Aus der Klinik für Chirurgie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung glykosylierungsspezifischer Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe beim Kolonkarzinom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefan Wonka

aus Dresden

Datum der Promotion: 04.09.2015

Inhaltsverzeichnis

Zusammen	ıfassung	V
Abstract		VII
Abkürzung	gsverzeichnis	IX
1. Einleitu	ng	1
1.1 D	as kolorektale Karzinom (KRK)	1
1.1.1	Epidemiologie und Symptome	1
1.1.2	Risikofaktoren	2
1.1.3	Pathogenese	3
1.1.4	Klassifikation und Stadieneinteilung	4
1.1.5	Histologische Typisierung und Grading	6
1.1.6	Screening	6
1.1.7	Therapie	8
1.1.8	Prognose	9
12 G	lukano	11
1.2 0	Sialincäuren	
1.2.1	Biosynthese der Sialinsäuren	13
1.2.3	Biologische Funktion von Sialinsäure tragenden Glykanen in humanen	n Gewebe
1.3 M	licroarraytechnologie (MA-Technologie)	17
1.4 Z	ielstellung	
1.5 A	uswahl der zu untersuchenden Gene	
2. Material	und Methoden	
21 Million III		
2.1 P	attentenkouektiv	23
$2.2 \qquad M$	laterialien	24
2.2.1	Chemikalien und Lösungen	24
2.2.2	Puffer- und Lösungsansätze	25
2.2.3	Labortechnisches Zubehör	26
2.2.4	Primer und Antikörper	27
2.3 M	lethoden	28
2.3.1	RNA Isolation aus humanem Kolongewebe	
2.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	
2.3.	2.1 Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA)	29
2.3.	2.2 Funktionsweise der quantitativen real time PCR	29
2.3.	2.3 Primer	
2.3.	2.4 Durchführung der quantitativen real time PCR Methode	32
2.3.	2.5 Light Cycler-System	35
2.3.	2.6 Auswertung der Ergebnisse	36
2.3.3	Immunhistochemie	37
2.3	3.1 Die ABC-Methode	37
2.3	3.2 Protokoll der immunhistochemischen Färbung	39
2.3	3.3 Permeabilisierung	
2.3	3.4 Auswertung der Ergebnisse	
2.3.4	Statistik	44

3. Ergeb	nisse	45
3.1	Deskriptive Analyse der mittels qRT-PCR untersuchten Gene	45
3.1.	1 Deskriptive Analyse des Target Gens GNE	46
3.1.	2 Deskriptive Analyse des Target Gens NANP	47
3.1.	3 Deskriptive Analyse des Target Gens ST6GALNAC1	48
3.1.	4 Deskriptive Analyse des Target Gens ST3GAL4	49
3.1.	5 Deskriptive Analyse des Target Gens FUT3	50
3.1.	6 Deskriptive Analyse des Target Gens UGT2B17	51
3.1.	7 Deskriptive Analyse des Target Gens HS6ST2	52
3.1.	8 Zusammenfassung der Analyseergebnisse	53
3.2	Deskriptive Analyse der vorliegenden MA- Ergebnisse für die zu untersuchend	len 51
2.2	1 Deekriptive Analyse des Terget Cons CNE	54 54
3.2.	2 Deskriptive Analyse des Target Gens NAND	
3.2.	2 Deskriptive Analyse des Target Gens NAMP	55 56
3.2.	4 Deskriptive Analyse des Target Gens STOCALINACT	50 57
3.2.	5 Deskriptive Analyse des Target Gens EUT3	
3.2.	6 Deskriptive Analyse des Target Gens I/GT2P17	
3.2.	 Deskriptive Analyse des Target Gens US6ST2 Deskriptive Analyse des Target Gens US6ST2 	
3.2.	7 Deskippive Analyse des Taiget Gens 1150512	00 61
3.2.	V Li L D A LA L V V L D L CL V L D L CL V L L L M A L	01
3.3	Vergleichende Beirachlung der ermitietten Fold Changes betaer Methoden	01
3.4	Untersuchung der Kongruenz beider Analyseverfahren	
3.4.	1 Ermittlung der Art des Zusammenhanges zwischen den erhobenen qRT-PCI	<u></u>
2.4	Ergebnissen und den vorliegenden MA- Ergebnissen	62
3.4.	2 Ermittlung des Grades des Zusammenhanges zwischen den einzelnen Messi	eihen
2.4	der erhobenen qRT-PCR- Daten mit den vorliegenden MA- Daten	64
3.4.	3 Ermittlung des Grades des Zusammenhanges zwischen den Fold Changes (F der Messreihen beider Messmethoden	N/T) 66
25	Emittlung signifikantar Unterschiede der Consumersion zwischer Normal u	nd
5.5	Ermultung signifikanter Unterschiede der Genexpression zwischen Normal- u. Tumorganaba	nu 68
35	1 Wilcovon Test CNE	00 68
3.5	2 Wilcovon Test - NANP	08 70
3.5	2 Wilcoxon Test - STEGALNAC1	70 71
3.5	A Wilcovon Test - ST3GALA	71 72
3.5	5 Wilcoxon Test - FUT3	72 73
3.5	6 Wilcovon Test - UGT2B17	73 74
3.5	7 Wilcovon Test - HS6ST2	75
3.5	 Wheevold Test - HS0512 Supervision and State and S	75
5.5.	Tumorgewebe	75
3.6	Analyse der immunhistochemischen Färbungen	76
3.6.	1 Immunhistochemische Auswertung – Primär Antikörper ST6GALNAC1	76
3.6.	2 Immunhistochemische Auswertung – Primär Antikörper NANP	80
4. Disku	ssion	83
4.1	Grundlage und Bedeutung der Untersuchungen	83
12	Finardnung dar Fraghnissa in dan darzaitigan Wissansstand	Q /
ч.4 Д Э	1 GNF	 04 8/1
— /.		····· 0 1

 4.2.3 ST6GALNAC1 4.2.4 ST3GAL4 und FUT3 4.2.5 UCT2P17 	. 89 . 91
4.2.4 ST3GAL4 und FUT3	.91
4.2.5 UCT2P17	
4.2.3 UG12D1/	.94
4.2.6 HS6ST2	.96
4.3 Diskussion zum Ergebnisvergleich zwischen MA und qRT-PCR	.98
Abbildungsverzeichnis	101
Tabellenverzeichnis1	103
Literaturverzeichnis	104

Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist in der "westlichen Hemisphäre" eines der häufigsten Krebstodesursachen. Die Bildung und Absiedlung von Metastasen wird durch veränderte Zelloberflächenglykosylierung der Tumorzelle begünstigt. Dabei spielen sialierte und fucosylierte Glykane wie Sialyl-Tn und Sialyl-Lewis-x und -a eine tragende Rolle bei der Adhäsion an Gefäßendothelien. Eine Vielzahl von Enzymen ist notwendig, um die Bildung dieser antigenen Strukturen hervorzubringen. Es existieren bisher nur wenig Daten zum Expressionsverhalten jener Gene, deren Genprodukte nachweislich für die Synthese von Sialyl-Tn sowie Sialyl-Lewis-x und -a beim kolorektalen Karzinom verantwortlich sind.

Dieser Arbeit ging eine Studie mittels Microarraytechnologie voraus, welche mehrere hundert Gene auf Expressionsverhalten zwischen Normal- und Tumorgewebe beim kolorektalen Karzinom (Stadium UICC I und II) untersuchte. Die Validierung dieser Microarraydaten mittels quantitativer real time Polymerasekettenreaktion stellt ein Ziel der vorliegenden Arbeit dar. Dazu wurden 5 Gene (GNE, NANP, ST6GALNAC1, ST3GAL4 und FUT3) ausgewählt, die bei der MA-Analyse signifikante Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe zeigten und an der Bildung der genannten Liganden beteiligt sind. Ausserdem wurden die zwei Gene (UGT2B17 und HS6ST2) nachuntersucht, die den größten positiven und negativen Expressionsunterschied zwischen den Geweben aufwiesen. Für ST6GALNAC1 und NANP wurde zudem eine Proteinexpressionsanalyse mittels Immunhistochemie durchgeführt, um deren Genexpressionsverhalten auf Proteinebene zu bestätigen.

Die MA-Ergebnisse konnten zu weiten Teilen durch hochsignifikante Korrelationen bestätigt werden. Für vier der sieben untersuchten Gene konnten mit Hilfe des Wilcoxon Testes hochsignifikante Unterschiede der Genexpression zwischen Normal- und Tumorgewebe ermittelt werden.

Der Verdacht, dass NANP möglicherweise ein bisher unbekannter molekularer Biomarker für das Kolonkarzinom ist, konnte aufgrund mangelnder Proteinexpression von NANP im Tumorepithel nicht bestätigt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ST6GALNAC1, welches bekannterweise an der Synthese des Sialyl-Tn-Antigens beteiligt ist, beim Kolonkarzinom in seiner Gen- und Proteinexpression abnimmt. Da Sialyl-Tn bereits in mehreren Studien vermehrt auf kolorektalen Karzinomen gefunden wurde, liegt der Verdacht nahe, dass ST6GALNAC1 bei diesem Tumorleiden nicht für die Synthese von Sialyl-Tn verantwortlich ist.

Hochinteressant und noch nie zuvor beschrieben ist der Genexpressionsverlust von UGT2B17 beim Kolonkarzinom. Eine Grundlage für neue Therapieoptionen?

