv
8	II	90	+++	n. v.	n. v.	positiv
9	IV	80	++	n. v.	n. v.	positiv
13	II	100	+++	positiv	+	positiv
17	III	100	++	n. v.	n. v.	positiv
22	II	100	++	positiv	++	positiv
23	II	90	++	positiv	++	positiv
24	II	90	++	positiv	++	positiv
25	II	100	+++	positiv	+++	positiv
26	I	70	+	n. v.	n. v.	positiv
27	II	100	+++	n. v.	n. v.	positiv
31	I	90	++	positiv	+	positiv
32	I	100	++	positiv	++	positiv
34	II	90	++	positiv	+	positiv
40	II	80	+	positiv	+	positiv
44	I	100	++	positiv	+	positiv
45	II	100	+++	positiv	+	positiv
47	IV	100	++	n. v.	n. v.	positiv
49	III	100	+++	positiv	+	positiv
50	III	90	+++	positiv	+	positiv

Tabelle 9: Tabellarische Übersicht der immunhistochemischen Anfärbung von Robo1 für 25 Patienten: die Intensität T (Tumor) bzw. Intensität N (Normal) zeigt die Werte der Evaluierungsskala starke Anfärbung (+++), moderate Anfärbung (++) , schwache Anfärbung (+), keine eindeutige Gewebefärbung (+/-) oder keine Färbung (0). Färbung N zeigt an ob im Normalgewebe eine Anfärbung stattgefunden hat (positiv/negativ) oder ob das Normalgewebe nicht vorhanden war (n. v.). CD 31 zeigt die Qualitätskontrolle.

5.4.2 Immunhistochemische Ergebnisse für Robo4

Die immunhistochemische Färbung von Robo4 wurde an in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten von 25 Patienten durchgeführt. In 8 Fällen war korrespondierendes Normalgewebe nicht vorhanden. Es zeigte sich insgesamt eine moderate bis schwache Anfärbung der Gewebeschnitte. Die normale Mucosa wurde bzw. die Tumorepithelzellen wurden durchgehend nicht angefärbt. Die durch den Robo4 Antikörper angefärbten Strukturen ließen sich als in das Tumorgewebe eingebettete Gefäßendothelien identifizieren. In 20 von 25 Gewebeproben ließ sich eine spezifische Färbung der Gefäßendothelien darstellen. 6 Patientenproben zeigten eine moderate

Anfärbung (++) , 14 Proben zeigten eine schwache Anfärbung (+) und in 5 Proben ließ sich keine eindeutige Anfärbung (+/-) der Gefäßstrukturen zeigen [Tabelle 10]. Die Abbildungen C,D und E zeigen die immunhistochemische Färbung von Robo4. Abbildung C zeigt normales Kolonepithel. Eine Anfärbung von Gewebestrukturen lässt sich nicht erkennen. Lediglich im unteren Teil der Abbildung sind Artefakt-Färbungen zu verzeichnen. Die Abbildungen D und E zeigen Tumorgewebe. Es färben sich angeschnittene Gefäßendothelien im Tumorgewebe an (→). Es zeigt sich keine spezifische Anfärbung von Robo4 in Tumorepithelzellen.

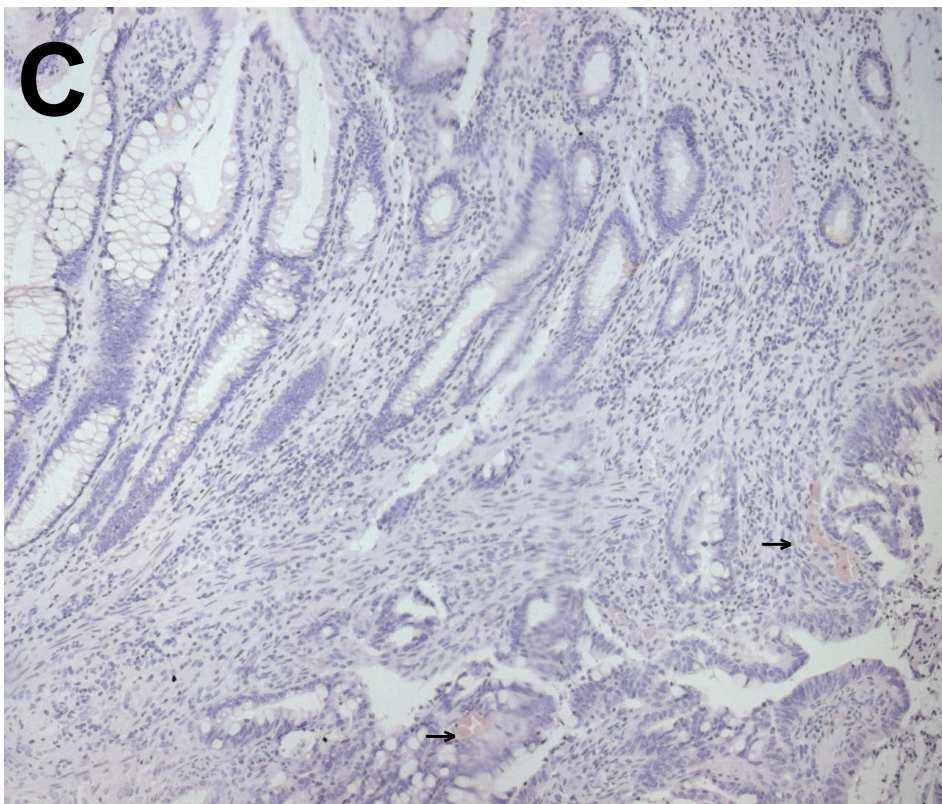


Abb. C: Immunhistochemie für Robo4 Normalgewebe. Keine Anfärbung von Normalgewebe. Es kommt lediglich zu einer geringen Artefaktfärbung (→). Antikörper Robo4 rabbit Ig-G. Vergrößerung 10fach.

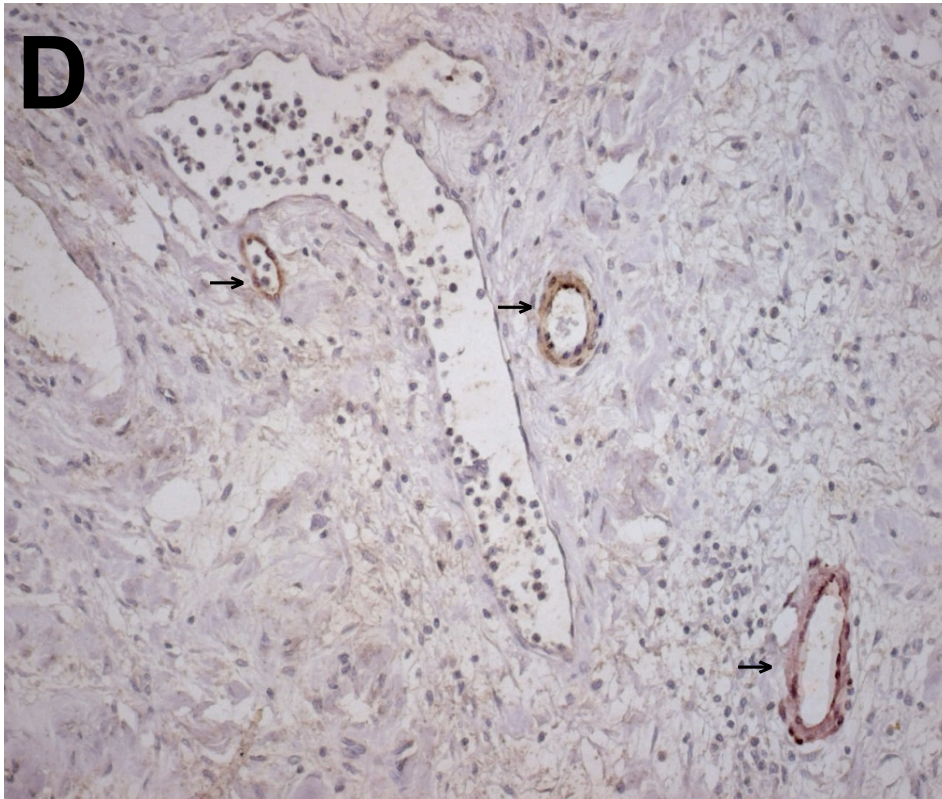


Abb. D: Immunhistochemie für Robo4. Anfärbung von Gefäßendothelien (→) im Tumorgewebe. Antikörper Robo4 rabbit Ig-G. Vergrößerung 10fach. Zytoplasmafärbung.

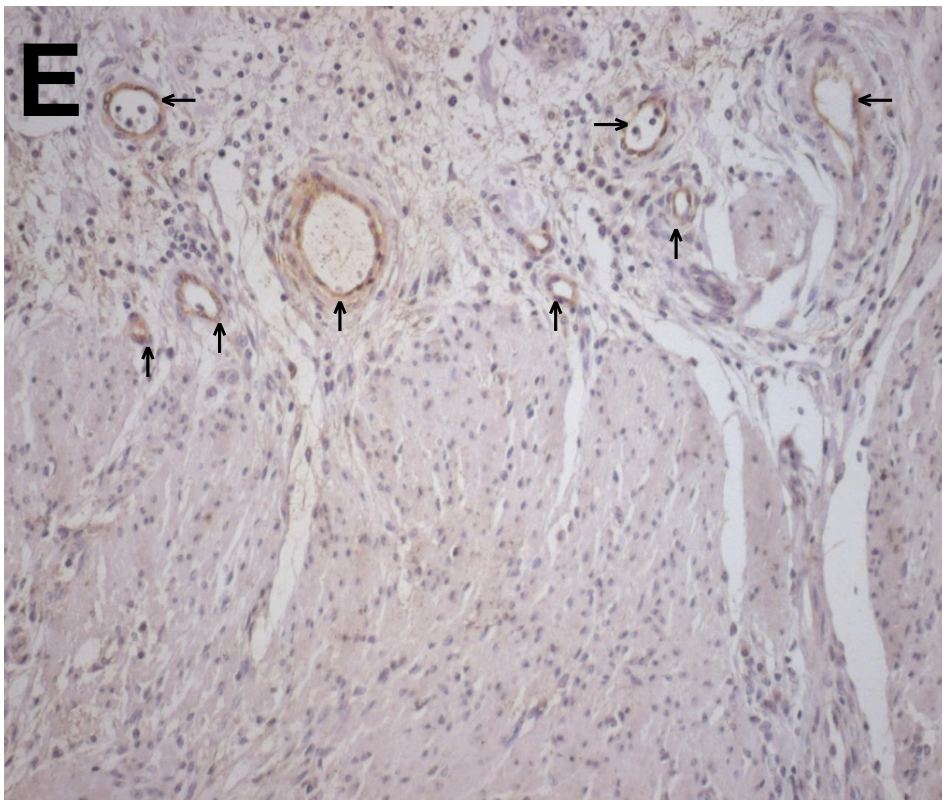


Abb. E: Immunhistochemie für Robo4. Anfärbung von Gefäßendothelien (→) im Tumorgewebe. Antikörper Robo4 rabbit Ig-G. Vergrößerung 10fach. Zytoplasmatische Anfärbung.

Robo 4-Ergebnisse Immunhistochemie

<u>Pat.-Nr.</u>	<u>UICC Stadium</u>	<u>Intensität T</u>	<u>Färbung N</u>	<u>Intensität N</u>	<u>CD 31</u>
1	II	+	negativ	0	positiv
2	II	+	negativ	0	positiv
3	II	+/-	negativ	0	positiv
4	II	+/-	positiv	+/-	positiv
5	III	+	n. v.	n. .v	positiv
6	III	+	n. v.	n. .v	positiv
8	II	+	n. v.	n. .v	positiv
9	IV	++	n. v.	n. .v	positiv
13	II	+	negativ	0	positiv
17	III	+	n. v.	n. .v	positiv
22	II	+	negativ	0	positiv
23	II	+	negativ	0	positiv
24	II	++	negativ	0	positiv
25	II	++	negativ	0	positiv
26	I	+	n. v.	n. .v	positiv
27	II	++	n. v.	n. .v	positiv
31	I	+/-	positiv	+/-	positiv
32	I	+	negativ	0	positiv
34	II	+/-	negativ	0	positiv
40	II	+	negativ	0	positiv
44	I	+/-	negativ	0	positiv
45	II	+	positiv	+	positiv
47	IV	+	n. v.	n. .v	positiv
49	III	++	negativ	0	positiv
50	III	++	positiv	+/-	positiv

Tabelle 10: Tabellarische Übersicht der immunhistochemischen Anfärbung von Robo4 für 25 Patienten: die Intensität T (Tumor) bzw. Intensität N (Normal) zeigt die Werte der Evaluierungsskala starke Anfärbung (+++), moderate Anfärbung (++) , schwache Anfärbung (+), keine eindeutige Gewebefärbung (+/-) oder keine Färbung (0). Färbung N zeigt an ob im Normalgewebe eine Anfärbung stattgefunden hat (positiv/negativ) oder ob das Normalgewebe nicht vorhanden war (n. v.). CD 31 zeigt die Qualitätskontrolle.

5.4.3 Immunhistochemische Ergebnisse für Slit2

Die immunhistochemische Färbung von Slit2 wurde ebenfalls an in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten von 25 Patienten durchgeführt. In 8 Fällen war korrespondierendes Normalgewebe nicht vorhanden. Es zeigte sich insgesamt eine moderate bis starke Anfärbung der Gewebeschnitte. Die normale Mucosa bzw. die Tumorepithelzellen wurden durchgehend angefärbt. Es ließ sich kein spezifischer Unterschied in der Färbungsintensität zwischen Tumor- und Normalgewebe erkennen [Tabelle 11]. Die Abbildungen F und G zeigen die immunhistochemische Anfärbung von Slit2 im Gewebe. Es lässt sich keine spezifische Färbung erkennen. Die Kolonepithelien des Normalgewebes in Abbildung F sind moderat angefärbt. Die Tumorepithelien in Abbildung G sind ebenfalls unspezifisch moderat angefärbt. Eine spezielle Anfärbung von Gefäßendothelien lässt sich nicht erkennen.

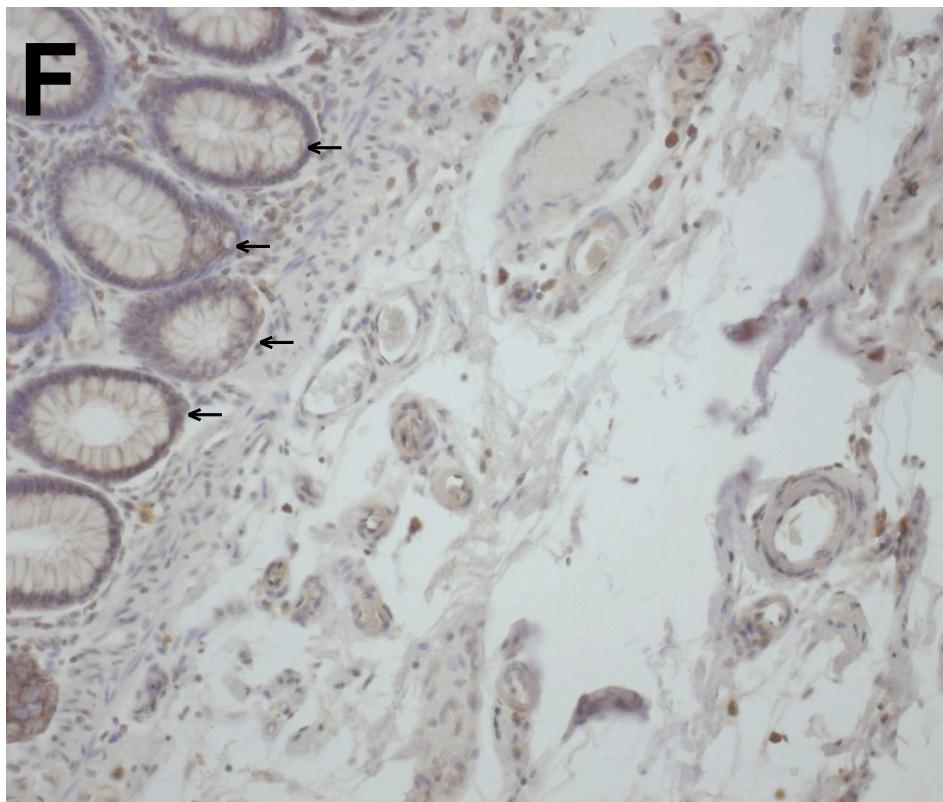


Abb. F : Immunhistochemie für Slit2 : Anfärbung von Normalgewebeepithel (→). Antikörper Slit2 (E-20) goat Ig-G. Vergrößerung 20fach. Zytoplasmatische Anfärbung.

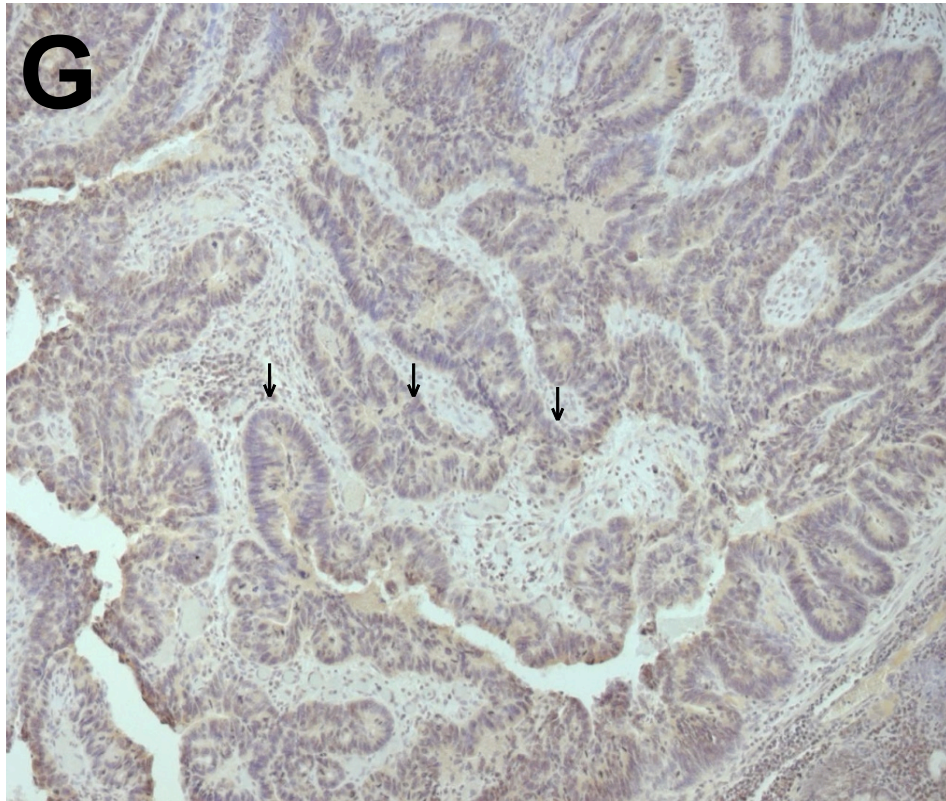


Abb. F : Immunhistochemie für Slit2 : Anfärbung von Tumorepithel (→). Antikörper Slit2 (E-20) goat Ig-G. Vergrößerung 10fach. Anfärbung des Tumorepithelzytoplasmas.

Slit 2-Ergebnisse Immunhistochemie

<u>Pat.-Nr.</u>	<u>UICC Stadium</u>	<u>Färbung T in %</u>	<u>Intensität T</u>	<u>Färbung N</u>	<u>Intensität N</u>	<u>CD 31</u>
1	II	100	++	positiv	++	positiv
2	II	100	++	positiv	+	positiv
3	II	100	++	positiv	++	positiv
4	II	80	+++	positiv	+++	positiv
5	III	100	++	n. v.	n. .v	positiv
6	III	100	++	n. v.	n. .v	positiv
8	II	90	++	n. v.	n. .v	positiv
9	IV	90	++	n. v.	n. .v	positiv
13	II	100	+++	positiv	++	positiv
17	III	100	++	n. v.	n. .v	positiv
22	II	100	++	positiv	++	positiv
23	II	90	++	positiv	+++	positiv
24	II	90	++	positiv	++	positiv
25	II	100	+++	positiv	+++	positiv
26	I	70	+	n. v.	n. .v	positiv
27	II	100	++	n. v.	n. .v	positiv
31	I	90	+	positiv	+	positiv
32	I	100	+	positiv	++	positiv
34	II	100	++	positiv	+++	positiv
40	II	90	+	positiv	+	positiv
44	I	100	++	positiv	++	positiv
45	II	100	++	positiv	++	positiv
47	IV	100	++	n. v.	n. .v	positiv
49	III	100	+	positiv	+	positiv
50	III	80	++	positiv	++	positiv

Tabelle 11: Tabellarische Übersicht der immunhistochemischen Anfärbung von Slit2 für 25 Patienten: die Intensität T (Tumor) bzw. Intensität N (Normal) zeigt die Werte der Evaluierungsskala starke Anfärbung (+++), moderate Anfärbung (++), schwache Anfärbung (+), keine eindeutige Gewebefärbung (+/-) oder keine Färbung (0). Färbung N zeigt an ob im Normalgewebe eine Anfärbung stattgefunden hat (positiv/negativ) oder ob das Normalgewebe nicht vorhanden war (n. v.). CD 31 zeigt die Qualitätskontrolle. Tabellarische Übersicht der immunhistochemischen Anfärbung von Slit2 für 25 Patienten.

5.5 In-Situ Hybridisierung

Zur weiteren Verifizierung der Ergebnisse der Real-Time PCR und der Immunhistochemie wurde für die Zielgene Robo1 und Robo4 eine in-situ Hybridisierung durchgeführt. Da sich für Slit2 in der Real-Time PCR nicht signifikante Unterschiede in den Expressionsintensitäten zwischen Tumor- und Normalgewebe ergeben haben und die Anfärbungsintensität in der Immunhistochemie keine spezifischen Unterschiede zeigte, wurde auf die in-situ Hybridisierung für Slit2 verzichtet. Die nichtradioaktive in-situ Hybridisierung mit farbgebenden Enzymen dient als direkter Nachweis einer mRNA Aktivität des spezifischen Zielgens im Gewebe. Es wurde an 10 Patien-

tenproben aus Paraffinschnitten, die mit Digoxigenin gekoppelte mRNA für Robo1 und Robo4 hybridisiert. Die in-situ Hybridisierungsreaktion wurde an Tumor- und Normalgewebeproben der 10 Patienten durchgeführt. Evaluierungskriterien waren die positive bzw. negative Reaktion und die Zuordnung zu zellspezifischen Strukturen.

5.5.1 In-Situ Hybridisierung für Robo1

Robo1 zeigte in lediglich 6 von 10 Proben im Tumorgewebe der Paraffinschnitte ein positives Signal [Abb. H]. Im Normalgewebe ließ sich Robo1 durch in-situ Hybridisierung nicht nachweisen [Abb. I]. Das Verteilungsmuster der Hybriden im Gewebeschnitt der Tumorproben war vergleichbar mit dem Muster der Tumorepithelzellenverbände in den immunhistochemischen Schnitten. Eine Färbung von Gefäßstrukturen im Verlauf der interzellulären Bindegewebestraßen ließ sich nicht erkennen. Die Positiv-Kontrolle mit der $\beta 2$ Mikroglobulin Sonde zeigte ebenfalls in 6 von 10 Proben ein gutes positives Signal. Weitere 4 Proben zeigten ein nicht eindeutiges bzw. gar kein Signal [Tab. 12].

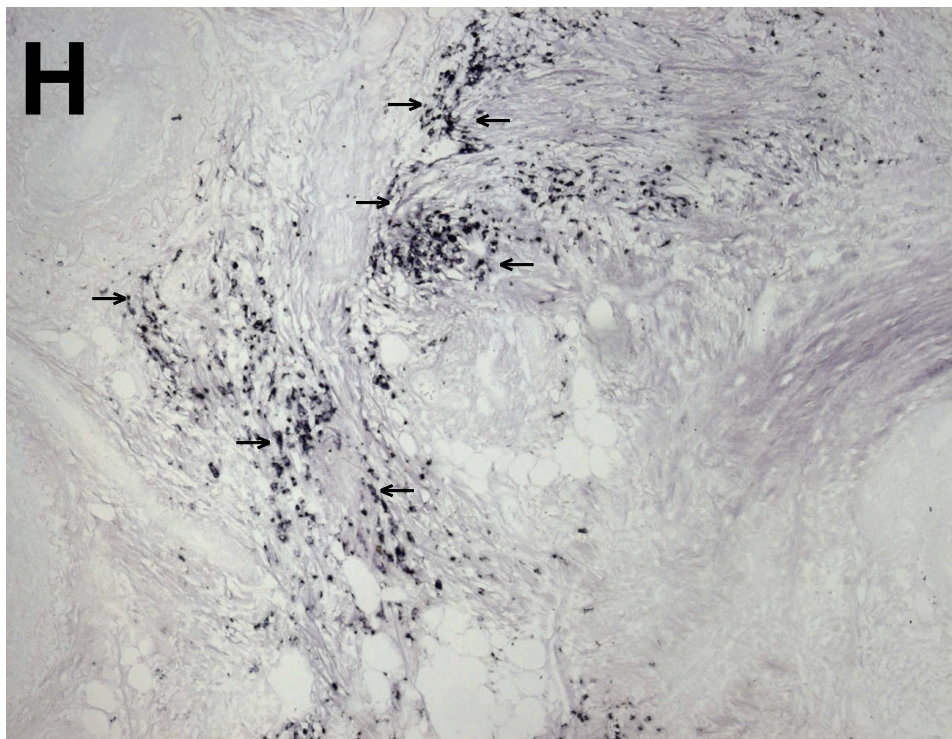


Abb. H: In-Situ Hybridisierung für Robo1: Anfärbung von Tumorepithelzellen (→). Vergrößerung 10fach.

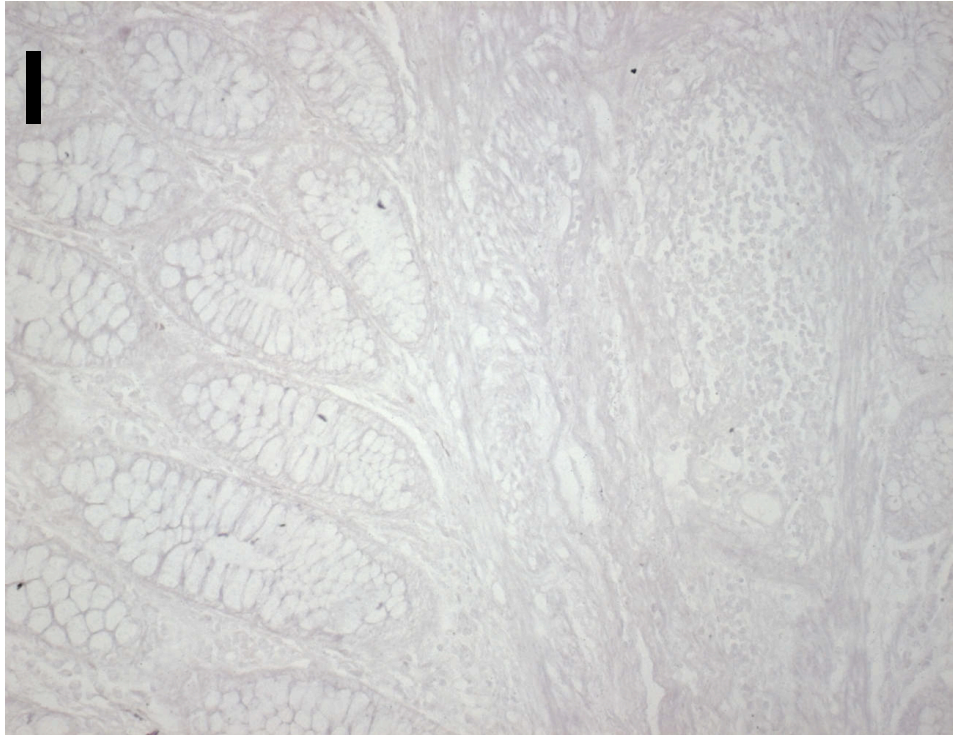


Abb. 1 : In-Situ Hybridisierung für Robo1: Normalgewebe ohne positives Signal. Vergrößerung 10fach.

Robo1-Ergebnisse In-Situ Hybridisierung

<u>Pat.-Nr.</u>	<u>Färbung T</u>	<u>Färbung Struktur</u>	<u>Färbung N</u>	<u>β2 Mikroglobulin</u>
2	positiv	Tumorepithel	negativ	positiv
4	positiv	Tumorepithel	negativ	positiv
13	positiv	Tumorepithel	negativ	positiv
24	negativ	keine	negativ	+/-
25	negativ	keine	negativ	+/-
32	positiv	Tumorepithel	negativ	positiv
44	negativ	keine	negativ	negativ
45	positiv	Tumorepithel	negativ	positiv
47	negativ	keine	negativ	+/-
49	positiv	Tumorepithel	negativ	positiv

Tab. 12: In-Situ Hybridisierung für Robo1: Färbung T bzw. N zeigt ob eine positives oder negatives Signal im Tumorgewebe (T) bzw. Normalgewebe vorliegt. β2 Mikroglobulin zeigt an ob eine positives, sehr schwaches bis nicht eindeutiges (+/-), oder kein Signal (negativ) vorliegt.