Für die Gene GNE, ST3GAL4 und FUT3 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe ermittelt werden, jedoch bieten diese Gene mögliche Therapieansatzpunkte, da sie nachweislich an der Sialinsäurebiosynthese bzw. der Expression von Sialy-Lewis x und a beteiligt sind. Die vorliegende Arbeit dient der Grundlagenforschung um mögliche Angriffspunkte für neuartige Therapieverfahren offen zu legen.

Abstract

In western civilized countrys colorectal cancer (CRC) is one of the main cancer related causes of death. Alteration of cell surface glycosylation is told to be one reason of metastatic development. Sialylated and fucosylated glycans, like Sialyl-Lewis x an a, such as Sialyl Tn, play an important roll as ligands for adhasion to vascular endothelial tissue. For generating these ligands, a variety of enzyms is inalienable. Still, little is known about gene expression of those gens in CRC, which are responsible for the synthesis of Sialyl Tn and Sialyl Lewis x and a.

In a previous study a gene expression analysis on tissue of normal and cancerous mucosa of the colorectum (stage UICC I and II) was conducted, using microarray technology. One aim of this work was the validation of the present data using real time PCR. The examination was made with 5 genes (GNE, NANP, ST6GALNAC1, ST3GAL4 and FUT3), which showed significant differences in gene expression between the tissues on the microarray and are responsible for the synthesis of the mentioned ligands. In addition, two genes (UGT2B17 and HS6ST2) were examined, showing the biggest postive and negative difference in gene expression between the tissues. To find out if gene expression behaviour is also seen on protein level, immunhistochemical staining with ST6GALNAC1 and NANP was conducted.

Mostly, a high significant correlation between the data of the two studies was found. Using the Wilcoxon test, high significant differences in gene expression between the tissues was found for four of the seven investigated genes.

NANP could not be confirmed to be an unknown molecular biomarker for colon cancer, showing poor protein expression in cancerous mucosa.

Futhermore, this study reveals the loss of gene and protein expression of ST6GALNAC1 in cancerous colonic mucosa. As previous studies showed, the enzyme ST6GALNAC1 is part of sythesising the Sialyl Tn antigen, an antigen often detected on CRC and marker for poor prognosis. This study supposes ST6GALNAC1 not beeing responsible for the Sialyl Tn expression on CRC.

Exciting and never mentioned in any study before was the decrease in gene expression of UGT2B17 in cancerous colonic mucosa. Base for new therapies?

No significant difference in gene expression between normal and cancerous colonic mucosa was found for GNE, ST3GAL4 and FUT3. Anyway, these genes might be an interesting target for new therapeutic methods, because they are involded in the

biosythesis of sialic acids or the sythesis of Sialyl-Lewis x and a. The fundamental research in this study was done to find new potential targets for the treatment of CRC.

Abkürzungsverzeichnis

ad	addieren								
AK	Antikörper								
APC	Adenomatous polyposis coli								
AS	antisense								
Asn-X-Thr/Ser	Asparagin– X (steht für jede Aminosäure außer Prolin- Threonin/Serin)								
ATP	Adenosintriphosphat								
bidest.	2-fach destilliertes Wasser								
bzw.	beziehungsweise								
C2-Position	2. Kohlenstoff am Molekül								
cDNA	komplementäre Desoxvribonukleinsäure								
Chromosom 12a	g steht für den langen Arm des Chromosom 12								
Chromosom 17p	p steht für den kurzen Arm des Chromosom 17								
CMP	Cvtidinmonophosphat								
CTP	Cytidintriphosphat								
DCC-Gen	Digital Command Control – Gen								
dest	destilliert								
Diag	Diagnose								
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat								
FDTA	Ethylendiamin-tetraacetat								
FR	Endonlasmatisches Retikulum								
FΔP	Eamiliäre adenomatöse Polynosis								
FLITS	Fucosyltransferase 3 (galactoside3(4)-L-fucosyltransferase Lewis								
1013	blood aroup)								
Gal	Galaktoso								
GloNA	N Acetulalukocamin								
	N- Acetyigiukosainiin Cluguropot								
GICUA	UDD N Apptylationspecific 2 primeropa/N Apptylappopagiakingspec								
	UDP-IN-Acetylgiucosamin-2-epimerase/in-Acetylmannosaminkinase								
	Hereditates non-polyposes kolorektales karzinom								
	Reparansular 0-0-Sullotransierase 2								
	NIIOUdiion								
	v-Ri-rasz Rirsten rat sarcoma viral oncogene nomolog								
	KOIOTEKIAIES KAIZINOM								
	Mieroerrey								
	Microarray								
	N-Acetyl-Mannosamin								
ManNAC-6-P	N-Acetyl-Mannosamin-6-Phosphat								
MIRNA									
MIA	Medizintechnische(r) Assistent(in)								
N	Normalgewebe								
NaCl	Natriumchlorid								
NANP	Neu5Ac-9-Phosphat-Phosphatase								
NCAM	neuronales Zelladhäsionsmolekül								
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)								

OST	Oligosaccharyltransferase
p53	p steht für Protein; 53 für sein Molekulargewicht von 53kDa
PCR	Polymerasekettenreaktion
Prim.	primär
Prod.	produced
PSA	Polysialinsäuren
qRT-PCR	quantitative real time Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
S	sense
Sek.	sekundär
Sog.	sogenannt
ST3GAL4	beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4
ST6GALNAC1	(alpha-N-Acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-
т	
TBS	Tris- Buffered Saline
TGF-beta-II	Transforming growth factor II
TNM – System	engl "tumor", "node" und "metastasis"- System
Tumorlokal.	Tumorlokalisation
UDP-GIcNAc	Uridindiphosphat N-Acetylglucosamin
UGT2B17	UDP Glucoronosyltransferase 2, Polypeptid B17
UICC	International Union Contre le Cancer
V-Ki-ras2	Kirsten rat sarcoma-2 viral
Xyl	Xylose

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom (KRK)

Deutschlandweit versterben jährlich mehr als 25000 Menschen an Darmkrebs, womit Darmkrebs die zweithäufigste Krebstodesursache darstellt. Über 95% dieser Tumore entstehen im Dickdarm (lat. Intestinum crassum). Bei 90% aller malignen Tumore des Dickdarms handelt es sich um Adenokarzinome, welche aus dem Drüsenapparat des Dickdarmepithels hervorgehen ¹. Das in der medizinischen Fachwelt unter dem Namen kolorektales Karzinom geführte Tumorleiden bezieht sich auf die Darmabschnitte des Blinddarms (Zökum), des Grimmdarms (Kolon) und des Enddarms (Rektum).

1.1.1 Epidemiologie und Symptome

Das KRK ist weltweit eines der häufigsten Karzinome mit oft ungünstiger Prognose, da es in der Regel viele Jahre symptomlos wächst, daher unentdeckt bleibt und bei gut einem Viertel der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits metastasiert ist. Es ist deutschlandweit das dritthäufigste Karzinom beim Mann (nach dem Prostatakarzinom und Bronchialkarzinom) und das zweithäufigste der Frau (nach dem Mammakarzinom). Laut den Zahlen des Robert Koch Institutes von 2010 erkranken jährlich in Deutschland mehr als 60000 Menschen an dieser Tumorerkrankung. Die Inzidenz liegt bei über 70/100000 Einwohner pro Jahr, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen. Die stetig steigende Inzidenzrate in den westlichen Industrienationen sowie sein seltenes Erscheinungsbild in Entwicklungsländern deutet auf die ätiologische Bedeutung zivilisationsabhängiger Umweltfaktoren hin. Die Stadtbevölkerung ist stärker betroffen als die Landbevölkerung¹. Das KRK ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters, da 90% dieser Tumore nach dem 50. Lebensjahr auftreten. Die Inzidenz im 8. Lebensjahrzehnt liegt bei 400/100000 Einwohnern pro Jahr². Laut Statistischem Bundesamt beträgt das Risiko eines Deutschen, im Laufe seines Lebens an Darmkrebs zu erkranken, etwa 6%, von denen ca. 40-50% an der Krankheit versterben. Aufgrund des Mangels an Frühsymptomen wird das KRK zumeist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Plötzlicher Gewichtsverlust, Anämie (bedingt durch okkulte Blutungen), über einen längeren Zeitraum andauernder Meteorismus, kolikartige Schmerzen sowie plötzliche Änderung der Stuhlgewohnheiten im Alter über 40 Jahren sind unspezifische Symptome, die im Zusammenhang mit einem KRK stehen können

1

und deshalb unbedingt abklärungsbedürftig sind. Bleistiftstuhl sowie paradoxe Diarrhoen sind typisch für stenosierend wachsende Tumore. Ein sehr häufiges Symptom ist die Blutbeimengung im Stuhl, hauptsächlich bei Tumoren, die das Rektum befallen, sowie schleimiger Faeces. Bei Karzinomen in fortgeschrittenen Stadien kann es bei zunehmender Stenosierung zu einem Ileus kommen. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren ist die Infiltration von Nachbarorganen, wie Harnblase, Ureter, Vagina oder Sakralmark möglich ¹.