5.3.1 In-Situ Hybridisierung für Robo4

Die in-situ Hybridisierung für Robo4 zeigte eine spezifische Anfärbung von Gefäßendothelzellen im Verlauf von intratumoralen Bindegewebs-Gefäßstraßen. 4 von 10 Patientenproben zeigten ein eindeutig positives Signal. Das Verteilungsmuster war mit dem Verteilungsmuster von CD 31 in den immunhistochemischen Kontrollpräparaten vergleichbar. Ein positives Signal im Normalgewebe konnte für Robo4 ebenfalls nicht detektiert werden. Die β 2 Mikroglobulin Kontrolle zeigte in 6 Proben ein positives Signal. Weitere 4 Proben zeigten in der Kontrolle nur ein nicht eindeutiges bzw. kein Signal [Tab. 13]. Dieses ist vermutlich auf die RNA Degeneration in den vorliegenden Paraffinschnitten zurückzuführen. Abbildung J zeigt hier ein dunkles Anfärbemuster von Gefäßendothelien im Verlauf von Bindegewebsstraßen innerhalb von Tumorzellverbänden. Tumorepithelzellverbände liefern kein positives Signal. Insgesamt zeigt sich ein schwaches Signal im Bereich des Tumorgewebes. In Abbildung K zeigt sich im Normalgewebe keine Anfärbung von Strukturen. Weder normale Epithelzellen noch Gefäßendothelzellstrukturen lassen sich mit einem positiven Signal für Robo4 darstellen.

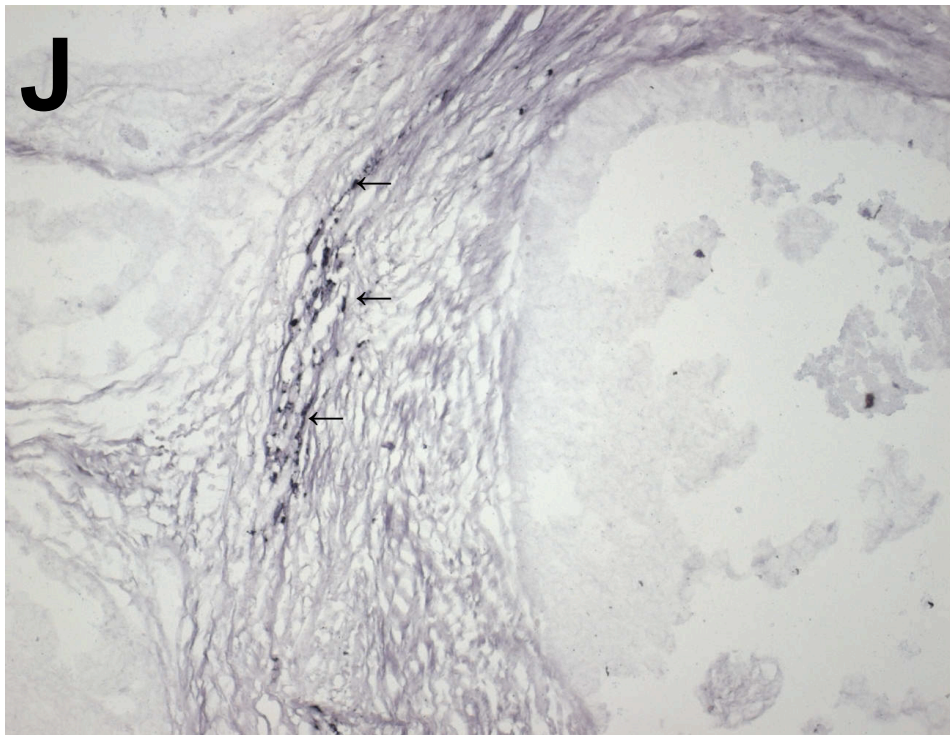


Abb. J: In-Situ Hybridisierung für Robo4: Anfärbung von Gefäßendothelien im Verlauf von intratumoralen Bindegewebe-Gefäßstraßen (→). Vergrößerung 10fach

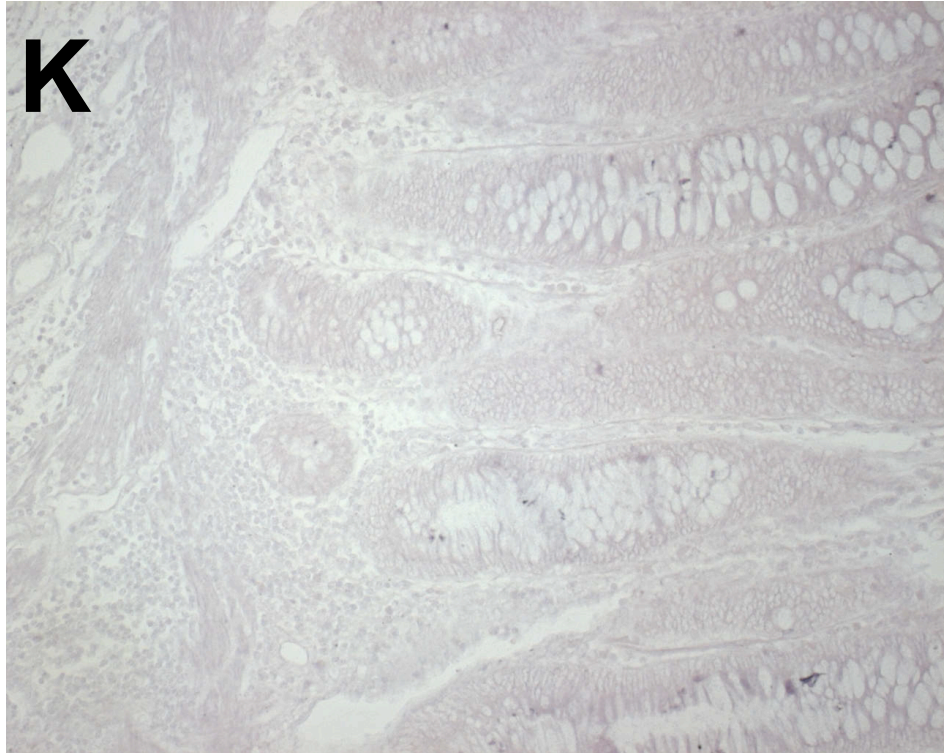


Abb. K: In-Situ Hybridisierung für Robo4: keine Anfärbung von Strukturen im Normalgewebe. Vergrößerung 10fach.

Robo4-Ergebnisse In-Situ Hybridisierung

<u>Pat.-Nr.</u>	<u>Färbung T</u>	<u>Färbung Struktur</u>	<u>Färbung N</u>	<u>β2 Mikroglobulin</u>
2	negativ	keine	negativ	positiv
4	negativ	keine	negativ	positiv
13	negativ	keine	negativ	positiv
24	positiv	Gefäßendothel	negativ	+/-
25	positiv	Gefäßendothel	negativ	+/-
32	negativ	keine	negativ	positiv
44	negativ	keine	negativ	negativ
45	positiv	Gefäßendothel	negativ	positiv
47	negativ	keine	negativ	+/-
49	positiv	Gefäßendothel	negativ	positiv

Tab. 13: In-Situ Hybridisierung für Robo4: Färbung T bzw. N zeigt ob eine positives oder negatives Signal im Tumorgewebe (T) bzw. Normalgewebe vorliegt. β2 Mikroglobulin zeigt an ob eine positives, sehr schwaches bis nicht eindeutiges (+/-), oder kein Signal (negativ) vorliegt.

5.6 Korrelationsanalysen

5.6.1 Korrelation Immunhistochemie / Real-Time PCR Robo1

Vergleicht man das Verhältnis der Färbungsintensitäten für Tumor- und Normalgewebe in der immunhistochemischen Analyse mit den Ergebnissen des T/N Quotienten der N-Ratios für Tumor und Normalgewebe der Real-Time PCR, so zeigt sich für Robo1, dass in 91% der Fälle bei erhöhter Färbungsintensität in der Immunhistochemie auch eine hohe Expression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe in der Real-Time PCR nachgewiesen werden konnte ($T/Q > 1,5$). In 38% der Proben war eine äquivalente Färbungsintensität zwischen Tumor- und Normalgewebe auch in der Real-Time PCR nachweisbar ($T/Q 0,5-1,5$). Der graphische Zusammenhang ist in Abbildung 10 dargestellt. Es zeigt sich, dass bei hohen Färbungsintensitätsverhältnissen von Tumor- gegenüber Normalgewebe in der Immunhistochemie das T/N N-Ratio-Verhältnis in der Real-Time PCR hoch ist. Dadurch kommt es graphisch zu einer Rechtsverschiebung der Punktansammlungen bei hohen Färbungsintensitäten. Der mittlere Färbungsintensitätsbereich (Wert 2) zeigt gegenüber dem niedrigen Intensitätsbereich (Wert 1) keinen eindeutigen Trend. Im niedrigen Intensitätsbereich zeigt sich eine breite Streuung. Der Grad des statistischen Zusammenhanges zwischen Färbungsintensitätsverhältniss und T/N Quotienten wurde mit der Korrelationsanalyse nach Spearman (Rangkorrelation) bestimmt. Bei einem Spearman-schen Rangkorrelationskoeffizienten von $r_x < 0,4$ wird kein Zusammenhang, bei $r_x 0,4-0,6$ ein schwacher Zusammenhang, bei $r_x 0,6-0,8$ ein starker Zusammenhang und bei $r_x > 0,8$ ein sehr starker Zusammenhang postuliert. Es zeigte sich ein Korrelationskoeffizient von $r_x = 0,498$ und damit eine schwacher signifikanter Zusammenhang

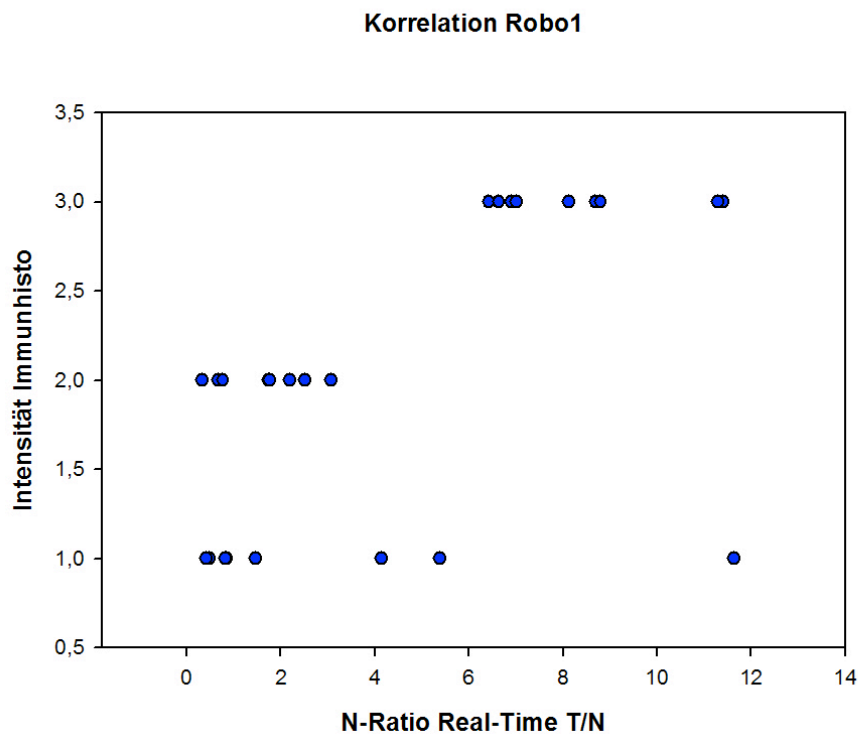


Abb. 10: Korrelation der Färbungsintensitäten der Immunhistochemie mit der N-Ratio T/N der Real-Time PCR für Robo1. Die Färbungsintensitäten entsprechen mit den Zahlenwerten dem berechnetem Verhältnis der Evaluierungsskala (Tumor- vs. Normalgewebe): 3 (+++), 2 (++), 1(+).

5.6.2 Korrelation Immunhistochemie / Real-Time PCR für Robo4

In der immunhistochemischen Analyse wurde Normalgewebe durchgehend nicht bis nicht eindeutig gefärbt. In der Real-Time PCR wurde durchgehend wenn auch schwach Robo4 im Normalgewebe nachgewiesen. Graphisch zeigt sich in Abbildung 11, dass im niedrigen Färbungsintensitätsbereich (Wert 0,5-1) der N-Ratio Quotient niedrig ist. Im mittleren Intensitätsbereich (Wert 2) zeigt sich eine leichte Rechtsverschiebung zu höheren T/N-Werten jedoch mit Überlappungen zwischen niedriger und mittlerer Färbungsintensität. Die zwei Patientenproben mit hohen T/N-Werten für Robo4 zeigen in der Immunhistochemie keinen eindeutigen Trend. In der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zeigte sich mit einem Koeffizienten von $r_x = 0,475$ ein schwacher signifikanter Zusammenhang zwischen der Immunhistochemie und der Real-Time PCR für Robo4.

Korrelation Robo4

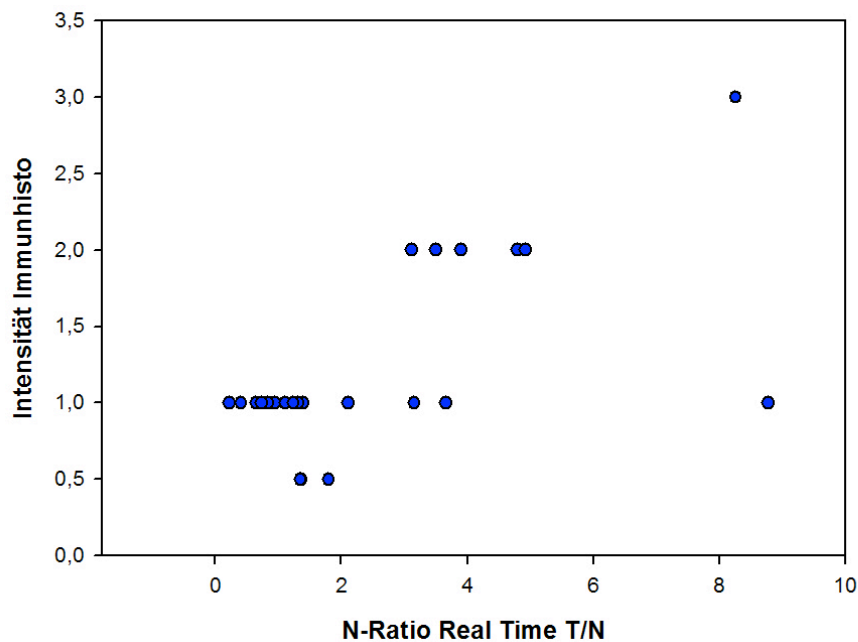


Abb. 11: Korrelation der Färbungsintensitäten der Immunhistochemie mit der N-Ratio T/N der Real-Time PCR für Robo4. Die Färbungsintensitäten entsprechen mit den Zahlenwerten dem berechnetem Verhältnis der Evaluierungsskala (Tumor- vs. Normalgewebe): 3 (+++), 2 (++), 1(+), 0,5(+/-)

5.6.3 Korrelation Immunhistochemie / Real-Time PCR für Slit2

Die immunhistochemischen Färbungsintensitäten im Normal- und Tumorgewebe ließen keinen Trend einer stärkeren Färbung in einer der beiden Gewebesorten erkennen. Die Real-Time PCR Analyse zeigte dies ebenfalls. In Abbildung 12 zeigt sich, dass es im Bereich von niedrigen (Wert 0,5-1) und mittleren (Wert 2) Färbungsintensitätsverhältnissen zu einer breiten Streuung im Bereich der T/N N-Ratio Verhältnisse kommt. Es lässt sich kein eindeutiger Trend für einen Zusammenhang zwischen hohen bzw. niedrigen T/N Real-Time PCR Verhältnissen und immunhistochemischer Färbung erkennen. In der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zeigte sich für das Verhältnis der Färbungsintensitäten in Korrelation zum T/N Quotienten der Real-Time PCR ein Korrelationskoeffizient von $r_s = 0,129$ und damit dementsprechend kein signifikanter Zusammenhang.