1.1.2 Risikofaktoren

Neben hohem Alter und adenomatösen Darmpolypen, welche als die bedeutendsten Risikofaktoren gelten, werden eine Reihe genetischer, epigenetischer und umweltbedingter Faktoren diskutiert. Ein hoher Anteil gesättigter sowie "trans"-Fettsäuren in der Nahrung und die damit verbundene Änderung der Gallensäurezusammensetzung scheint durch Stimulation kanzerogener Faktoren das Darmkrebsrisiko zu erhöhen. Ungesättigte Fettsäuren hingegen, insbesondere durch den Verzehr von Fisch, scheinen eine protektive Wirkung zu haben. Ebenso protektiv scheint eine ballaststoffreiche Ernährung (>30g/Tag), viel Obst und Gemüse sowie die Reduktion von geräucherter und gesalzener Nahrung zu sein ^{1,3-5}.

Ein gesicherter Risikofaktor ist die Diagnose der Familiären adenomatösen Polyposis (FAP), die unbehandelt in nahezu 100% zur Entwicklung eines KRK führt. Bei dieser obligaten Präkanzerose handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Krankheit mit einer genetischen Alteration auf Chromosom 5 (Mutation des APC-Tumorsuppressorgens), wodurch es zur Entstehung einer Vielzahl adenomatöser Polypen (mehr als 100 Stück) kommt. Die Erkrankung ist allerdings so selten, dass sie an weniger als 1% aller Kolonkarzinome beteiligt ist. Unbehandelt ist bei dieser Erkrankung ab dem 3. Lebensjahrzehnt mit der Entstehung eines KRK zu rechnen ^{1,6}.

Beim Hereditären Nicht Polypösen Kolonkarzinom (HNPCC), auch als Lynch-Syndrom bezeichnet, kommt es bereits vor dem 50. Lebensjahr zur Entstehung von Darmkrebs. Bei dieser autosomal dominant vererbten Erkrankung treten parallel zur Entstehung von malignen Darmtumoren, Mammakarzinome, Endometriumkarzinome und Ovarialtumore auf. Diese Form ist für etwa 5% aller Kolonkarzinome verantwortlich ^{2,7}.

Das Darmkrebsrisiko bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist gegenüber Gesunden erhöht und korreliert mit dem Ausmaß der Darmbeteiligung und der Dauer der Erkrankung. Es ist bei Colitis Ulcerosa etwas höher als beim Morbus Crohn^{2,8}.

1.1.3 Pathogenese

Die Entwicklung eines KRK geht pathogenetisch aus Epitheldysplasien hervor. Diese zeichnen sich histomorphologisch durch zelluläre Atypien und veränderte Zellarchitektur einzelner Zellen innerhalb des Epithels aus. In über 95% der Fälle werden solche Dysplasien in Adenomen gefunden, die nach vielen Jahren gelegentlich zur Entstehung eines Karzinoms führen. Aus diesem Grund spricht man heute von der Adenom-Karzinom-Sequenz. Adenome gelten als fakultative Präkanzerosen, wobei die Entartungswahrscheinlichkeit von der Wuchsform, genetischen und epigenetischen Veränderungen innerhalb der Stammzellen der Dickdarmkrypten sowie von der Größe des Adenoms abhängen. Es werden tubuläre von villösen Adenome mit 5% deutlich geringer ist als die 40%ige Entartungswahrscheinlichkeit der tubulären Adenome Karzinoms, wohingegen Adenome ≤1cm führen in weniger als 1% zur Entstehung eines Karzinoms, wohingegen

Bis zur Entwicklung eines malignen Tumors bedarf es einer Vielzahl von genetischen und epigenetischen Veränderungen, die meist in einen Zeitraum von mehreren Jahren bis Jahrzehnten entstehen. 2006 zeigten Sjöblom et al., dass bei jedem KRK durchschnittlich 90 Mutationen in verschiedensten Genen zu finden sind ¹⁰. Gene, die nachweislich einen direkten Einfluss auf die Krebsentwicklung haben, bezeichnet man als Onkogene oder Tumorsuppressorgene. Bekannt sind eine Vielzahl von Genen, die besonders häufig in KRK mutiert vorliegen¹¹. Ein wichtiger Schritt zur Entwicklung eines Karzinoms ist die Inaktivierung des APC-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 5, welche durch eine somatische Mutation und/oder den Verlust der Heterozygotie ("Loss of Heterozygosity", LOH) zustande kommt. Tumorsuppressorgene und deren Genprodukte leiten bei genetisch veränderten Zellen die Apoptose ein, wirken dadurch negativ regulierend auf die Zellproliferation und verhindern somit die Entstehung von Karzinomen. Werden diese Gene durch Mutationen inaktiviert, folgt ein unkontrolliertes Zellwachstum. Wichtigste Vertreter dieser "Genklasse" für die Entstehung des KRK sind neben dem APC-Gen, p53, DCC (delated in colon cancer) sowie MCC (mutated in colon cancer). Die Ursache für die Mutation dieser Gene kann vielfältige Gründe haben. Kanzerogene Einflüsse, wie Rauchen ¹², vermehrte Zufuhr heterozyklischer Amine ^{13,14}, sowie Folsäuremangel oder verminderte Methioninzufuhr, ebenso wie starker Alkoholkonsum^{15,16}, welcher zu veränderter Methylierung führt, können ursächlich sein. Onkogene entstehen bei der Mutation von Proto-Onkogenen, einer

"Genklasse", welche bei der normalen Zellteilung, dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung eine Rolle spielen. Mutationen führen zu autonomem Zellwachstum und gesteigerter Proliferation. Eines der bekanntesten Proto-Onkogene ist das K-RAS-Gen. Bei 40-70% aller KRK lässt sich diese Mutation nachweisen ¹¹. Die maligne Transformation vom späten Adenom zum Karzinom ist gekennzeichnet durch den Verlust des bis dahin noch kontrollierten Wachstums. Vogelstein und Fearon erstellten 1988 ein Tumorprogressionsmodel, wonach eine Mutation auf Chromosom 17p bzw. die Mutation des p53-Tumorsuppressorgens für die maligne Transformation ausschlaggebend sind ¹⁷.



Abbildung 1: Tumorprogressionsmodel nach Vogelstein und Fearon (1988)

1.1.4 Klassifikation und Stadieneinteilung

Gegenwärtig stellt die UICC-Klassifikation (Union Internationale Contre le Cancer) den aussagekräftigsten prädiktiven Faktor zur Abschätzung der Prognose eines KRK dar. Danach werden KRK entsprechend ihrer Ausbreitung klassifiziert. Dabei dient das von Pierre Denoix, einem französischen Chirurgen, in den 1940er Jahren entwickelte TNM-System als Basis für die Stadieneinteilung. Denoix bezieht sich auf folgende prognostisch relevante Kriterien: Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors gegenüber Nachbargeweben (T), Befall angrenzender Lymphknoten (N), Auftreten von Fernmetastasen (M). Weiterhin existiert die Stadieneinteilung nach Dukes, welche über die Jahre aber an Bedeutung verloren hat und durch die UICC-Klassifikation ersetzt wurde.

UICC	TNM	Lymphknotenbefall	Metastasen	Dukes
Stadium 0	Tis	NO	MO	
Stadium I	T1, T2	NO	MO	Α
Stadium IIA	T3	NO	MO	В
Stadium IIB	T4a	NO	MO	В
Stadium IIC	T4b	NO	MO	В
Stadium III	Jedes T	N1 oder N2	MO	С
Stadium IIIA	T1, T2	N1a	MO	С
	T1	N2a	MO	С
Stadium IIIB	T3, T4a	N1	MO	С
	T2, T3	N2a	MO	С
	T1, T2	N2b	MO	С
Stadium IIIC	T4a	N2a	MO	С
	T3, T4b	N2b	MO	С
	T4b	N1, N2	MO	С
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M1a	D
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1b	D

Tab. 1: Stadieneinteilung nach UICC (2009) und Dukes

Tab.	2: Pathologische	Klassifikation	nach dem	TNM-System	(2009) (der UICC
T	at i admotosistente	Little oon	mach ach	II THE DUDGEN	(=00)	

Primärtumor Pathologische Ausdehnung des Tumors					
PTX	Tumor kann nicht beurteilt werden				
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor				
Ptis	Intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria (ohne feststellbare				
	Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submukosa)				
pT1	Infiltration der Submukosa				
pT2	Infiltration der Muscularis propria				
pT3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in das				
	nicht peritonealisierte perikolische oder perirektale Gewebe				
pT4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert				
	das viszerale Peritoneum				
pT4a	Tumor perforiert viszerales Peritoneum				
pT4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen				
Regionäre					
Lymphknoten					
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden				
N0	Kein Befall regionärer Lymphknoten (Aussage nur zutreffend, bei mindestens				
	12 extipierten Lymphknoten, die zur Untersuchung vorlagen)				
N1	Metastasen in ein bis drei regionären Lymphknoten				
N1a	Metastase in einem regionären Lymphknoten				
N1b	Metastasen in 2-3 regionären Lymphknoten				
N1c	Tumorknötchen bzw. Satelliten im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht				
	peritonealisierten perikolisch/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre				
	Lymphknotenmetastasen				
N2	Metastasen in vier oder mehr regionären Lymphknoten				
N2a	Metastasen in vier bis sechs regionären Lymphknoten				
N2b	Metastasen in mehr als sechs regionären Lymphknoten				
Fernmetastasen					
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden				
MO	Keine Fernmetastasen				
M1	Fernmetastasen vorhanden				
M1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionale				
	Lymphknoten)				
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum				

Eine weitere wichtige Klassifikation ist die R-Klassifikation (Residual). Sie gibt Auskunft über das Fehlen oder Vorhandensein von Tumorzellen nach erfolgter Therapie. R0 steht dabei für tumorfrei, R1 für mikroskopisch nachweisbaren Residualtumor und R2 für makroskopisch nachweisbaren Residualtumor. Sie gilt als wichtiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben nach Therapie.

1.1.5 Histologische Typisierung und Grading

90% aller Tumore des Dickdarms sind Adenokarzinome, die histopathologisch in 4 Differenzierungsgraden auftreten: Grad 1 bedeutet gut differenziert, Grad 2 mäßig differenziert, Grad 3 schlecht differenziert und Grad 4 wird als undifferenziert eingestuft. Mit ansteigendem Differenzierungsgrad ist von einer zunehmend schlechteren Prognose für den Patienten auszugehen. Von Adenokarzinomen werden folgende deutlich seltenere Karzinome unterschieden: 1. das muzinöse Karzinom (Gallertkarzinom), 2. das Siegelringkarzinom und 3. die noch viel selteneren Karzinoide, Lymphome und Sarkome¹.

1.1.6 Screening

Ab dem 50. Lebensjahr übernehmen deutschlandweit die Kostenträger einmal jährlich die Krebsvorsorgeuntersuchung für Nicht-Risikopatienten zur Früherkennung des KRK. Diese beinhaltet neben der Inspektion, die digital rektale Austastung sowie die Stuhluntersuchung auf okkultes Blut (Guajak-Test)¹⁸. Dieser Test kann in >50% der Fälle enterale Blutverluste ab 20 ml/d nachweisen. Bei einem physiologischen Blutverlust im Darm von 0,5-1,5 ml/d deutet ein positiver Test auf eine enterale Blutungsquelle hin. Da neoplastisch veränderte Schleimhaut häufiger blutet als gesunde Mukosa, ist ein positiver Guajak-Test immer endoskopisch abzuklären. Der Test macht sich die Pseudoperoxidaseaktivität des Hämoglobins zu nutze, wonach es nach Zugabe von Wasserstoffperoxid zu einer blauen Farbreaktion kommt. Die Gefahr falsch positiver Reaktionen ist ein bekanntes Problem, da verschiedene Lebensmittel peroxidasehaltig sind (z.B. rohes Fleisch oder verschiedene Gemüsesorten). Bei Tumoren, deren Blutverlust geringer ist als 20 ml/d oder bei forcierter Einnahme von Ascorbinsäure kann der Test falsch negativ ausfallen. Dies trifft für über 50% der Untersuchungen zu. Allerdings ist die Effektivität der Stuhluntersuchung auf okkultes Blut im Hinblick auf die Senkung der KRK- Mortalität bewiesen. Nach derzeitiger

Studienlage konnte die Mortalität nach der Einführung des Guajak-Testes um 23% gesenkt werden ¹⁹.

Immunologische Testverfahren auf okkultes Blut zeigen eine höhere Sensitivität als der Guajak – Test, sind allerdings kostenintensiver, komplizierter in der Durchführung und ihre Effektivität ist derzeit noch nicht ausreichend untersucht ^{11,18}.

Im Stuhl nachweisbare Biomarker wie M2-Pyruvatkinase oder Calprotectin galten als vielversprechende Moleküle für ein frühzeitiges Screening des KRK, haben aber außerhalb von Studien keine Anwendung gefunden ²⁰⁻²².

Ein weiteres gesichertes Screeningverfahren zur Früherkennung der KRK ist die Sigmoidoskopie. Die Mortalität durch Karzinome des Rektosigmoids konnte seit der Einführung der Sigmoidoskopie um 60-80% gesenkt werden ^{23,24}. Ab dem 50. Lebensjahr sollte sie alle 5 Jahre erfolgen. Ein wesentlicher Nachteil dieser Untersuchungsmethode ist die Tatsache, dass nicht alle Darmabschnitte eingesehen und somit beurteilt werden können. Lediglich ein 30 bis 50cm langer Abschnitt des Kolorektums kann eingesehen werden. Daher wird dieses endoskopische Verfahren zunehmend durch die komplette Koloskopie ersetzt, welche deutschlandweit ab dem 55. Lebensjahr von den Kostenträgern finanziert wird und bei unauffälligem Befund einmalig alle 10 Jahre wiederholt werden sollte. Sie besitzt die höchste Sensitivität (ca. 95%) und Spezifität, um Adenome und Karzinome frühzeitig zu entdecken und hat den Vorteil, dass sie nicht nur diagnostisch wertvoll ist, sondern auch eine gute Therapieoption in sich birgt¹¹. Anhand von Fallkontroll-Studien konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz des KRK durch die Polypektomie während koloskopischer Vorsorgeuntersuchungen um 60-90% gesenkt werden konnte²⁵. Da viele Patienten 26,27) trotz aerinaer Komplikationsraten (0,14 bis 0.25% nicht am Früherkennungsprogramm teilnehmen, wären weniger invasive, hochsensitive und spezifische Alternativen wünschenswert.

Die Bestimmung etablierter im Serum nachweisbarer Tumormarker, wie des karzinoembryonalen Antigens (CEA) oder Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA 19-9) besitzt beim Screening asymptomatischer Patienten keinen Stellenwert. Sie eignen sich lediglich als Verlaufsmarker bei Chemotherapie nach R1-Resektion oder in der Nachsorge zur Verlaufsbeobachtung. Mit der Einführung des Septin-9-Tests wurde ein erster Meilenstein in der serologischen Diagnostik zur frühzeitigen Erkennung von Damkrebs gelegt. Septin-9 ist ein Gen, welches bei KRK verstärkt methyliert zu finden ist. Mit einer Sensitivität von ca. 70% und einer Spezifität von 90% kommt der Test den

gewünschten Ergebnissen schon recht nahe, doch konnten bisher keine weiteren molekularen Biomarker gefunden werden, die die Koloskopie als "Goldstandard" hätten ablösen können.

1.1.7 Therapie

Praktisch jeder Patient profitiert stadienunabhängig von einer chirurgischen Intervention. Ziel einer kurativen Resektion ist die Entfernung des tumorbefallenen Darmabschnittes mit ausreichendem Sicherheitsabstand (3cm) im Gesunden sowie der En-block-Entfernung des regionalen Lymphabflussbereiches im Sinne einer R0-Resektion. Der Großteil aller Karzinome wird per onkologischer Hemikolektomie bzw. Rektumresektion mit radikulärer Gefäßligatur und systematischer Lymphadenektomie reseziert. Das Ausmaß der Resektion bestimmt die intraoperative Devaskularisierung des betroffenen Darmabschnittes. Selbst fortgeschrittene Karzinome, die bereits metastasiert sind, sollten operativ behandelt werden, um einen karzinombedingten Ileus oder Blutungen zu vermeiden.

Neben der operativen Therapie werden neoadjuvante und adjuvante Behandlungsverfahren vor allem bei fortgeschrittenen Tumorstadien eingesetzt. Neoadjuvante Therapien sind einer Operation vorgeschaltete Therapien, um die Tumormasse präoperativ zu verkleinern. Adjuvante Therapien sind ergänzende Verfahren zu einer Operation und werden postoperativ durchgeführt. Die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie hängt von der Tumorausbreitung zum Zeitpunkt der Operation ab. Im Stadium I ist eine adjuvante Chemotherapie aufgrund einer 90%igen Langzeitüberlebensrate nach einer Operation nicht indiziert. Die spontane Überlebensrate im Stadium II nach operativer Therapie beträgt 80%, wohingegen diese im Stadium III nur noch 45% beträgt¹¹. Daher ist die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie bei Patienten mit Stadium III Kolonkarzinomen seit vielen Jahren Standard, wird jedoch altersabhängig nur bei 3/4 der betroffenen Patienten angewandt ²⁸. Bei Rektumkarzinomen im Stadium UICC II und III empfiehlt sich zur Senkung der Lokalrezidivrate eine neoadjuvante Radiochemotherapie. Neoadjuvante Therapieverfahren haben sich beim Kolonkarzinom bisher nicht etablieren können. Wegen der häufig auftretenden gravierenden Nebenwirkungen verschiedenster Chemotherapieregime und der damit verbundenen eingeschränkten Lebensqualität wären neue Therapieansätze wünschenswert, um die Langzeitprognose für die betroffenen Patienten zu verbessern. Verschiedene neuartige Therapiestrategien sind derzeit in klinischer Erprobung, wie beispielsweise der Einsatz monoklonaler Antikörper wie Bavacizumab oder Cetuximab ¹¹. Medikamente, welche direkt auf RNA-Ebene (Antisense-Technologie) in den Stoffwechsel der Tumorzelle eingreifen, um gezielt die Translation tumorrelevanter Proteine zu verhindern, existieren bisher nicht, wären aber eine sehr interessante Zukunftsperspektive und -alternative. Da sialinsäuretragende Antigene (wie Sialyl-Tn oder Siayl-Lewis x) auf der Oberfläche von Tumoren nachweislich im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose für Patienten mit KRK 29-31 stehen könnte ein gezielter molekulargenetischer Eingriff in die Sialinsäurebiosynthese oder in die Synthese besagter Antigene die Prognose für die betroffenen Patienten deutlich verbessern.