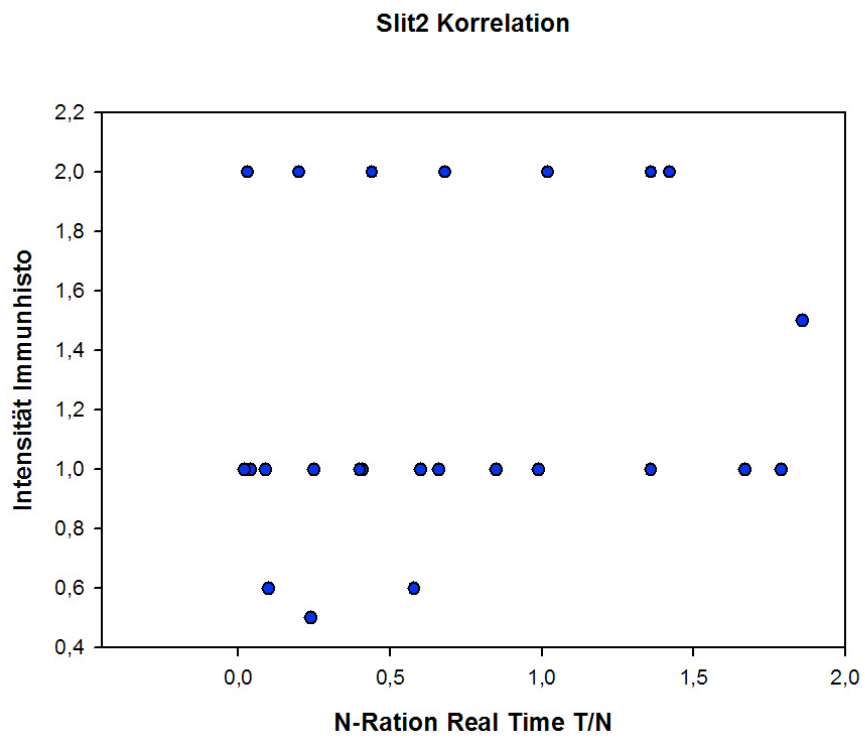


Abb. 12: Korrelation der Färbungsintensitäten der Immunhistochemie mit der N-Ratio T/N der Real-Time PCR für Robo4. Die Färbungsintensitäten entsprechen mit den Zahlenwerten dem berechnetem Verhältnis der Evaluierungsskala (Tumor- vs. Normalgewebe): 3 (+++), 2 (++), 1(+), 0,5(+/-)

6. Diskussion

Tumorentwicklung und Progression sind als kumulatives Ergebnis von genetischen Alterationen anzusehen, in deren Folge es zur Aktivierung von Tumoronkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kommt. Die Tumorprogression ist bei reiner Versorgung durch Diffusion auf ein bestimmtes kritisches Volumen von 1-2 mm³ limitiert [34]. Um den erhöhten Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen zu decken, werden durch die Tumorzellen Mechanismen der Angiogenese induziert. Dies führt zur Endothelzellmigration, Aussprossen von Mikrogefäßkapillaren und letztendlich zum Anschluss an das körpereigene Blutgefäßsystem. Eine Progression von soliden Tumoren und eine mögliche Tumormetastasierung sind die Folge. Der Prozess der Tumorangiogenese wird durch viele pro- und anti-angiogenetische Faktoren und zelluläre Signaltransduktionswege reguliert (siehe Kapitel 1.2: Tabelle 6, Tabelle 7). Der Robo/Slit Signalweg, der erstmalig im Zusammenhang mit der Axonmigration während der Neurogenese beschrieben wurde [75], besitzt ebenfalls eine Funktion im Angiogeneseprozess. Gemeinsame Signaltransduktionswege für die Axonaussprossung und die Endothelzellmigration und Mikrogefäßbildung konnten auch für Netrine, Semaphorine und Ephrine demonstriert werden und zeigen die Bedeutung dieser Genprodukte für die Ausbildung eines Netzwerkes aus Neuronen bzw. Gefäßen [76, 77, 78]. Die differentielle Expression von Robo/Slit konnte in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden. In dieser Studie konnte die Überexpression von Robo1 und Robo4 im Gewebe des humanen kolorektalen Karzinoms im Vergleich zum normalen Gewebe mittels Real-Time PCR gezeigt werden und die exprimierenden Gewebestrukturen in situ identifiziert werden. Für Slit2 ließ sich ein Trend zur verminderten Expression im Tumor- gegenüber dem Normalgewebe erkennen.

6.1 Bewertung des Patientenkollektivs

Das durchschnittliche Erkrankungsalter zum Zeitpunkt der Operation bei unserem Patientenkollektiv lag bei 63 Jahren. Dieses Alter entspricht insgesamt in etwa dem Durchschnittsalter anderer größerer Studien zum kolorektalen Karzinom. In der IMPACT Studie von 1995, welche 1526 Patienten einschloss, betrug das durchschnittliche Erkrankungsalter 62 Jahre, in der Studie von Moertel et al. von 1990 an 929 Patienten, 61 Jahre [79,80]. Das durchschnittliche Erkrankungsalter in Deutschland wird mit 65,4 Jahren angegeben [1]. Das Geschlechterverhältnis von männlichen Erkrankten gegenüber weiblichen Erkrankten 1:1,17. Demgegenüber wird das Geschlechterverhältnis von Männern gegenüber Frauen in Deutschland nach dem deutschen Krebsregister mit 1,12:1, also mit leichtem Überwiegen des männlichen Geschlechts dargestellt [2]. Die IM-

PACT-Studie und die Studie von Moertel et al. zeigen ebenfalls ein Geschlechterverhältnis von 1,1:1 mit annähernder Gleichverteilung. Ein signifikanter prognostischer Einfluss des Geschlechts ist bisher aber in keiner der aufgeführten Untersuchungen beschrieben worden. Die Verteilung der Häufigkeiten der einzelnen pathologisch gesicherten Tumordinfiltrationstiefen zeigte in dieser Studie in 26% ein pT2, in 66% ein pT3 und in 8% ein pT4. Die Vergleichswerte des deutschen Krebsregisters 2008 [2] zeigten prozentuale Anteile von 0,4% bei pTis, 8% bei pT1, 21% bei pT2, 55% bei pT3 und 15,6% bei pT4. Da die Patienten in kurativer Absicht in der chirurgischen Klinik therapiert wurden erklärt sich die Unterrepräsentation von pT4. Die UICC-Stadien verteilen sich in unserer Studie auf UICC I mit 22%, UICC II: 30%, UICC III 28% und UICC IV 20%. Diese Verteilung ist vergleichbar mit der Verteilung der UICC-Stadien in der deutschen Bevölkerung bei Erstdiagnose: UICC I:13%, UICC II: 27%, UICC III: 32%, UICC IV:28% [2]. Insgesamt lässt sich sagen, dass das vorliegende Patientenkollektiv in klinischer und pathologischer Hinsicht Patientenkollektiven aus anderen größeren Studien entspricht und repräsentativ ist. Dies bildet die Grundlage zur Bewertung der Real-Time PCR Ergebnisse und immunhistochemischen bzw. in-situ Hybridisierungs-Untersuchungen.

6.2 Expressionsanalyse von Robo1

Das Expressionsprofil von Robo1 im Tumorgewebe ist heterogen. Für das hepatozelluläre Karzinom konnten Ito et al. eine hohe Expression in hepatozellulären Leberkarzinomzelllinien und auch in Sera von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom mittels Real-Time PCR nachweisen. Eine Expression von Robo1 im Normalgewebe war nur gering [81]. Auch in weiteren Studien für das hepatozelluläre Karzinom konnten erhöhte Real-Time PCR Expressionswerte für Robo1 im Tumorgewebe gezeigt werden [82] Lee et al. konnten für das, durch das Epstein Barr reaktivierte, nasopharyngeale Karzinom eine erhöhte Expression von Robo1 zeigen [83]. Wang et al. postulierten eine Interaktion von Slit 2 Liganden, die von humanen malignen Melanomzellen produziert wurden mit Robo1 Rezeptoren auf Tumorendothelzellen. Normale Endothelzellen wiesen keine Robo1 Rezeptoraktivität auf [64]. Im Gegensatz dazu wurde bei anderen Tumorentitäten Robo1 eher die Rolle eines Tumorsuppressorgens zugesprochen. Robo1-Hypermethylierung und damit Inaktivierung tritt früh bei invasivem Zervixkarzinom auf [61]. Eine Real Time PCR Analyse von Normal- und korrespondierendem Tumorgewebe der Prostata zeigte eine niedrigere Expression von Robo1 bei Prostatatumoren [63]. Dallol et al. beschreiben Hypermethylierungen von Robo1 für das Mammakarzinom, das Nierenzellkarzinom und das Lungenzellkarzinom und werten Robo1 als potentielles Tumorsuppressorgen [62]. In den Chiparray-

Analysen der eigenen Arbeitsgruppe konnte Robo1 in 54 von 60 untersuchten Patientenproben aus kolorektalem Tumor- und Normalgewebe detektiert werden. In mehr als 47% der 30 Probenpaare war Robo1 im Tumor mehr als doppelt so hoch exprimiert, in mehr als 17% war Robo1 mehr als vierfach höher im Tumor verglichen mit dem Normalgewebe exprimiert [74]. Diese Ergebnisse wurden durch die Real-Time PCR Ergebnisse dieser Studie bestätigt: In 78% der Patientenprobenpaare war Robo1 im Tumorgewebe überexprimiert, in 42% im Tumor vierfach höher exprimiert und in 12% mehr als 12fach höher exprimiert als im Normalgewebe. Die Analyse der Robo1 Expression beim kolorektalen Karzinom in Bezug auf das UICC-Stadium und damit im Hinblick auf einen möglichen Indikator für eine schlechtere Prognose bei metastasiertem Tumor ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen den nichtmetastatischen UICC-Stadien I/II und den UICC Stadien III/IV mit Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen erkennen. Auch andere Studien konnten bisher keine differentielle Expression von Robo1 in metastatischen und nichtmetastatischen Tumorstadien an Patientenproben zeigen [63, 81, 82]. Yang et al. konnten an einem Knockout Maus Modell für Pankreastumor eine Zunahme der Lymphangiogenese und der Lymphknotenmetastasen zeigen [120]. Für das kolorektale Karzinom ist dies die erste spezifische Studie zur Genexpression von Robo1. Die differentielle Expression von Robo1 im Tumorgewebe von verschiedenen neoplastischen Entitäten führt zu der Annahme, dass Robo1 gewebespezifisch unterschiedliche Funktionen hat und bei einigen Tumoren eine tumorprogressionsfördernde Funktion aktiviert, bei anderen Entitäten eine tumorsupprimierende Funktion hat. Die Lokalisation der Robo1 Protein-Expression in der Zelle durch immunhistochemische Färbung zeigte in dieser Studie, dass Robo1 in den Tumorepithelzellen des kolorektalen Gewebes exprimiert wird. Im Normalgewebe ließ sich eine geringe bis mäßige Expression im Kolonepithel nachweisen. In der von Wang et al. 2003 publizierten Studie [64] wurde gezeigt, dass Slit2 in Interaktion mit Robo1 exprimierenden Endothelzellen die Angiogenese induziert. Slit2 wurde von humanen malignen A375 Melanomzellen sezerniert. Eine Inhibierung der Tumorprogression, im Sinne einer reduzierten Mikrogefäßdichte und verminderten Tumormasse, konnte durch Blockade der Robo-Rezeptor Aktivität durch die extrazelluläre Robo1 Domäne (RoboN) erreicht werden. Die Untersuchungen von Ito et al. an Leberkarzinomzelllinien zeigen ein positives immunhistochemisches Signal im Bereich des Tumorepithels für Robo1 von 84,7% [81]. Tie et al. konnten in einer Studie am Magenkarzinom zeigen, dass die Blockade von Robo1 Rezeptoren durch siRNA (Mir-218) Invasion und Metastasierung am Tiermodell hemmt [84]. Weitere Studien zur in-situ Charakterisierung der Protein-Expression von unterschiedlichen Tumorentitäten werden daher benötigt. Die Expression von Robo1 verstärkt auf den Tumorepithelzellen selbst, lässt vermuten, dass die Aktivierung von Robo1 weitere zelluläre Mechanismen der Tumorpro-

gression und womöglich Tumorzellmigration bzw. Metastasenmechanismen in Gang setzt, die bisher nicht bekannt sind. Weitere Studien mit z. B. monoklonalen Antikörpern oder siRNA gegen das Robo1 Protein könnten Aufschlüsse über die Rolle von Robo1 bei der Tumorprogression geben und machen Robo1 zum potentiellen Ziel einer anti-proliferativen Tumorthherapie. Die in-situ Hybridisierung bestätigte die Aktivität von Robo1 im Bereich der Tumorepithelzellen. Eine Aktivität von mRNA für Robo1 im intratumoralen Bindegewebe ließ sich nicht detektieren. Lee et al. zeigten ebenfalls, jedoch nicht an humanen Tumorpräparaten, Aktivität von Robo1 mRNA durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an nasopharyngealen Karzinom Zelllinien [80]. Die eigenen Untersuchungen zeigten eine inkonstante Anfärbungsqualität und -quantität bei den verwendeten Proben im Vergleich zur immunhistochemischen Färbung und im Hinblick auf die in der Real-Time PCR gemessene Expression. Dies lässt sich am ehesten auf die hohe Anfälligkeit der Methode gegenüber Verfahrensunebenheiten zurückführen. Weitere in-situ Hybridisierungsuntersuchungen für Robo1 sind in der Literatur nicht zu finden. Die Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte für die Korrelation der Real-Time PCR Ergebnisse mit den Ergebnissen der Immunhistochemie einen schwachen signifikanten Zusammenhang. Dies impliziert, dass die Höhe der Robo1 Genexpression auf RNA Ebene einen, wenn auch schwachen Zusammenhang mit der Expression von Robo1 auf Proteinebene aufweist. Dieser Umstand wird auch von Untersuchungen durch Ito et al. [81] bestätigt, der bei humanen Leberzellkarzinom eine erhöhte RNA Genexpression von Robo1 und eine verstärkte Proteinexpression im Tumorgewebe nachweisen konnte. Ein direkt lineares Verhältnis lässt sich jedoch nicht herstellen. Dies zeigt, dass die Proteinexpression des Robo1 Rezeptors nicht allein durch die Robo1 RNA-Genexpression gesteuert wird. Genauere Mechanismen des Slit-Robo Pathways sind bisher nur in Ansätzen bekannt (siehe Kapitel 1.2). In wie weit die unterschiedliche Ausgangsmaterialkonservierung des gleichen Patienten für die korrelierten Methoden eine Rolle spielt ist diskutabel. Eine mögliche verstärkte RNA Degradierung durch die Einbettung in Paraffin für die in-situ Untersuchungen im Vergleich zur Kryokonservierung für die molekularbiologischen Untersuchungen mag für die Proteinexpressionsuntersuchungen der Immunhistochemie nur eine untergeordnete Rolle spielen, für die in-situ Hybridisierungsuntersuchungen ist sie schwerwiegender.