1.1.8 Prognose

Die Langzeitprognose für Patienten mit KRK ist abhängig von verschiedenen Faktoren. Wie bei anderen soliden Tumoren ist die anatomische Ausbreitung des Karzinoms eines der entscheidenden prognostischen Kriterien. Dabei spielt vor allem die Infiltration von benachbarten Strukturen, der Lymphknotenstatus, Fernmetastasen sowie der Differenzierungsgrad des Tumors eine entscheidende Rolle. Da Tumorrezidive gehäuft innerhalb der ersten 5 Jahre nach radikaler Resektion auftreten, ist die 5-Jahres-Überlebensrate ein häufig verwendetes Maß, um die Prognose für den einzelnen Patienten statistisch abzuschätzen. Dabei haben Patienten im Stadium UICC I eine etwa 90%ige Chance geheilt zu werden, wohingegen bei Patienten im Stadium III mit einer 5 Jahres-Überlebenszeit von lediglich 50% zu rechnen ist ¹. Ist der Tumor bei Diagnosestellung bereits fernmetastasiert, so überleben nur etwa 8% aller Patienten die kommenden 5 Jahre ³². Ein weiteres bereits beschriebenes Kriterium, welches eine maßgebliche Rolle für die Prognose des Patienten darstellt, ist der Verbleib von Tumorgewebe nach Primärtherapie. Durch die Erfahrung und Sorgfalt des Operateurs variiert die Prognose der 5 Jahres-Überlebensrate stadienabhängig um bis zu 30%¹⁸. Sollte nach Primärtherapie keine R0 Resektion gelingen, verschlechtert sich die Prognose für den Patienten erheblich, da bei R1 und R2 Resektion in aller Regel keine kurative Therapie mehr möglich ist.

Eine Vielzahl von Studien hat in den letzten Jahren weitere prognostisch relevante Faktoren beschrieben. Einige dieser Studien beschäftigten sich mit Zellmembranmolekülen und deren Glykanen, welche Sialinsäuren als endständige Komponenten enthalten. Manche dieser Studien kommen zu dem Schluss, dass eine verstärkte Expression von sialinsäuretragenden Molekülen auf Tumorzellen die Prognose für den Patienten deutlich verschlechtern ^{30,33-36}, andere wiederum dementieren einen solchen Zusammenhang ³⁷. Im Blickpunkt jener Studien standen Strukturen wie Sialyl Lewis x und a, ebenso wie das Sialyl-Tn-Antigen, welche auch im Fokus dieser Arbeit stehen.

1.2 Glykane

Glykane sind über glykosidische Verbindungen verknüpfte Mono-, Di-, Oligo- oder Polysaccharide, die in Homoglykane und Heteroglykane unterteilt werden. Homoglykane sind aus gleichartigen Monosacchariden aufgebaute Kohlenhydratketten, zu deren Hauptvertretern die Stärke, die Cellulose, Dextrane sowie das Glykogen zählen. Heteroglykane sind Kohlenhydratketten, die aus mehreren verschiedenen Monosaccharidbausteinen zusammengesetzt sind und in großen komplexen Molekülen Glykoproteinen, Glykolipiden, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen oder wie Lipopolysacchariden enthalten sind, die allesamt als Glykokonjugate bezeichnet werden. Sie sind häufig an Protein- oder Lipidmoleküle gebunden und werden auf Zelloberflächen sowie im Extrazellularraum gefunden. Glykanvorläufer und abbauprodukte kommen in Zellorganellen wie dem Golgi-Netzwerk, dem ER, in Lysosomen, im Zytoplasma und im Zellkern vor ³⁸. Die Variabilität verschiedener Glykane wird nicht nur durch die Anzahl unterschiedlicher Monosaccharide geprägt, sondern auch durch deren Verknüpfung an unterschiedlichen Positionen der OH-Gruppen, Konformation und Art der Verknüpfung (α oder β). Die Biosynthese der Glykane findet primär im ER und im Golgi-Netzwerk statt und ist abhängig von einer riesigen Enzymmaschinerie, für deren codierende Seguenzen etwa 1% des menschlichen Genoms vorgesehen sind ³⁹. Glykosylierung ist die häufigste posttranslationale Modifikation von Proteinen⁴⁰. Über 50% aller Proteine sind glykosyliert ⁴¹. Dabei werden Heteroglykane in N- bzw. O-Glykane unterschieden, die über ein Asparagin oder Serin/Threonin mit dem jeweiligen Protein verknüpft sind ⁴². Eine Vielzahl von Proteinen zeigt eine spezifische Glykosylierung und ist abhängig von der katalytischen Aktivität verschiedener Glykosyltransferasen, welche einzelne Kohlenhydratstrukturen mit dafür vorgesehenen Trägermolekülen verknüpfen und damit deren Eigenschaften verändern⁴¹.

Fucose	Mannose	Galaktose	Glucose	N-Acetyl-	N-Acetyl-	N-Acetyl-
Fuc	Man	Gal	Glc	Glucosamin	Neuraminsäure	Galaktosamin
				GlcNAc	Neu5Ac	GalNAc
		\bigcirc			•	

Abbildung 2: Legende über die wichtigsten Monosaccharidbausteine in Glycoproteinen eukaryoter Zellen.

N-Glykane sind Oligosaccharide, welche durch eine N-glykosidische Bindung zwischen der Aminosäure Asparagin eines Proteins und einem N-Acetyl-Glukosamin (GlcNAc) einer Saccharidkette gekennzeichnet sind. Die Grundstruktur aller N-Glykane besteht aus zwei GlcNAc und drei Mannosen und wird als Core bezeichnet, wohingegen die O-Glykane keine einheitliche Grundstruktur besitzen. Die Biosynthese der N-Glykane ist sehr komplex, verläuft über mehrere Schritte und beginnt mit der Zusammensetzung der Core-Struktur an der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) ^{42,43}. Eine riesige Enzymmaschinerie ist notwendig um die Synthese der N-Glykane durchzuführen. Ist die Corestruktur fertiggestellt, beginnen verschiedene spezifische Glykosyltransferasen mit der endgültigen Prozessierung, die hauptsächlich im medialen und trans-Golgi-Apparat abläuft und dort zur Entstehung der für das jeweilige Glykoprotein typischen peripheren Saccharidkette führt.



Abbildung 3: Strukturbeispiele von N- und O-Glykanen auf Proteinen

Die Biosynthese O-glykosidisch gebundener Kohlenhydrate erfolgt anders als bei der N-Glykosylierung direkt am Protein in Form von posttranslationaler Modifikation in den Zisternen des Golgi-Apparates ^{42,44}. Ein Seryl- bzw. Threonylrest der Peptidkette eines Proteins dient als Akzeptor für ein N-Acetyl-Galaktosamin, welches von einer Polypeptid-GalNAc-Transferase übertragen wird. Die weitere Modifikation wird durch spezifische Glykosyltransferasen, z.B Sialyltransferasen, Fucosyltransferasen oder Glucuronosyltransferasen gesteuert, welche die jeweiligen aktivierten Nucleotidzucker als Substrate verwenden ⁴².

1.2.1 Sialinsäuren



Abbildung 4: N-Acetylneuraminsäure (Fischer Projektion)

Unter dem Begriff Sialinsäuren wird eine große Gruppe saurer Aminozucker zusammengefasst, deren Grundgerüst aus 9 Kohlenstoffatomen besteht mit einer Carboxylgruppe am C-2-Atom sowie einer Aminogruppe am C-5-Atom. Die am häufigsten anzutreffende Form ist die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), welche durch die Acetylierung der Aminogruppe entsteht und das häufigste Vorläufermolekül für annähernd alle anderen 50 natürlich vorkommenden Sialinsäuren ist ⁴⁵. Aktivierte Sialinsäuren (CMP-Neu5Ac) werden im trans-Golgi-Netzwerk der Zelle unter Abspaltung von CMP durch spezifische Sialyltransferasen auf das jeweilige Oligosaccharid eines Glykokonjugates übertragen.

1.2.2 Biosynthese der Sialinsäuren

Die Biosynthese der Sialinsäure beginnt mit der ATP-abhängigen Umwandlung von UDP-GIcNAc (UDP-N-Acetyl-Glucosamin) zu ManNAc-6-P (N-Acetyl-Mannosamin-6-Phosphat). Der Ausgangsstoff UDP-GIcNAc wird in vier enzymatischen Schritten aus Fructose-6-Phospat gebildet, welches ein Zwischenprodukt der Glykolyse ist. Die erste Reaktion der Sialinsäurebiosynthese wird durch ein bifunktionelles Enzym katalysiert, welches das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese darstellt ⁴⁶. UDP-GIcNAc wird anfangs in seiner C2-Position zu ManNAc irreversibel epimerisiert und anschließend in der C6-Position zu ManNAc-6-P phosphoryliert. Das Enzym, welches für diese Reaktion zuständig ist, wird als UDP-GIcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase (Gen Symbol: GNE) bezeichnet und ist eines der Gene, die in dieser Arbeit auf seine Expression im Normal-und Tumorgewebe beim Kolonkarzinom untersucht wurde.