6.2 Expressionsanalyse von Robo4

In der Real-Time PCR der vorliegenden Studie zeigte sich, dass in 72 % der Patientenpaare Robo4 im Tumorgewebe stärker exprimiert war als im Normalgewebe. Die absoluten Expressionswerte für Robo4 zeigten ein insgesamt sehr geringes Expressionsniveau. Für Robo4 als Expres-

sionswert ließen sich im Tumorgewebe im Median $5,82 \times 10^{-3}$ Einheiten messen. Im Normalgewebe waren im Median $3,15 \times 10^{-3}$ Einheiten zu messen. Im Vergleich dazu war Robo1 absolut im Tumor- wie auch im Normalgewebe höher exprimiert (Median $4,09 \times 10^{-1}$ E bzw. $1,12 \times 10^{-1}$ E). Diese Unterschiede in den Ergebnissen der Chiparray Analyse der eigenen Arbeitsgruppe und der Real-Time PCR sind in sofern zu erklären, dass unterschiedliches Zellmaterial für die Analyse benutzt wurde. Bei der Chiparray Analyse wurde durch die Laser-Mikrodissektion fast ausschließlich nur Tumor- bzw. Normalgewebezellen extrahiert und die entsprechende mRNA isoliert. Bei der bewusst gewählten Methode der Makrodissektion hingegen wurde nicht nur die einzelne Zelle, sondern ein gesamter Tumorzellverband mit unmittelbar angrenzenden und insbesondere zwischen den einzelnen Tumorzellen liegenden Gewebeanteilen extrahiert und die mRNA isoliert. Diese Methode schließt in die Analyse der Genexpression zwangsläufig Strukturen der interzellulären Kommunikation z. B. Mikrogefäßstrukturen mit ein und liefert ein realistisches Profil für die Genexpression im unmittelbaren Tumormilieu. Eine erhöhte Expression von Robo4 bei der Real-Time PCR im Tumorgewebe im Vergleich zur geringen Expression von Robo4 bei der isolierten Tumorzelle im Rahmen der Chiparray Analyse zeigt, dass Robo4 nicht auf den Tumorepithelzellen sondern vermehrt auf Gewebestrukturen in unmittelbarer Tumornähe exprimiert wird. Eine 3 kb große Promoterregion vor dem Robo4 Gen konnte für die Endothelspezifität identifiziert werden [68]. Ein Screening für die Robo4 Expression im Patientenserum bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom zeigte bei einer Robo4 Erhöhung eine Korrelation mit einer schlechten Prognose [85]. Eine essentielle Rolle von Robo4 in der embryonalen Entwicklung beim Zebrafisch konnte demonstriert werden [86] und lässt eine konservierte Funktion von Robo4 bei der Angiogenese von Vertebraten und auch des Menschen vermuten [73]. Robo4 scheint auch überexprimiert zu sein bei der Entwicklung der diabetischen Retinopathie [87,88]. Bei Analyse der Robo4 Expression in Bezug auf die jeweiligen UICC-Stadien konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den nichtmetastatischen Stadien I/II und den UICC-Stadien mit Lymph- bzw. Fernmetastasierung III/IV festgestellt werden. Es ließ sich jedoch beim Betrachten der Median-Werte des T/N-Verhältnisses (UICC I: 1,4 UICC II: 1,6 UICC III: 1,9 UICC IV: 2,1) ein Trend zu einer verstärkten Expression mit steigendem UICC Stadium erkennen. Beim Vergleich der UICC Stadien I/II und III/IV zeigten sich T/N-Verhältniswerte von 1,5 und 2,0. Görn et al. zeigten in einer Studie in 2005 ein erhöhtes Level von Robo4 im Serum von Patienten mit fortgeschrittenem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom [85] und postulierten Robo4 als Prognosemarker. Für das kolorektale Karzinom existieren momentan noch keine Studien mit Serumbestimmungen von Robo4. Der Trend einer erhöhten Expression von Robo4 mit fortgeschrittenem UICC Stadium macht Robo4 jedoch als Prognosemarker ebenfalls interessant für das kolorektale

Karzinom. Die nichtsignifikanten Unterschiede zwischen den Expressionen der einzelnen UICC-Stadien mag auch auf die geringe Anzahl von Patienten in den Extremstadien UICC I und IV (11 bzw. 10 Patienten) im Vergleich zu den mittleren Stadien UICC II und III (14 bzw. 15 Patienten) zurückzuführen sein. Weitere Studien mit homogenerer Patientenverteilung bzw. Studien zur Serumbestimmung von Robo4 sind notwendig um eine Aussage über Robo4 als potentiellen Prognosemarker zu machen. Der molekulare Mechanismus mit dem Robo4 an der Endothelzellmigration beteiligt ist, bisher noch Gegenstand der Forschung. Kaur et al. konnten zeigen, dass Robo4 über den intrazellulären Signaltransduktionsweg der Rho GTPasen, zu denen die Proteine Rho, Rac und Cdc42 gehören, wirkt. Eine Aktivierung von WASP Proteinen und Initialisierung von Filopodien und Lamellipodien, die die Endothelzellmigration bewirken ist die Folge (siehe Kapitel 1.3.1). Desweiteren ist bisher noch nicht sicher ein Ligand für Robo4 identifiziert worden. Robo4, welches auch als „Magic Roundabout“ bezeichnet wird, findet sich bisher nur auf Endothelzellen. Eine Proteinexpression von Robo4 konnte auf Tumorgefäßen von unterschiedlichen Entitäten z. B. Niere, Blase, Mamma, Gehirn und auch Kolon nachgewiesen werden [66, 67]. Auf normalen Endothelzellen konnte Robo4 bisher nur in vitro in geringer Expression nachgewiesen werden [67]. Mit dem löslichen extrazellulären Teil des Robo4 Rezeptors konnte in einer Studie von Suchting et al. [70] Angiogenese in vivo am subkutan eingebrachten Schwammmodell an der Maus inhibiert werden, es konnte in vitro das Wachstum des Aortenringes der Ratte in einem Matrigel-Modell gehemmt werden, und die durch VEGF stimulierte Endothelzellmigration und Endothelzellproliferation in vitro gehemmt werden. Die Robo Proteine 1-3 weisen deutliche Unterschiede zur Struktur von Robo4 auf. Strukturanalysen von Robo-Slit Interaktionen konnten zeigen, dass zwar die zwei Ig Domänen von Robo4 homolog zu den ersten zwei Slit-Bindungsdomänen von Robo1 sind, jedoch fehlen den Robo4 Proteinen viele der spezifischen molekularen Slit-Bindungsstrukturen [89]. Park et al. zeigten in einer Immunpräzipitationsstudie, bei der markierte Slit2 Proteine und markierte Robo4 Proteine bei Nierenkarzinomzellen in vitro zur Ausfällung gebracht wurden eine Koimmunpräzipitation und damit eine direkte Bindung von Slit2 und Robo4 [90]. Im Gegensatz dazu konnten in BioCore® Analysen der Bindung von Robo4 keine Interaktion mit Slit2 nachgewiesen werden [91]. Robo4 kann das Aktin regulierende Protein Mena binden, diese Interaktion impliziert eine Funktion in der Neuorganisation des Zytoskeletts und damit eine Beteiligung an der Zellmigration [90]. In einer weiteren Studie zeigten Hohenester et al. eine nur schwache Bindung von Slit2 mit Robo4 (Oberflächen Plasma-Resonanz Studie) [92]. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Robo4 keinen Liganden benötigt, sondern wie z. B. Tie-1 im Angiopoietin / Tie System durch sequentielle Proteolyse aktiviert wird [72,73]. In Ergänzung dazu konnte ein hypoxiereguliertes Spaltprodukt von Robo4 in Zell-

kultur Überständen von proliferierenden Endothelzellen entdeckt werden, dessen physiologische Funktion noch unklar ist [85]. Zur genauen Lokalisation der exprimierenden Strukturen wurden die Methoden der Immunhistochemie herangezogen. Diese Methode zeigte, dass Robo4 fast ausschließlich im Tumorgewebe und zwar an den Tumorgefäßen exprimiert wird. Eine Proteinexpression von Robo4 im Normalgewebe war nur sehr leicht bis gar nicht darstellbar. Dies deckt sich mit dem sehr geringen Nachweis von Robo4 in der Real-Time PCR, welche auch noch für kleinste Mengen eines Genproduktes hoch sensitiv ist und damit in-situ Nachweisen deutlich an Sensitivität überlegen ist. Robo 4 konnte auf den verwendeten Gewebeschnitten sicher an interzellulären Tumorendothelstrukturen nachgewiesen werden. Eine Anfärbung von Robo4 an Tumorepithelzellen war nicht zu verzeichnen. Dies bestätigt die Spezifität von Robo4 für Tumorendothelzellen. Die in-situ Hybridisierung für Robo4 wurde zunächst aufgrund des Nichtvorhandenseins eines kommerziell erhältlichen Antikörpers für Robo4 für diese Studie durchgeführt. Es zeigte sich eine spezifische Anfärbung für Endothelstrukturen im intratumoralen Bindegewebe. Insgesamt zeigte sich wie in den in-situ Hybridisierungsuntersuchungen für Robo1 auch ein schwaches positives Signal mit großen Alterationen zwischen den Patientenproben. Eine Anfärbung von Strukturen im Normalgewebe ließ sich nicht darstellen. Insgesamt ließ sich jedoch trotz wie schon beschriebener hoch sensibeln Methode für Verfahrensunregelmäßigkeiten eindeutig die in der Literatur beschriebene hohe Spezifität von Robo4 demonstrieren. Die in dieser Studie später durchgeführten immunhistochemischen Analysen bestätigten diese Strukturspezifität. Eine quantifizierende Aussage zur mRNA-Aktivität in-situ ließ sich mit der in-situ Hybridisierung weder für Robo4 noch für Robo1 machen. Der Vergleich der immunhistochemischen Ergebnisse und der Real-Time PCR Ergebnisse für Robo4 liefert mit der Spearman Korrelationsanalyse einen schwach signifikanten Zusammenhang. Es lässt sich bei erhöhten Genexpressionswerten der Real-Time PCR eine leichte Anfärbungsintensitätserhöhung der Endothelstrukturen im Bereich des Tumorgewebes zeigen. Im mittleren und niedrigen Färbungsintensitätsbereich liegt eine breitere Streuung vor. Insgesamt ist die Korrelationsaussage jedoch bei niedrigen absoluten Expressionswerten von Robo4, und hoch spezifischer Anfärbung von definierten Strukturen in-situ, kritisch zu betrachten.

6.4 Expressionsanalyse von Slit 2

Die Familie der Slit-Proteine sind große extrazellulär sezernierte Glykoproteine, die bei der Entwicklung des embryonalen Nervensystems wichtige Funktionen übernehmen. Zum einen werden Axonaussprossung und Axonmigration aktiviert, zum anderen scheinen die Slit-Proteine auch

eine verlangsamende und zurückdrängende Funktion für bestimmte Axone bei ihrer Entwicklung z. B. im olfaktorischen System zu übernehmen [59, 90, 93]. Wu et al. konnten in einer Studie von 2001 zeigen, dass Slit nicht nur in neuronalen Geweben exprimiert wird, sondern auch extraneural zu finden ist und z. B. die Leukozytenchemotaxis inhibiert [95]. Slit 2 ist auf Chromosom 4p15.2 lokalisiert [96]. Deletionen auf Genlocus 4p15.1-4p15.3 können früh in der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms detektiert werden [97]. Auch in der Karzinogenese des Mesothelioms, des kleinzelligen Lungenkarzinoms und des Mammakarzinoms konnten Chromosomenaberrationen im Bereich des Slit2 Lokus nachgewiesen werden [98, 99]. Dies zeigt, dass Slit2 eine Rolle in der Tumorentwicklung bei unterschiedlichen malignen neoplastischen Entitäten spielt. Slit-Robo Interaktionen konnten in einigen Tumorzelllinien und Primärkarzinomen nachgewiesen werden. Latil et al. zeigten, dass Slit 2 bei Prostatakarzinom nachgewiesen werden konnte. Slit2 war im Median jedoch nicht signifikant hoch- bzw. herunter reguliert zwischen Prostata-Tumor- und Normalgewebe. Lediglich eine bestimmte Subklasse von hormonsensitiven Prostata-Tumoren zeigten eine erhöhte Slit2 Expression [58]. Dallol et al. konnten zeigen, dass Slit2 bei Lungenkarzinom, Mammakarzinom und kolorektalem Karzinom durch Hypermethylierungen inaktiviert ist [100, 101]. Dadurch ergibt sich die Hypothese, dass Slit 2 die Funktion eines Tumorsuppressorgens übernimmt. Es wird beschrieben, dass die Präsenz von Slit2 mit der Slit-Robo Interaktion im Tumor zu einer Aktivierung von apoptotischen Signalwegen über Caspase 3 und Caspase 9 führt und somit die Tumorprogression gehemmt wird [102, 103, 104]. Daher wäre es zu erwarten, dass die Expression von Slit2 im Tumorgewebe herunter reguliert ist im Vergleich zum Normalgewebe. In der Real-Time PCR zeigte sich, dass Slit2 in 68% (34/50) der Patientenprobenpaare im Tumorgewebe herunter reguliert ist. In 42% der Probenpaare war Slit2 sogar mehr als zweifach niedriger im Tumorgewebe exprimiert, als im Normalgewebe. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese von Slit2 als Tumorsuppressorgen. Die Tatsache das Slit2 im Tumorgewebe herunter reguliert ist kann eine reaktive Verstärkung der Expression der Slit2-Rezeptoren, der Robo Proteine, bewirken. Eine niedrigere Slit2 Expression scheint mit einer verstärkten Tumorprogression einherzugehen. Zheng et al. und Jin et al. konnten für das hepatozelluläre Karzinom erniedrigte Expressionswerte für Slit2 feststellen [105,106]. In diesen Studien konnte ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang einer niedrigen Slit2 Expression und einer Lymphknotenmetastasierung bzw. Zuordnung zu metastasierenden hepatozellulären Karzinomzelllinien hergestellt werden [105, 106]. Bei der Analyse der Slit2 Expression beim kolorektalen Karzinom in unserer Studie konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den metastatischen UICC Stadien III/IV und den Stadien I/II festgestellt werden. Für die UICC-Stadien I/II bzw. III/IV ergaben sich Median-Werte von 0,58 bzw. 0,65. Im UICC Stadium IV ließ sich sogar