Abbildung 5: Sialinsäurebiosynthese in Säugetierzellen³⁹

In der anschließenden Reaktion mit Phosphoenolpyruvat addiert sich das nach Phosphatabspaltung entstehende Enolat-Ion des Pyruvats an ManNAc-6P, wodurch Neu5Ac-9-Phosphat (N-Acetyl-Neuraminat-9-Phosphat) entsteht ⁴². Diese Reaktion wird durch die Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase katalysiert. Die nächste Reaktion ist die Dephosphorylierung von Neu5Ac-9-Phosphat zu Neu5Ac (N-Acetylneuraminsäure), welche durch das Enzym Neu5Ac-9-Phosphat-Phosphatase (Gen Symbol: NANP) katalysiert wird ⁴⁷. Auch dieses Gen stand im Fokus dieser Arbeit, da sich bei dem untersuchten Patientengewebe eine deutliche Expressionszunahme von NANP im Tumorgewebe zeigte. Der letzte enzymatische Schritt zur Synthese eines aktiven Nukleotidzuckers der Sialinsäure befindet sich nicht, wie die vorherig genannten enzymatischen Reaktionen, im Zytoplasma, sondern im Zellkern. Unter Abspaltung von Pyrophosphat katalysiert die CMP-Neu5Ac-Synthetase die Aktivierung von Neu5Ac durch CTP (Cytidintriphosphat) zu CMP-Neu5Ac. Nach der Aktivierung im Zellkern wird CMP-Neu5Ac durch die Kernporen ins Zytoplasma freigesetzt, um anschließend durch einen Antiport von CMP gegen CMP-Neu5Ac Zugang zum Golgi-Apparat zu erlangen. *trans*-Golgi-Netzwerk Im wird CMP-Neu5Ac durch zahlreiche spezifische Sialyltransferasen unter Abspaltung von CMP auf Oligosaccharidketten von N-Glykanen, O-Glykanen oder auch Glykolipiden übertragen, um anschließend von speziellen Transfervesikeln als fertig prozessierte Proteine oder Lipide zu ihren Zielorten gebracht zu werden ⁴⁸.

1.2.3 Biologische Funktion von Sialinsäure tragenden Glykanen in humanem Gewebe

In vielen Studien konnte bewiesen werden, dass Kohlenhydratstrukturen in Glykokonjugaten an der Funktionalität der Zelle erheblich beteiligt sind. So spielen Glykane bei der Zell-Zell Interaktion, der Zell-Matrix Interaktion, beim Zellwachstum oder der Signaltransduktion eine entscheidende Rolle^{49,50}. Wegen seiner terminalen Position an Glykanen spielen Sialinsäuren bei vielen biologischen Abläufen eine zentrale Rolle. Sind Glykane mit vielen Sialinsäuren besetzt, ist ihre Ladung negativ, was folglich zur Abstoßung zwischen Zellen oder zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix führt ⁵¹. Die Zelladhäsion als essentieller Prozess bei der Zellmigration während der Ontogenese, bei Entzündungsreaktionen, malignem Zellwachstum und Metastasierung, wird durch Selektine vermittelt, welche auf Leukozyten (L-Selektin), Endothelzellen (P- und E-Selektin) und Thrombozyten (P-Selektin) exprimiert werden ⁵²⁻⁵⁴. Diese binden an spezifisch fucosylierte und sialylierte Liganden auf Zelloberflächen, welche beispielsweise Tetrasaccharide vom Typ Sialyl-Lewis^x oder Sialyl-Lewis^a enthalten und induzieren nach deren Bindung das sogenannte "Rolling", so dass die gebundenen Zellen in Folge in aktiviertes Gefäßendothel einwandern 54-56.

Sialinsäuren als Bestandteil von Glykanen stellen jedoch auch gleichzeitig Erkennungsdeterminanten für Pathogene dar und werden von Viren, Bakterien und Parasiten als Zielstruktur erkannt ⁵⁷. Ein sehr gut erforschtes Beispiel dafür ist das Hämagglutinin, ein sialinsäurebindendes Lektin, welches verschiedene Influenza-Virus-Stämme nutzt, um in die Wirtszelle einzudringen ⁵⁸. Die Pathogenität ist dabei stark abhängig von der spezifischen Sialylierung der Wirtszelle. Zu Kreuzreaktionen zwischen Mensch und Tier kommt es daher nur, wenn sich, durch spontane Mutation oder horizontalen Gentransfer, der tierische Virusstamm der Sialylierung humaner Zellen anpasst, was vermutlich auch die Ursache der Influenza-Pandemie (Subtyp A/H1N1) im Jahre 1918 war ⁵⁹. Pathogene Bakterien nutzen Adhäsine, sialinsäurebindende Lektine, um an die Wirtszelle anzudocken. Sialylierte Glykanstrukturen werden auch von

Toxinen einiger Mikroorganismen gebunden, um im Anschluss durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen zu werden. Zu deren Vertretern zählen das Botulinum-, das Tetanus-, das Shigella- und das Cholera-Toxin.

Manche Erreger haben im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, um sich der Erkennung durch das Immunsystem des Wirtes zu entziehen. So nutzt der Erreger der Chagaskrankheit, Trypanosoma cruzii, die Sialinsäuren der Wirtszelle, um seine eigenen antigenen Strukturen zu maskieren⁶⁰.

Eine weitere wichtige Funktion der Sialinsäuren ist der Schutz von Glykoproteinen und Antikörpern vor dem Abbau⁶¹. Verlieren sie ihre terminalen Sialinsäuren, so werden sie vom Asialoglykoproteinrezeptor, einem in der Leber lokalisierten Rezeptor, gebunden, endozytiert und abgebaut⁶².

Ein in den letzten Jahren wissenschaftlich sehr stark umforschtes Thema ist der Zusammenhang zwischen veränderter Zelloberflächensialierung verschiedenster Gewebe und der Entstehung bzw. Ausbreitung von malignen Tumoren im menschlichen Organismus^{30,55,63,64}.

1.3 Microarraytechnologie (MA-Technologie)

Mit den heute zur Verfügung stehenden Genexpressionsanalyseverfahren ist es möglich, die gesamte DNA einer oder mehrerer Zellen zu untersuchen. Dabei wird die quantitative Bestimmung hunderter in diesen Zellen exprimierter Gene in nur einem Analyselauf möglich. Eines der heute am meisten eingesetzten Verfahren ist die Mircroarraytechnologie.

Microarrays (MA) sind Objektträger, mit deren Hilfe eine zeiteffektive simultane Expressionsanalyse tausender Gene möglich ist. Ziel dabei ist es, das gesamte Genom auf potentielle Onko- oder Tumorsuppressorgene durchzuscreenen, um einerseits unbekannte Mechanismen der Pathogenese zu entdecken und andererseits Gene zu identifizieren, welche als diagnostische und prognostische Biomarker zur frühzeitigen Diagnostik maligner Tumoren eingesetzt werden können. Außerdem versucht man mit dieser Methode, neue prädiktive Marker als Zielstruktur für neuartige Therapiemöglichkeiten zu identifizieren, um mit hoher Präzision die Wirksamkeit antiproliferativer Medikamente für jeden einzelnen Patienten vorhersagen zu können 65.

Die Technologie besteht darin, spezifische biomolekulare Sonden, welche auf dem Trägermaterial des MA fixiert werden. durch fluoreszenzfarbstoffmarkierte komplementäre Nukleinsäuresequenzen (cDNA oder cRNA) zu hybridisieren. Diese Nukleinsäureseguenzen werden mit Hilfe von RNA synthetisiert, welche aus dem zu untersuchenden Gewebe stammt. Das Trägermaterial der Genchips wird je nach Bedarf aus Silikon, Metall, Glas, Nylon oder Nitrozellulose hergestellt, wobei Glas aufgrund seiner langen Haltbarkeit sowie geringen Hintergrundeffloreszenz bevorzugt zur Anwendung kommt ⁶⁶. Zwei verschiedene MA-Systeme finden heutzutage regelmäßig ihre Anwendung: zum ersten die cDNA-Arrays der Stanford Universität und zum zweiten die Oligonukleotid-Arrays der Firma Affymetrix. Unterschiede beider Verfahren findet man hinsichtlich ihrer Herstellung und ihrer Messprinzipien. Bei der Herstellung der Oligonukleotidarrays mittels photolithographischer Techniken werden kurze (20-60 Nukleotide lange) einzelsträngige DNA-Sonden auf der Oberfläche der Trägerplatte in einem sogenannten Spot fixiert ⁶⁷. Die Einzelstrang-DNA-Sonden (500-5000 Nukleotide lang) der cDNA-Arrays hingegen werden in separaten Ansätzen amplifiziert und anschließend robotergesteuert auf die entsprechenden Spots des Chips aufgetragen 68. Ein Microarray ist dadurch definiert, dass die Spotgröße meist kleiner als 200µm ist und deshalb, verglichen zum Makroarray, mehrere 10000 Spots auf dem Trägermaterial zu

finden sind, was wiederum die Analyse tausender Gene auf einem Chip möglich macht

Zur Genexpressionsmessung verwendet man bei der Hybridisierung der Oligonukleotidarrays nur eine Probe, so dass die Intensität des Fluoreszenzsignals mit der Höhe der Genexpression gleichzusetzen ist. Hingegen verwendet man zur Hybridisierung der cDNA-Arrays neben der Testprobe eine Referenzprobe, so dass aufgrund mehrerer eingesetzter Farbstoffe die relative Genexpressionshöhe aus dem Quotienten der Fluoreszenzintensitäten berechnet werden muss.

Mit Hilfe der MA-Technologie wurde in den vergangenen Jahren eine große Menge an Daten gesammelt und in Datenbanken gespeichert. Die dabei gewonnenen Genexpressionsprofile waren hilfreich, um bisher unbekannte tumorbiologisch relevante intrazelluläre Signalwege, die an der Entstehung des KRK beteiligt sind, aufzudecken ⁷⁰⁻⁷². Trotz der Vielzahl an gewonnenen Daten und dem wachsenden Verständnis für tumorrelevante Signalkaskaden gibt es bisher zu wenige Medikamente, die gezielt in den Tumorstoffwechsel eingreifen, um die Entstehung, die Progression und die Ausbreitung dieser Tumore zu verhindern. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen werden auch in Zukunft neue unbekannte tumorrelevante Gene identifiziert werden, deren Gen oder Genprodukt möglicherweise eine neue Zielstruktur darstellt, um therapeutisch in den Tumorstoffwechsel des KRK einzugreifen.

1.4 Zielstellung

Das kolorektale Karzinom ist weltweit eines der häufigsten Krebstodesursachen. Sein Wachstum bleibt meist lange unbemerkt, da Frühsymptome häufig fehlen. Existieren bei Diagnosestellung bereits Metastasen, ist die Prognose infaust. Bekannterweise findet man auf Tumorzellen des KRK häufig veränderte Glykankomponenten. Speziell veränderte Zelloberflächensialierung steht unter dem Verdacht, die Bildung und Ausbreitung von Metastasen zu begünstigen. Nachweislich haben Antigene wie Sialyl-Lewis x und a sowie Sialy-Tn einen erheblichen Anteil an der Metastasenbildung und stehen als Marker für eine schlechte Prognose.

Dieser Arbeit ging eine Genexpressionsanalyse mehrerer hundert Gene mittels MA-Technologie (von Affimetrix) voraus, die das Ziel hatte, Genexpressionsunterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe beim kolorektalen Karzinom (Stadium UICC I und II) an einem Patientenkollektiv von 70 Patienten aufzudecken. Bei dieser Genexpressionsanalyse wurden auch Gene untersucht, deren Genprodukte an der Sialinsäurebiosynthese beteiligt sind bzw. für die Bildung antigener Strukturen wie Sialyl-Lewis x und a oder Sialyl-Tn verantwortlich sind.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Validierung der Microarraydaten mittels quantitativer real time Polymerase Kettenreaktion. Da bisher wenig über ihr Expressionsverhalten beim Kolonkarzinom bekannt ist, wurden die 5 Gene (GNE, NANP, ST6GALNAC1, ST3GAL4 und FUT3) für die Nachuntersuchungen ausgewählt, welche bei der MA-Analyse signifikante Genexpressionsunterschiede zwischen den einzelnen Geweben zeigten Sialinsäurebiosynthese und an der oder der Synthese der genannten sialinsäuretragenden Antigene beteiligt sind. Zusätzlich wurden die zwei Gene (UGT2B17 und HS6ST2) untersucht, die bei der MA- Analyse den größten positiven bzw. negativen Expressionsunterschied zeigten. Diese Arbeit dient der Grundlagenforschung und soll dazu beitragen, die tumorbiologische Relevanz der ausgewählten Gene beim KRK zu klären, um mögliche Angriffspunkte für neuartige Therapien aufzuzeigen.

1.5 Auswahl der zu untersuchenden Gene

Der Genexpressionsunterschied zwischen den Geweben wird durch den Fold Change (Normal/Tumor) ausgedrückt. Der hier verwendete Fold Change ist der Quotient aus den Mittelwerten der Messreihen des Normalgewebes zum Mittelwert der Messreihen des Tumorgewebes aller in der MA-Analyse untersuchten Patienten (n=70).

1. UDP-N-Acetylglucosamin-2-epimerase/N-Acetylmannosaminkinase (GNE)

Die GNE, ein bifunktionelles Enzym, ist das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese (siehe 1.2.2). Speziell seine Epimeraseaktivität wird durch verschiedene Mechanismen komplex hoch- bzw. herunterreguliert ^{46,73}, so dass über dieses Gen die Menge der in der Zelle synthetisierten Sialinsäuren gesteuert wird. Ohne dieses Enzym sind Zellen nicht mehr in der Lage, selbstständig Sialinsäuren zu produzieren und zeigen erhebliche funktionelle Defekte ⁴⁶. Der Fold Change (Normal/Tumor) für GNE bei der MA-Analyse betrug im Mittel 2,72.

2. Neu5Ac-9-Phosphat-Phosphatase (NANP)

Die NANP ist ein im Zytosol lokalisiertes Enzym, welches an der Sialinsäurebiosynthese beteiligt ist (siehe 1.2.2). Bis heute ist nicht vollständig geklärt, ob es sich bei diesem Enzym um eine spezifische Neu5Ac-Phosphat-Phosphatase handelt. Studien zur Substratspezifität stehen noch aus ^{46,74}. Der Fold Change (Normal/Tumor) für NANP bei der MA-Analyse betrug im Mittel 0,36.

<u>3. ST6 (alpha-N-Acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide</u> <u>alpha-2,6-sialyltransferase 1 (ST6GALNAC1)</u>

ST6GALNAC1 gehört zur großen Gruppe der Sialyltransferasen, welche in den Zisternen des Golgi-Apparates Sialinsäuren spezifisch über α 2,6 O-glykosidische Bindungen auf ein N-Acetylgalaktosamin eines O-Glykans übertragen. Durch diesen Transfer entsteht das sogenannte Sialyl-Tn-Antigen. Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten konnten zeigen, dass eine im Serum messbare Sialyl-Tn-Antigenexpressionszunahme bei Tumorpatienten mit Magenkrebs eine schlechte Prognose mit sich bringt ^{75,76}. Der Fold Change (Normal/Tumor) für ST6GALNAC1 bei der MA-Analyse betrug im Mittel 5,95.

4. ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4 (ST3GAL4)

ST3GAL4 gehört ebenfalls zur Gruppe der Sialyltransferasen. Sie verknüpft Sialinsäuren unter Abspaltung von CMP (siehe 1.2.2) spezifisch über eine α 2,3 glykosidische Bindung auf galaktosetragende Glykoproteine oder Glykolipide. ST3GAL4 ist an der Bildung des Blutgruppenantigens Sialyl Lewis X auf Zelloberflächen maßgeblich beteiligt, welches bekannter Weise ein Ligand für Selektin E ist ⁷⁷. Diese Selektine befinden sich auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen. Eine verstärkte Expression von Sialyl Lewis X auf Tumorzellen des KRK scheint im Zusammenhang mit der Entstehung und Ausbreitung von Metastasen zu stehen und geht mit einer schlechteren Prognose für den Patienten einher ³¹. Der Fold Change (Normal/Tumor) für ST3GAL4 lag bei der MA-Analyse im Mittel bei 2,39.

<u>5. Fucosyltransferase 3 (galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase, Lewis blood group)</u> (FUT3)

FUT3 gehört zur Gruppe der $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferasen, welche das Monosaccharid Fucose über eine $\alpha 1,3$ -glykosidische Bindung auf das N-Acetylglucosamin einer Glykankette übertragen. Unter den 6 strukturverschiedenen $\alpha(1,3)$ Fucosyltransferasen ist FUT3 die einzige, die auch $\alpha(1,4)$ -glykosidische Fucosylierungen durchführen kann ⁷⁸. Es ist bekannt, dass FUT3 bei der Synthese der Lewis Blutgruppenantigene (Sialyl Lewis X, Lewis X, Sialyl Lewis a und Lewis a) eine tragende Rolle spielt ⁷⁹. Wie bereits erwähnt, steht die Expressionszunahme einzelner Lewis Blutgruppenantigene auf Tumorzellen unter dem Verdacht, das Metastasierungspotential zu erhöhen und somit die Prognose für den Patienten zu verschlechtern ^{80,81}. Der Fold Change (Normal/Tumor) für FUT3 bei der MA-Analyse lag gemittelt bei 1,96.

6. UDP Glucuronosyltransferase 2 (Familie), Polypeptid B17 (UGT2B17)

Im menschlichen Organismus existieren 18 verschiedene UDP-Glucoronosyltransferasen (UGT), welche in 3 Subfamilien untergliedert sind: UGT1A, UGT1B und UGT2B⁸². UGT2B17 glucuronidiert (inaktiviert) Dihydrotestosteron (DHT) und dessen Metabolite in Geweben wie Prostata, Leber und Haut⁸³. Es ist bekannt, dass UGT2B17 im Normalgewebe von Magen, Leber, Kolon und Hoden stark exprimiert wird⁸⁴. Giuliani et. al konnten durch immunhistochemische Färbungen nachweisen, dass sich beim Harnblasen- und Kolonkarzinom die Expression sämtlicher UGT1A Isoformen, verglichen zum gesunden Gewebe, verringert bzw. verschwindet. In Adenomen sowie low grade Dysplasien waren die Proteine noch nachweisbar, sodass sie schlussfolgerten, dass UGT im gesunden Gewebe von Kolon und Harnblase möglicherweise eine schützenden Funktion gegenüber Karzinogenen besitzt, die über den Harn bzw. den Darm ausgeschieden werden ⁸⁵. Ähnliche Studien zur Familie der UGT2B Familie, speziell zu UGT2B17, sind bisher an Kolongewebe nicht durchgeführt worden. Der Fold Change (Normal/Tumor) für UGT2B17 betrug bei der MA-Analyse gemittelt 30,47.