eher eine leicht erhöhte Slit2 Expression detektieren (Median: 0,99 bzw. Mittelwert 2,29). Ob dies als Hinweis für eine erhöhte Zellzerfallsaktivität, die teilweise bei weit fortgeschrittenen Karzinomen auftritt, zu sehen ist darüber kann spekuliert werden. In den immunhistochemischen Färbungen der Gewebeschnitte konnten keine Bindungen des Slit2-Antikörpers mit spezifischen Zellstrukturen im Tumor- wie auch im Normalgewebe festgestellt werden. Ein differentielles Färbungsmuster zwischen Tumorgewebe und normalem kolorektalem Gewebe ließ sich ebenfalls nicht darstellen. Dies entspricht den in der Literatur durchgeführten Untersuchungen zu Slit2, welches als extrazelluläres Glykoprotein angesehen wird, das an seinen Rezeptor Robo1 andockt um die entsprechende Interaktion auszulösen. Die diffusen Anfärbemuster im Tumor- und Normalgewebe sind dadurch zu erklären. Die Korrelationsanalyse nach Spearman zeigt für den Vergleich der immunhistochemischen Färbungsintensitäten und den Real-Time PCR Werten keinen signifikanten Zusammenhang für Slit2. Sowohl im niedrigen Bereich der Färbungsintensitäten als auch im Bereich höherer Färbungsintensitäten zeigt Slit2 eine breite Streuung der mRNA Expression in der Real-Time PCR. Eine stärkere Anfärbung bei erhöhten Expressionswerten im Normalgewebe lässt sich ebenfalls nicht darstellen. Die immunhistochemische Aussage der Evaluationsskala ist in diesem Zusammenhang eher kritisch zu sehen, da bei diffuser Färbung sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe eine skalierte subjektive Aussage erschwert wird.

6.5 Robo Proteine – potentielle Ziele der Tumorthherapie

Die Tumorthherapie hat das Ziel, eine Neoplasie möglichst vollständig zu entfernen bzw. wenn das nicht möglich ist einen Progress zu verhindern und/oder die Tumorgroße bzw. Tumorausbreitung im Sinne einer Metastasierung zu reduzieren. Neben dem Goldstandard zur kurativen Therapie, der chirurgischen Resektion, dienen unterschiedliche neoadjuvante und adjuvante Therapieverfahren der Tumorbekämpfung. Diese Therapieverfahren setzen an zellulären Mechanismen der Tumoren an und stören bzw. schädigen intrazelluläre Signaltransduktionswege, Zellteilungsvorgänge, etc. Dieses führt zu einem verminderten Wachstumsprogress und im Idealfall zur Apoptose der Krebszelle. Der Anspruch an ein ideales therapeutisches Agens ist eine hoher Wirkungsgrad und eine hohe Spezifität für das Zielgewebe mit minimalster Beeinträchtigung von umliegendem gesundem Gewebe. Der Ansatz einer anti-angiogenetischen Tumorthherapie beruht auf den Beobachtungen von Algire und Chalkley 1945 [107], welche postulierten, dass die Tumorentwicklung von einer guten Gefäßversorgung abhängig ist. Nach der Aktivierung des „angiogenetischen Switches“ können erst ausreichend Nährstoffe und Sauerstoff der Tumorzelle

zugeführt werden um einen weiteren Progress zu ermöglichen. Ziel der anti-angiogenetischen Therapie ist es diese Entwicklung eines den Tumor versorgenden Blutgefäßsystems zu verhindern. VEGF und sein Rezeptor die VEGF-Tyrosin-Kinase sind nachweislich an den Mechanismen der Tumorangiogenese beteiligt [108, 109, 110]. Seit 2005 sind in Kombination mit anderen adjuvanten Therapeutika monoklonale Antikörper (Bevacizumab) zur Bindung an VEGF und damit zur Inhibierung der Interaktion zwischen VEGF und seinen Rezeptoren im therapeutischen Einsatz. Ein alternativer Ansatz favorisiert die direkte Blockierung der VEGF-Tyrosin-Kinase Rezeptoren und damit eine effektivere Inhibierung der durch VEGF ausgelösten Signalkaskade [111]. Einige neue therapeutische Agenzien sind in der klinischen Studienphase zur Testung. Eines der potentesten Mittel zur VEGF-Tyrosin-Kinase Inhibierung ist AZD2171. Durch sein geringes Molekulargewicht und oralen Bioverfügbarkeit mit einer Halbwertszeit von 20h, die eine einmalige orale Tagesgabe ermöglicht, ist es ein vielversprechendes Therapeutikum zur anti-angiogenetischen Therapie. Klinische Phase II und III Studien laufen momentan für verschiedene Tumorentitäten [112]. Die Angiopoietine und ihre Rezeptoren die Tie-Tyrosin-Kinasen sind ein weiteres System der Angiogenese. In präklinischen Studien konnte durch Antikörperinteraktion mit Angiopoietin-2 die Tie-2 Rezeptoren geblockt werden und Tumorangiogenese im Rattenmodell inhibiert werden [113]. Popkov et al. konnten mit einem Angiopoietin-2 Antikörper, der über ein Adenovirus in das Maus-Modell eingebracht wurde, die Progression von humanem Karposi-Sarkom und humanen kolorektalen Karzinomzellen (SW1222) hemmen [114]. Momentan laufen klinische Phase I Studien an Patienten mit AMG 386 einem Inhibitor für Ang-2 bei soliden Tumoren [55]. Ein anderer therapeutischer Ansatz versucht über Stimulation von endogenen angiogenetischen Kontrollfaktoren die Hemmung der unkontrollierten Tumorangiogenese zu erreichen. Thrombospondin-1 und -2 (TSP-1 und -2) haben direkte hemmende Wirkungen auf die Endothelzellmigration und können Endothelzellapoptose bei unkontrollierter Angiogeneseaktivität induzieren [115, 116]. Cyclophosphamide in niedriger Dosierung, auch als metronomische Chemotherapie bekannt, erhöhen im Serum das Level von zirkulierendem TSP-1 [117]. Niedrig dosierte Cyclophosphamide, Cisplatin und Doxetacel bewirken ebenfalls eine Erhöhung der FAS-Ligand Konzentration. Durch die kombinierte TSP-1 Aktivierung und FAS-Ligand Konzentrationserhöhung wird die Angiogenese gehemmt und Endothelzellapoptose induziert [118]. Die Therapie mit ABT-510 und ABT-526 Präparaten mit purifiziertem TSP-1 ist momentan in der klinischen Phase II Studie für Weichteilsarkome, Nierenzellkarzinome, Lymphome und das nicht-kleinzellige Lungenzellkarzinom [119]. Es gibt also unterschiedliche Ansätze zur anti-proliferativen Tumorthherapie und insbesondere der anti-angiogenetischen Therapie. Ein anti-angiogenetisches Therapeutikum sollte möglichst direkt an den Mechanismen der

Tumorangiogenese beteiligt sein. Es sollte speziell bei der zu therapierenden Tumorentität hoch exprimiert sein oder sogar fast ausschließlich dort zu detektieren sein. Die Robo-Proteine sind direkt an den Mechanismen der Angiogenese beteiligt. Robo1 konnte in verschiedenen Tumorentitäten differentiell exprimiert nachgewiesen werden. Jedoch ist seine Funktion anscheinend gewebespezifisch und muss noch weiter charakterisiert werden. Da Robo1 nicht nur auf Tumorendothelzellen exprimiert wird, erfüllt es nicht die Voraussetzungen einer spezifischen Zielstruktur für eine anti-angiogenetische Therapie. Da jedoch Robo1 eine eindeutige Beteiligung an der Tumorentwicklung mit hemmender oder proliferierender Funktion zuzuordnen ist bleibt es als Zielstruktur für eine anti-proliferative Therapie interessant. Robo4 das sogenannte „Magic Roundabout“ ist bisher fast ausschließlich nur auf Endothelzellen und insbesondere auf Tumorendothelzellen nachgewiesen worden. Damit erscheint es als potentiell therapeutisches Target VEGF oder Angiopoietin-2 überlegen, die auch an normalen Gefäßneubildungsprozessen teilnehmen. In verschiedenen Studien konnte eine direkte inhibierende Wirkung auf die Angiogenese nach Blockade der Robo4 Aktivität nachgewiesen werden. Lediglich die auch durch uns nachgewiesene relativ niedrige Konzentration von Robo4 im Gewebe könnte eine effektive Therapie beeinträchtigen. Es ist denkbar, dass andere angiogenetisch stimulierende Mechanismen im Tumor eine Robo4 Blockierung kompensieren können. Die Tatsache, dass in unserer Studie zwar kein signifikanter Unterschied zwischen metastatischen Stadien und nichtmetastatischen Stadien des kolorektalen Karzinoms nachgewiesen werden konnte, aber ein Trend zur höheren Expression in den UICC Stadien III und IV zu erkennen ist, lässt Robo4 auch im Sinne eines prognostischen Markers für die Tumorthherapie interessant bleiben. Robo4 bietet also durch seine Gewebespezifität, seine direkte Wirkung und potentiell prognoserelevante Aussagekraft alle Eigenschaften eines potentiellen therapeutischen Ziels für die anti-angiogenetische Therapie mit.

7. Zusammenfassung

Einleitung:

Das kolorektale Karzinom ist einer der häufigsten malignen Tumore und in Deutschland die zweithäufigste Krebstodesursache. Ein wesentlicher Faktor in der Progression maligner Neoplasien ist die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Anschluss an das körpereigene Gefäßsystem. Die Aktivierung der Angiogenese durch Umschalten des „angiogenetischen Switches“ wird durch verschiedene Signaltransduktionswege gesteuert. Monoklonale Antikörper gegen pro-angiogenetische Faktoren werden in der Therapie des kolorektalen Karzinoms bereits eingesetzt. Das System der Robo-Rezeptoren und ihrer Slit-Liganden ist an Angiogenese-Mechanismen beteiligt und konnte als differentiell exprimiert in verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen werden. In Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnten mittels DNA-Chiparray Analyse Robo1, Robo4 und Slit2 als differentiell exprimiert beim kolorektalen Karzinom nachgewiesen werden.

Ziel dieser Studie war die Validierung der differentiellen Expression mittels Real-Time Fluoreszenz PCR und Analyse der Expression von Robo1, Robo4 und Slit2 in situ im Gewebe sowie die Bewertung eines potentiellen Ziels einer antiproliferativen bzw. anti-angiogenetischen Tumorthherapie.

Material und Methoden:

Von 50 Patienten wurden postoperativ Proben von kolorektalem Tumor- und Normalgewebe kryoasserviert und makrodisseziert. Nach RNA-Isolierung und reverser Transkription wurde die quantitative Analyse der Genexpression von Robo1, Robo4 und Slit2 mittels Real-time PCR durchgeführt. Hierzu wurden spezifische Hybridisierungssonden eingesetzt, wobei als Referenzgen β -2-Mikroglobulin verwendet wurde. Die Expressionsdaten wurden mit dem Algorithmus der Relative Quantification Software ausgewertet. Für den histologischen Nachweis auf Paraffin-Gewebeschnitten wurden die Methoden der Immunhistochemie (IHC) bzw. In-Situ Hybridisierung (ISH) herangezogen. Die IHC und ISH wurde mittels einer Intensitätsskala bewertet. Dabei entsprach der Wert (+++) einer starken Anfärbung, der Wert (++) einer moderaten Anfärbung, der Wert (+) einer geringen Anfärbung und der Wert (+/-) einer nicht eindeutigen Färbung. Die Methoden der Real-Time PCR und der IHC wurden mittels der Spearman-Korrelationsanalyse auf Vergleichbarkeit geprüft. Dazu wurde die IHC Anfärbungsskala in einen Rangfolgenscore transformiert mit den Zahlenwerten 3 (+++), 2 (++), 1 (+) und 0,5 (+/-).

Ergebnisse:

Robo1 zeigte in der Real-Time PCR eine signifikante Überexpression bei 78% (39/50) der Patienten im Tumorepithel gegenüber dem Normalepithel. Robo4 ließ sich in 72% (36/50) der Patientenproben als überexprimiert im Tumorepithel nachweisen. In 68% (34/50) der Patientenprobenpaare war Slit2 im Tumorgewebe niedriger exprimiert als im Normalgewebe. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen UICC-Stadien und insbesondere zwischen den metastatischen Stadien UICC III/IV und den nicht metastatischen Stadien UICC I/II ließ sich weder für Robo1, Robo4 noch Slit2 ermitteln. Die IHC zeigte für Robo1 eine starke Expression in Tumorepithelzellen und Tumorgefäßen, wohingegen das Normalgewebe nur schwach angefärbt wurde. In der ISH ließ sich Robo1 sowohl in Tumorzellen als auch in den angrenzenden Gefäßstrukturen nachweisen. Robo4 zeigte in der Immunhistochemie und In-Situ Hybridisierung ausschließlich eine Anfärbung der Tumorendothelien. Slit2 zeigte immunhistochemisch kein spezifisches Färbungsmuster. Eine stärkere Anfärbung von Tumor- oder Normalgewebe ließ sich nicht ermitteln. Die Korrelationsanalyse ergab für die Real-Time PCR und IHC für Robo1 einen schwachen signifikanten Zusammenhang, für Robo4 einen schwachen signifikanten Zusammenhang und für Slit2 keinen signifikanten Zusammenhang.

Schlussfolgerung:

Die Überexpression von Robo1 und Robo4 im Tumor gegenüber Normalgewebe konnte mittels Real-Time PCR bestätigt werden. Robo1 und Robo4 sind damit als Tumoronkogene beim kolorektalen Karzinom anzusehen. Slit 2 zeigt eine herunter regulierte Expression im Tumorgewebe und damit das RNA-Expressionsmuster eines Tumorsuppressorgens jedoch ohne Bestätigung durch IHC. Robo1 zeigt in der IHC keine spezifische Gewebeanfärbung jedoch eine deutlich höhere Färbungsintensität im Tumorgewebe. Diese Tatsache bietet Potential für weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Tumorbilogie des kolorektalen Karzinoms und Möglichkeiten der therapeutischen Intervention. Die histologischen Gewebeanalysen haben insbesondere für Robo4 eine spezifische Expression in den Tumorgefäßen gezeigt. Robo4 stellt durch seine Gewebespezifität und einer direkten Beteiligung an der Angiogenese ein potentiell Ziel einer antiproliferativen bzw. anti-angiogenetischen Tumorthherapie beim kolorektalen Karzinom dar.

8. Anhang

Anhang Tabelle 1 : Robo1 Real-Time PCR Expressionsdaten

<u>Pat.-Nr.</u>	<u>N-Ratio Tumor</u>	<u>N-Ratio Normal</u>	<u>T/N</u>	<u>Pat.-Nr.</u>	<u>N-Ratio Tumor</u>	<u>N-Ratio Normal</u>	<u>T/N</u>
1	35,4	12	2,2	26	25,4	6,1	4,14
2	209	25,7	8,13	27	133	2,9	45,55
3	9,3	11,1	0,84	28	17,5	18	0,97
4	39,8	6,2	6,42	29	3,2	4	0,81
5	5,1	13,6	0,34	30	54,5	1,7	32,44
6	53	6,1	8,69	31	7,5	9,8	0,77
7	69,3	15,1	4,59	32	9,1	11	0,82
8	45	11,8	3,81	33	55,6	2,8	19,58
9	11,3	6,5	1,74	34	53,1	21,1	2,52
10	77,2	15,9	4,86	35	8,8	43,1	0,21
11	17,1	10,2	1,68	36	5,7	3,8	1,49
12	31	10,8	2,87	37	25,8	6,9	3,76
13	13,8	4,7	2,94	38	40,2	26,6	1,51
14	34,1	13,5	5,4	39	19	4,5	4,26
15	20,4	6,3	3,23	40	13,4	33	0,41
16	25,4	7,2	3,55	41	85,5	16,3	5,25
17	16,6	24,6	0,68	42	83,4	3,8	21,83
18	81,9	14,9	5,5	43	4,7	1,5	3,14
19	119	29,2	4,08	44	10	3,3	3,08
20	4,8	14	0,34	45	42,1	6,3	6,64
21	49,9	3,9	12,96	46	6,9	5,4	1,27
22	67,3	12,5	5,38	47	18,3	10,4	1,76
23	4,3	6,5	0,48	48	7,4	6,5	1,14
24	13	8,9	1,46	49	69,6	9,9	7,01
25	135	11,6	11,64	50	58,6	3,5	16,74

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht der N-Ratio Expressionsdaten von Robo1 der Tumor- und Normalgewebeproben. Der T/N-Quotient beschreibt den Quotient der Expressionswerte von Robo1 im Tumorgewebe und im Normalgewebe des gleichen Patienten.

Anhang Tabelle 2 : Robo4 Real-Time PCR Expressionsdaten

<u>Pat.-Nr.</u>	<u>N-Ratio Tumor</u>	<u>N-Ratio Normal</u>	<u>T/N</u>	<u>Pat.-Nr.</u>	<u>N-Ratio Tumor</u>	<u>N-Ratio Normal</u>	<u>T/N</u>
1	0,17	0,18	0,94	26	0,43	0,39	1,11
2	0,27	0,19	1,39	27	1,02	0,21	4,93
3	0,06	0,05	1,36	28	0,28	0,67	0,41
4	0,12	0,1	1,11	29	0,31	0,17	1,76
5	0,26	0,4	0,65	30	1,01	0,12	8,78
6	0,84	0,23	3,66	31	0,34	0,44	0,77
7	0,69	0,36	1,93	32	0,52	0,71	0,73
8	0,34	0,26	1,32	33	0,43	0,07	6,06
9	0,44	0,13	3,5	34	0,19	0,14	1,35
10	0,54	0,14	3,96	35	0,5	0,59	0,85
11	1,01	0,24	4,24	36	1,9	0,21	9,14
12	0,44	0,21	2,04	37	0,71	0,35	2,06
13	1,61	0,51	3,16	38	0,09	0,18	0,52
14	0,26	0,69	0,39	39	0,74	0,33	2,22
15	0,21	0,52	0,4	40	0,29	1,35	0,22
16	0,8	0,17	4,7	41	0,3	0,15	1,99
17	0,52	0,25	2,11	42	0,38	0,1	3,99
18	0,21	0,14	1,44	43	0,44	0,14	3,19
19	1,63	0,64	2,56	44	0,11	0,06	1,8
20	0,28	0,19	1,47	45	0,65	0,52	1,24
21	1,93	0,5	3,89	46	0,17	0,23	0,74
22	0,79	0,95	0,83	47	0,23	0,56	0,41
23	0,29	0,22	1,31	48	0,15	0,2	0,77
24	0,59	0,12	4,8	49	1,08	0,28	3,9
25	0,46	0,15	3,12	50	2,1	0,12	18,26

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht der N-Ratio Expressionsdaten von Robo4 der Tumor- und Normalgewebeproben. Der T/N-Quotient beschreibt den Quotient der Expressionswerte von Robo4 im Tumorgewebe und im Normalgewebe des gleichen Patienten.

+

Anhang Tabelle 3: Slit2 Real-Time Expressionsdaten

<u>Pat.-Nr.</u>	<u>N-Ratio Tumor</u>	<u>N-Ratio Normal</u>	<u>T/N</u>	<u>Pat.-Nr.</u>	<u>N-Ratio Tumor</u>	<u>N-Ratio Normal</u>	<u>T/N</u>
1	2,51	6,17	0,41	26	8,81	10,4	0,85
2	0,45	17	0,03	27	3,7	8,35	0,44
3	1,39	34,3	0,04	28	2,7	63,1	0,04
4	6,83	3,81	1,79	29	1,52	7,58	0,2
5	2,93	106	0,03	30	10,8	2,55	4,24
6	37,8	3,65	10,36	31	8,02	8,07	0,99
7	11,4	45,7	0,25	32	1,37	5,84	0,24
8	0,69	3,37	0,2	33	3,09	3,32	0,93
9	0,67	0,99	0,68	34	7,8	13,4	0,58
10	6,08	1,54	3,95	35	1,71	0,45	3,8
11	6,58	1,41	4,67	36	0,26	0,28	0,92
12	1,74	9,65	0,18	37	0,34	0,04	7,76
13	41,3	22,2	1,86	38	4,02	26,6	0,15
14	14,5	14,2	1,02	39	0,23	0,34	0,68
15	50,1	78,9	0,64	40	1,53	2,54	0,6
16	0,87	0,28	3,1	41	12,9	16,1	0,8
17	5,09	35	0,15	42	8,41	4,59	1,83
18	6,65	11,6	0,57	43	2,59	4,89	0,53
19	6,83	21,5	0,32	44	5,28	3,88	1,36
20	2,23	7,34	0,3	45	8,12	4,85	1,67
21	10,5	1,34	7,84	46	22,4	19,8	1,13
22	0,08	5,36	0,02	47	0,1	0,07	1,42
23	0,81	8,42	0,1	48	12,5	31,6	0,4
24	6,54	9,99	0,66	49	0,2	2,16	0,09
25	2,59	10,4	0,25	50	7,52	18,6	0,4

Tabelle 3: Tabellarische Übersicht der N-Ratio Expressionsdaten von Slit2 der Tumor- und Normalgewebeproben. Der T/N-Quotient beschreibt den Quotient der Expressionswerte von Slit2 im Tumorgewebe und im Normalgewebe des gleichen Patienten.

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 Gewebeprobe aus dem Tumor und eine Blutprobe. Die Blutprobe wird während des stationären Aufenthaltes gleichzeitig mit einer sowieso durchzuführenden Blutentnahme durchgeführt. Die Gewebeprobe werden ausschließlich während oder nach der Operation **nach Zchnitt 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 (RNA) 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

Einwilligungserklärung des Patienten 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 (RNA) nach 10 Jahren Aufbewahrungszeit vernichtet wird.

Unterschrift des Patienten Ort, Datum

9. Literaturverzeichnis

1. Schmiegel W et al. S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ (2008) *Z Gastroenterol*; 46:1-73
2. Batzler U et al. Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen 1. Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008
3. Boland C.R. Malignant Tumors of the Colon (1995) In Yamada T: Textbook of Gastroenterology, 2nd edition, J.B. Lipincott Philadelphia, S. 1967-2026
4. Fuchs, C.S. et al. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer: (1994) *N Engl J Med*:331 (25): 1669-1674
5. Almendingen K et al. Current diet and colorectal adenomas: a casecontrol study including different sets of traditionally chosen control groups. (2001) *Eur J Cancer Prev*; 10 (5): 395–406
6. Norat T et al. Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. (2002) *Int J Cancer*;98 (2): 241–256
7. Andrieu N et al. Familial relative risk of colorectal cancer: a population-based study. (2003) *Eur J Cancer*; 39 (13): 1904–1911
8. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. (2001) *Am J Gastroenterol*; 96 (10):2992–3003
9. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. (2001) *Gut*; 48 (4): 526–535
10. Riede UN, Schaefer HE, (1993) Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme, New York.
11. Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. (1990) *Cell* 61: 759-767.
12. Coates R.J., Greenberg, R.S., Liu, M.T. Anatomic site distribution of colon cancer by race and other colon cancer risk factors. (1995) *Dis. Colon Rectum*:38:42-50
13. Buhr HJ, Ritz JP Kolonkarzinom. In Siewert JR, Rothmund M, Schumpelick V Praxis der Visceralchirurgie Onkologische Chirurgie, 2. Auflage Springer Verlag Heidelberg, (2006) S.621-641.

14. Willis S, Schumpelick V Rektumkarzinom. In Siewert JR, Rothmund M, Schumpelick V Praxis der Visceralchirurgie Onkologische Chirurgie, 2. Auflage Springer Verlag Heidelberg (2006), S.621-659.
15. Jatzko G, Herbst F, Hauser H, et al. ACO-Manual: Consensusbericht kolorektales Karzinom. 1995.
16. Soreide O et al. International standardization and documentation of the treatment of rectal cancer. In: Soreide O, Norstein J (Hrsg). Rectal cancer surgery. Optimisation – standardization – documentation. Berlin Heidelberg New York: Springer, (1997): 405–445.
17. MacFarlane, JK, Ryall, RD, and Heald, RJ Mesorectal excision for rectal cancer. (1993) Lancet; 341(8843): 457-460.
18. Hermanek, P [Prognostic factors in colorectal carcinoma]. (1997) Zentralbl Chir; 122 Suppl (20-25).
19. Quasar Collaborative G et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomized study. (2007) Lancet; 370 (9604): 2020–2029
20. Francini G et al. Folinic acid and 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy in colon cancer. Gastroenterology (1994); 106 (4): 899–906
21. Expectancy or primary chemotherapy in patients with advanced asymptomatic colorectal cancer: a randomized trial. Nordic Gastrointestinal Tumor Adjuvant Therapy Group. (1992) J Clin Oncol; 10 (6): 904–911
22. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: Nature. (1975): Bd. 256, S. 495–497
23. Jakobovits A et al. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. (2007) Nature Biotechnology 25, 1134 - 1143
24. Spano JP et al.: Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. (2005) Ann Oncol Jan;16(1):102-8
25. Jean GW, Shah SR: Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies for the treatment of metastatic colorectal cancer. (2008) Pharmacotherapy Jun;28(6):742-54.
26. Cunningham, D., et al. BOND-1 Study : (2004) N. Engl. J. Med. 351, 337
27. Van Cutsem E et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. (2007) J Clin Oncol; 25 (13): 1658–1664
28. Amado R, Wolf M, Peeters M. Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. (2008) J Clin Oncol; 26: 1626–1634

29. Bendardaf R et al. VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage, and long-term disease-specific survival. (2008) *Anticancer Res* Nov-Dec; 28(6B):3865-70.
30. Kabbinavar FF et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. (2005) *J Clin Oncol*; 23 (16): 3697–3705
31. Hurwitz H et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. (2004) *N Engl J Med*; 350 (23): 2335–2342
32. Giantonio BJ et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. (2007) *J Clin Oncol*; 25 (12): 1539–1544
33. Sullivan DC, Bicknell R New molecular pathways in angiogenesis. (2003) *Brit J Cancer* 89, 228 – 231
34. Folkman, J. Clinical application of research on angiogenesis. (1995) *N Engl J Med*(b:333:1757-1763
35. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. (2004) *Dev Dyn*; 231(3):474–488
36. Rafi S, et al. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for antiangiogenesis therapy?; (2002) *Nat Rev Cancer* 2(11):826–835
37. Vajkoczy P, et al. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. ; (2002) *J Clin Invest* 109(6):777–785
38. Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. (2003) *Nat Rev Cancer*;(1997) *Int J Cancer*. Aug 22;74(4):455-8.
39. Wicki A, Christofori G. The Angiogenetic Switch in Tumorigenesis In: *Tumorangiogenesis Basic Mechanisms and Cancer Therapie* 1. Auflage Springer Verlag Heidelberg 2008. S66-88
40. Obermair A, Kucera E, Mayerhofer K et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer: correlation with disease-free survival. (1997) *Int J Cancer* Aug 22;74(4):455-8

41. Takanami I, Tanaka F, Hashizume T, Kodaira S Vascular endothelial growth factor and its receptor correlate with angiogenesis and survival in pulmonary adenocarcinoma. (1997) *Anticancer Res* Jul-Aug; 17(4A):2811-4.
42. Brown LF et.al. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. (1993) *Am J Pathol* 143:1255–1262 issn: 0002–9440
43. Sowter HM et al. Expression and localization of the vascular endothelial growth factor family in ovarian epithelial tumors. (1997) *Lab Invest* 77:607–614
44. Yamamoto S et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. (1997) *Br J Cancer* 76:1221–1227
45. Guidi AJ et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma. (1996) *Cancer* 78:454–460 issn: 0008–0543x
46. Frank S et al. Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. (1995) *J Biol Chem* 270:12607–12613
47. Cohen T et al. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. (1996) *J Biol Chem* 271:736–741 issn: 0021–9258
48. Suri C et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. (1996) *Cell* 87:1171–1180
49. Partanen et al. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. (1992) *Mol Cell Biol* 12:1698–1707
50. Augustin HG, Fiedler U Regulation of Angiogenesis and Vascular Homeostasis Through the Angiopoietin/Tie System In: Marmé D, Fusening N *Tumorangiogenesis Basic Mechanisms and Cancer Therapie* 1. Auflage Springer Verlag Heidelberg 2008 S. 109-121
51. Reusch et al. Identification of a soluble form of the angiopoietin receptor TIE-2 released from endothelial cells and present in human blood. (2001) *Angiogenesis* 4:123–131
52. Hughes P et al. Angiopoietin-2 Antagonists for Anti-Angiogenic Therapy In: Marmé D, Fusening N *Tumorangiogenesis Basic Mechanisms and Cancer Therapie* 1. Auflage Springer Verlag Heidelberg 2008 S. 453-464
53. Chung YC, Hou YC, Chang CN, Hseu TH Expression and prognostic significance of angiopoietin in colorectal carcinoma. (2006) *J Surg Oncol* Dec 1; 94(7):631-8.

54. Nakayama T et al. Expression of angiopoietin-1, 2 and 4 and Tie-1 and 2 in gastrointestinal stromal tumor, leiomyoma and schwannoma. (2007) *World J Gastroenterol*. Sep 7; 13(33):4473-9.
55. Rosen LS et al. First-in-human study of AMG 386, a selective angiopoietin1/2-neutralizing peptibody, in adult patients with advanced solid tumors. (2007) *J of Clin Oncol*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 3522
56. Kidd T et al Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. (1998) *Cell* 92:205–215
57. Vargesson, et al. Expression patterns of Slit and Robo family members during vertebrate limb development. (2001) *Mech Dev* 106(1-2): 175-80.
58. Latil, A et al. Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. (2003) *Int J Cancer* 103(3): 306-15
59. Kidd T, Bland KS, Goodman CS Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. (1999) *Cell* 96:785–794
60. Sabatier C et al. The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. (2004) *Cell* 117:157–169
61. Narayan G, Goparaju C, Arias-Pulido H et al. Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit–Robo genes in cervical cancer progression. (2006) *Mol Cancer* 5:16
62. Dallol A, Forgacs E, Martinez A et al. Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the *Drosophila* Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers *Oncogene* (2002) 21:3020–3028
63. Latil A, Chêne L, Cochant-Priollet B et al. Quantification of expression of netrins, Slits and their receptors in human prostate tumours. (2003) *Int J Cancer* 103:306–315
64. Wang B, Xiao Y, Ding BB et al. Induction of tumour angiogenesis by Slit–Robo signalling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. (2003) *Cancer Cell* 4:19–29
65. Abdollahi A, Schwager C, Kleeff J et al. Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12890–12895

66. Huminiecki, L., M. Gorn, et al. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. (2002) *Genomics* 79(4): 547-52.
67. Seth P, Lin Y, Hanai JI et al. Magic roundabout, a tumor endothelial marker: expression and signaling. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* 332:533–541
68. Okada Y, Yano K, Jin E et al. A three-kilobase fragment of the human Robo4 promoter directs cell type-specific expression in endothelium. (2007) *Circ Res* 100:1712–1722
69. Sheldon H et al. Active involvement of Robo1 and Robo4 in filopodia formation and endothelial cell motility mediated via WASP and other actin nucleation-promoting factors. (2009) *FASEB J* 23(2):513-22.
70. Suchting S, Heal P, Tahtis K et al. Soluble Robo4 receptor inhibits in vivo angiogenesis and endothelial cell migration. (2005) *FASEB J* 19:121–123
71. Morlot C, Thielens NM, Ravelli RB et al. Structural insights into the Slit–Robo complex. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14923–14928
72. Marron MB, Singh H, Tahir TA et al. Regulated proteolytic processing of Tie1 modulates ligand responsiveness of the receptor tyrosine kinase Tie2. (2007) *J Biol Chem* 282:30509–30517
73. Legg J, Herbert J, Clissold P, Bicknell R Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. (2008) *Angiogenesis* 11:13–21
74. Gröne J, Doeblner O, Loddenkemper C et al. Robo1/Robo4: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer. (2006) *Oncol Rep* 15:1437–1443
75. Kidd T, Bland KS, Goodman CS Slit is the midline repellent for the Robo receptor in *Drosophila*. (1999) *Cell* 96(6):785-94.
76. Klein, R. Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands. (2001) *Curr Opin Cell Biol* 13(2): 196-203
77. Park, K. W., D. Crouse, et al. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(46): 16210-5
78. Torres-Vazquez, J., A. D. Gitler, et al. Semaphorin-plexin signaling guides patterning of the developing vasculature. (2004) *Dev Cell* 7(1): 117-23.
79. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. (1995) *Lancet*, 345, 939-944
80. Moertel, C.G., Fleming, T.R., Macdonald, J.S. et al. Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. (1990) *N Engl J Med*, 322, 352-358

81. Ito H, Funahashi S, Yamauchi N, et al. Identification of ROBO1 as a novel hepatocellular carcinoma antigen and a potential therapeutic and diagnostic target. (2006) *Clin Canc Res*. Jun 1; 12(11 Pt 1):3257-64.
82. Avci ME, Konu O, Yagci T Quantification of SLIT-ROBO transcripts in hepatocellular carcinoma reveals two groups of genes with coordinate expression. (2008) *BMC Cancer* Dec 29; 8:392.
83. Lee CH, Fang CY, Sheu JJ et al. Amplicons on chromosome 3 contain oncogenes induced by recurrent exposure to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and sodium n-butyrate and Epstein-Barr virus reactivation in a nasopharyngeal carcinoma cell line. (2008) *Canc Gen Cytogen*. Aug;185(1):1-10.
84. Tie J, Pan Y, Zhao L, et al. Mir-218 inhibits invasion and metastasis of gastric cancer by targeting the Robo1 receptor. (2010) *PLoS Genet*. Mar 12;6(3):e1000879.
85. Görn M, Anige M, Burkholder I et al. Serum levels of Magic Roundabout protein in patients with advanced non-small cell lung carcinoma (NSCLC). (2005) *Lung Cancer* 49:71–76
86. Bedell VM, Yeo SY, Park KW et al. Roundabout4 is essential for angiogenesis in vivo. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6373–6378
87. Jones CA, London, NR, Chen H et al. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. (2008) *Nat Med*. Apr;14(4):448-53. Epub 2008 Mar 16
88. Huang L, Yu W, Li X et al. Expression of Robo4 in the fibrovascular membranes from patients with proliferative diabetic retinopathy and its role in RF/6A and RPE cells. (2009) *Mol Vis*. May 29; 15:1057-69.
89. Morlot C, Thielens NM, Ravelli RB et al. Structural insights into the Slit–Robo complex. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14923–14928
90. Park KW, Morrison CM, Sorensen LK et al. Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial cell migration. (2003) *Dev Biol* 261:251–267
91. Watts R, Wu Y, Koch A et al. Patent title: Anti-Robo4 Antibodies and uses therefore (2008) <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2008100805>
92. Hohenester E, Hussain S, Howitt JA Interaction of the guidance molecule Slit with cellular receptors. (2006) *Biochem Soc Trans* 34:418–421
93. Li HS et al. Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. (1999) *Cell* 96:807–818

94. Wang KH et al Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching. (1999) *Cell* 96:771–784
95. Wu, J. Y., Feng, L., Park, H. T. et al. The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors. (2001) *Nature* 410: 948–952.
96. Georgas, K., Burridge, L., Smith, K., et al. Assignment of the human slit homologue SLIT2 to human chromosome band 4p15.2. (1999) *Cytogenet Cell Genet*, 86: 246–247.
97. Shivapurkar, N., Maitra, A., Milchgrub, S et al. Deletions of chromosome 4 occur early during the pathogenesis of colorectal carcinoma. (2001) *Hum. Pathol.* 32: 169–177.
98. Shivapurkar, N., Virmani, A. K., Wistuba, I. et al. Deletions of chromosome 4 at multiple sites are frequent in malignant mesothelioma and small cell lung carcinoma. (1999) *Clin. Cancer Res.*, 5: 17–23.
99. Shivapurkar, N., Sood, S., Wistuba, I. I., et al. Multiple regions of chromosome 4 demonstrating allelic losses in breast carcinomas. (1999) *Cancer Res.*, 59: 3576–3580.
100. Dallol, A., N. F. Da Silva, et al. SLIT2, a human homologue of the *Drosophila* Slit2 gene, has tumor suppressor activity and is frequently inactivated in lung and breast cancers. (2002) *Cancer Res* 62(20): 5874-80
101. Dallol, A., D. Morton, et al. SLIT2 axon guidance molecule is frequently inactivated in colorectal cancer and suppresses growth of colorectal carcinoma cells. (2003) *Cancer Res* 63(5): 1054-8.
102. Wong, K., Ren, X. R., Huang, Y. Z., et al. Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. (2001) *Cell*, 107: 209–221.
103. Stein, E., and Tessier-Lavigne, M. Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. (2001) *Science* 291: 1928–1938.
104. Forcet, C., Ye, X., Granger, L., et al. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 3416–3421.
105. Zheng D, Liu BB, Liu YK, et al. Analysis of the expression of Slit/Robo genes and the methylation status of their promoters in the hepatocellular carcinoma cell lines. (2009) *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. Mar; 17(3):198-202. Chinese.
106. Jin J, You H, Yu B, et al. Epigenetic inactivation of SLIT2 in human hepatocellular carcinomas. (2009) *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 30;379(1):86-91. Epub 2008 Dec 17.

107. Algire GH, Chalkley HW Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. (1945) *J Natl Cancer Inst* 6:73–85
108. Gerber HP, Baldwin M, Shojaei Vascular Endothelial Growth Factor Antibodies for Anti-Angiogenic Therapy (2008) In: Marmé D, Fusening N *Tumorangiogenesis Basic Mechanisms and Cancer Therapie* 1. Auflage Springer Verlag Heidelberg 2008 S. 387-390
109. Howdieshell TR, Callaway D, Webb WL, et al. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. (2001) *J Surg Res* 96:173–182
110. Zhou YJ, Xiong YX, Wu XT, et al. Inactivation of PTEN is associated with increased angiogenesis and VEGF overexpression in gastric cancer. (2004) *World J Gastroenterol* 10:3225–3229
111. Wedge S, Jürgensmeier J. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Cancer (2008) In: Marmé D, Fusening N *Tumorangiogenesis Basic Mechanisms and Cancer Therapie* 1. Auflage Springer Verlag Heidelberg 2008 S. 387-390
112. Dreves J, Siegert P, Medinger M, et al. Phase I clinical study of AZD2171, an oral, highly potent VEGF signaling inhibitor, in patients with advanced solid tumors. (2007) *J Clin Oncol*. Jul 20;25(21):3045-54.
113. Oliner J, Min H, Leal J, et al. Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. (2004) *Cancer Cell* 6:507–516
114. Popkov M, Jendreyko N, McGavern et al. Targeting tumor angiogenesis with adenovirus-delivered anti-Tie-2 intrabody. (2005) *Cancer Res* 65:972–981
115. Chen H, Herndon ME, Lawler J The cell biology of thrombospondin-1. (2000) *Matrix Biol* 19:597–614
116. Dawson DW, Bouck NP Thrombospondin as an inhibitor of angiogenesis. (1999) In: Teicher BA (ed) *Antiangiogenic agents in cancer therapy*. Humana, Totowa, NJ, pp 185–203
117. Bocci G, Francia G, Man S et al. Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12917–12922

- 118.** Yap R, Veliceasa D, Emmenegger U et al. Metronomic low-dose chemotherapy boosts CD95-dependent antiangiogenic effect of the thrombospondin peptide ABT-510: a complementation antiangiogenic strategy. (2005) *Clin Cancer Res* 11:6678–6685
- 119.** Khanna A, Plummer M, Bromberek C et al. Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporinenephrotoxicity. (2002) *Kidney Int* 62:2257–2263.
- 120.** Yang XM, Han XM, Sui F et al. Slit-Robo signaling mediates lymphangiogenesis and promotes tumor lymphatic metastasis. (2010) *Biochem Biophys Res Commun.* May 28; 396 (2): 571-7

10. Lebenslauf

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

11. Publikationsverzeichnis

Groene J, **Doebler O**, Loddenkemper C, Hotz B, Buhr H-J, Bhargava S
Robo1/Robo4: Differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer
Oncol Rep. 2006 Jun; 15(6):1437-43

Doebler O, Groene J
ROBO1 (roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila))
Atlas Genet Cytogene Oncol Haematol. December 2008.
URL <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/ROBO1ID42140ch3p12.html>

Doebler O, Spierer R
The Cutaneous Groin Flap for Coverage of a Full-Thickness Abdominal Wall Defect.
Handchir Mikrochir Plast Chir. 2010 Aug;42(4):266-9. Epub 2010 Jun 30.

Doebler O, Stechemesser B, Bauknecht K-J, Spierer R
Reconstruction of Complex Abdominal Wall Defects Using Bioprosthetic Mesh Material As Fascia Support Within
Patients With Severe Immunodeficiency
Plast Reconstr Surg: August 2010 - Volume 126 - Issue 2S - pp 716-717

Schellhaas E, **Döbler O**, Kroesen AJ, Buhr HJ, Hotz HG
Gangrenous intrathoracic appendicitis, a rare cause of right-sided chest pain: report of a case.
Surg Today. 2010 Sep;40(9):874-7. Epub 2010 Aug 26.

Posteröffentlichungen:

Doebler O, Gröne J, Buhr H-J, Bhargava S
Robo1 and Robo4: Validation of differentially expressed genes associated with angiogenesis in colorectal cancer
Digestive Disease Week 2005, Chicago, USA 14.05.05-19.05.05

Doebler O, Pramono S, Zacharias M, Spierer R
Plastisch-Chirurgische Defektdeckung mittels M. gracilis Lappenplastik nach Fournier'scher Gangrän
Nordkongress Urologie 2010, Potsdam 17.06.10-19.06.10

12. Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Buhr für die Möglichkeit danken, meine Dissertation in der Chirurgischen Klinik I der Charité – Universitätsmedizin Berlin – Campus Benjamin Franklin zu erarbeiten.

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

Ich bedanke mich bei Frau Dr. rer. medic. Sarah Bhargava und dem medizinisch-technischen Assistentenpersonal des chirurgischen Forschungslabors Charité-Campus Benjamin Franklin.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden Jessica Dienst, Safi Khalil, Jessica Olschewski, Tim Rumler und Jana Schlangen für eine tolle Studienzeit vom ersten bis zum letzten Tag.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern Dietmar Döbler und Claudia Döbler-Golinar für lebenslange liebevolle Unterstützung und eine starke Familie bedanken und Nina Chinju Uszkureit für ständige Motivation durchzuhalten.