7. Heparansulfat 6-O-Sulfotransferase 2 (HS6ST2)

Heparansulfate, eine spezielle Form der Proteoglykane, sind allgegenwärtiger Bestandteil auf Zellmembranen, der Extrazellulärmatrix und in Basalmembranen. Sie interagieren dort mit einer Vielzahl von Liganden, die regulierend in das Zellwachstum, Differenzierung, Adhäsion sowie in Mirgationsvorgänge eingreifen. HS6ST2 gehört zur Gruppe der Sulfotransferasen, welche Sulfate auf proteingebundene Heparansulfate übertragen. Hatabe et. al konnten Mitte 2013 zeigen, dass eine verstärkte HS6ST6 Expression in kolorektalen Tumoren mit einer reduzierten Langzeitprognose für die betroffenen Patienten einhergeht ⁸⁶. Der Fold Change (Normal/Tumor) für HS6ST2 betrug bei der MA-Analyse im Mittel 0,21.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Sämtliches in dieser Studie verwendetes Kolongewebe stammt von Patienten, welche in der chirurgischen Klinik I, Charité Universitätsmedizin Berlin am Campus Benjamin Franklin zwischen 2001 bis 2004 operiert wurden. In einem Ethikvotum (EA4/006/05) wurde das Gewebe für die anstehenden Untersuchungen freigegeben. Normal- sowie Tumorgewebe von 17 Patient(in)en mit einem Durchschnittsalter von 67 Jahren (Min: 46 Jahre; Max: 85 Jahre) stand für diese Studie zur Verfügung. Die vorangegangene MA-Analyse verwendete exakt das selbe Gewebe, jedoch wurden in dieser 53 weitere Patienten untersucht. Von diesen Patienten war leider kein oder nicht mehr ausreichend Gewebe vorhanden, um RNA zu isolieren.

Patient	Geschlecht	Alter bei	Tumor-	Lk	Lk	Grading	рТ	рN	рΜ	UICC	Rezidiv	Rezidivfrei
		Diag. (Jahre)	lokal.	entfernt	befallen							(Monate)
1	W	62	COE	13	0	2	2	0	0	I	Nein	60
2	W	64	COD	12	0	2	2	0	0	I	Nein	60
3	Μ	68	COA	29	0	3	3	0	0	II	Nein	60
4	W	72	COE	18	0	2	4	0	0	II	Ja	5
5	Μ	66	COT	16	0	2	4	0	0	II	Ja	20
6	М	74	COS	11	0	2	4	0	0	II	Ja	5
7	W	85	COA	15	0	3	3	0	0	II	Nein	60
8	Μ	78	COFD	12	0	2	3	0	0	II	Nein	60
9	W	55	COE	10	0	2	4	0	0	II	Ja	14
10	Μ	49	COA	30	0	1	3	0	0	II	Nein	60
11	W	78	COS	12	0	1	2	0	0	I	Nein	60
12	Μ	68	COD	5	0	2	2	0	0	I	Nein	60
13	W	46	COE	36	0	2	3	0	0	II	Nein	60
14	Μ	62	COS	6	0	2	3	0	0	II	Ja	9
15	W	70	COS	4	0	2	3	0	0	II	Ja	12
16	М	81	COS	17	0	2	3	0	0	II	Nein	60
17	М	68	COS	31	0	2	3	0	0	II	Nein	60

Tab. 3: tabellarischer Überblick über die Patientendaten

COA – Colon ascendens; COD – Colon descendens; COE – Coecum; COFD – Flexura coli dextra; COS– Colon sigmoideum; COT – Colon transversum; W – weiblich; M – männlich; Lk - Lymphknoten

4 Patienten (23,5%) wurden dem Stadium UICC I (alle T2), alle weiteren 13 Patienten dem Stadium UICC II (9x T3 und 4x T4) histopathologisch zugeordnet. Bei allen Patienten wurde eine Lymphadenektomie einiger perikolischer Lymphknoten durchgeführt, welche nach Aussage des Pathologen alle tumorfrei waren. Es konnten bei keinem Patienten Metastasen diagnostiziert werden. In einem Zeitraum von 60 Monaten postoperativ entwickelten 6 Patienten (35,3%) ein Tumorrezidiv. 9 Patienten (52,9%) waren männlich und 8 Patienten (47,1%) waren weiblich.

2.2 Materialien

2.2.1	Chemikalien und Lösungen	
<u>Cherr</u>	nikalien/Lösungen	Hersteller/Firma
•	Ehanol 100%	ROTH (Karlsruhe, Deutschland)
•	Xylol	J.T.Baker
		(Griesheim, Deutschland)
•	Ehanol 96%	ROTH
•	Ehanol 70%	ROTH
•	2 fach dest. H ₂ O	
•	Citric Acid (C ₆ H ₅ Na ₃)	SIGMA-ALDRICH
		(Steinheim, Deutschland)
•	Zitronensäure (M 192,13)	ROTH
•	Power Block TM	BioGenex
		(Hamburg, Deutschland)
•	AK-Verdünnungspuffer	DCS (Hamburg, Deutschland)
•	Phosphatase-Labeled Streptavidin	KPL (Geithersburg MD, USA)
•	HistoMark [®] PhThaloRED	KPL
•	Activator Solution	KPL
•	Buffered Substrate Solution	KPL
•	TRIZMA®BASE	SIGMA- ALDRICH
•	NaCl	ROTH
•	Hämatoxylin	ROTH
•	NaJodat	SIGMA- ALDRICH
•	Kalialaun	SIGMA- ALDRICH
•	Chloralhydrat	SIGMA- ALDRICH
•	Roti-Hisokit	ROTH
•	Tween®20	ROTH
•	Triton X100	SIGMA- ALDRICH

•	HCI	MERCK
		(Darmstadt, Deutschland)
•	M-MLV RT (Reverse Transkriptase)	Promega
		(Mannheim, Deutschland)
•	RNA sin (RNAse Inhibitor)	Promega
•	Desoxyribonukleotidmix (dNTP)	SIGMA- ALDRICH
•	M-MLV 5x Puffer	Promega
•	Maxima™SYBR Green/ROX qPCR Master Mi	x(2) Fermentas
		(St.Leon-Rot, Deutschland)
•	NucleoSpin® RNA II Isolation Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co.
		KG (Düren, Deutschland)
~ ~	Buffer und Lägungsonsätze	

2.2.2 Puffer- und Lösungsansätze

•	TBS bestehend aus:	TRIZMA®BASE (30,5g)
		NaCl (44g)
		5000ml Aqua dest.
		ph auf 7,6 eingestellt mit HCL
	zur Herstellung von TBST	ad 5ml Tween®20
•	Hämatoxylin nach Mayer:	1000ml Aqua dest. (70°C)
		1g Hämatoxylin
		0,2g NaJodat
		50g Kalialaun
		50g Chloralhydrat
		1g Zitronensäure
•	10mM Citrat Puffer:	1,47g Citric Acid ($C_6H_5Na_3$) in
		500ml Aqua dest.
		ph auf 6 eingestellt mit HCL
•	1M Zitronensäure	42g Zitronensäure in
		200ml Aqua dest.
•	0,1% Triton X100	0,2ml Triton X100 in
		200ml Aqua dest.

2.2.3 Labortechnisches Zubehör Geräte Hersteller/Firma SCHOTT (Mainz, Deutschland) Ph Meter CG 840 Waage BP310S SARTORIUS (Göttingen, Deutschland) Vortex Mixer SA7 STUART (Staffordshire, UK) Mikrowelle BOSCH (Stuttgart, Deutschland) BRAND GmbH + CO KG Messzylinder • (Wertheim, Deutschland) BRAND GmbH + Co KG Meßbecher Pipetten Eppendorf Research Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) Pap Pen BioGenex Light Cycler Roche (Mannheim, Deutschland) MENZEL-GLÄSER Deck Gläser (Braunschweig, Deutschland) Magnetröhre MR 3001 Heidolph (Schwabach, Deutschland) Magnetfisch Zentrifuge mini Spin plus Eppendorf AG Vortex-Genie2 Scientific Industries (Karlsruhe, Deutschland) Thermocycler (Mastercycler gradient) Eppendorf AG Sicherheitswerkbank BIOHAZARD Tritec (Hannover, Deutschland) Latex Handschuhe Charité Universitätsmedizin Berlin Biosphere®Filter Tips (DNA-free) Eppendorf/Gilson Eppendorfreaktionsgefäß 1,5ml Eppendorf AG LightCycler® Capillaries (20µl) Roche Reaktionsgefäßständer Eppendorf AG
•	Kühlschrank	BOSCH				
•	Tiefkühlschrank (-22°C)	BOSCH				
•	Gefrierschrank (-80°C)	Gesellschaft für Labortechnik				
		mbH (GFL)				
•	Pinzette					
•	Spatel					
•	Mikroskop (Axioskop 2)	Zeiss (Jena, Deuschland)				
•	Brutschrank	HERAEUS				
		(Hanau, Deutschland)				
•	Feuchte Kammer					
•	Färbeküvette mit Einsatz					
•	Aluminium Kühlblock Light Cycler	Roche				

2.2.4 Primer und Antikörper

		Hersteller/Firma
•	Prim AK (Anti-ST6GALNAC1 AK prod. in rabbit)- HPA014975	SIGMA-ALDRICH
•	Prim AK (Anti-NANP (AB2) AK prod. in rabbit)- SAB2900071	SIGMA-ALDRICH
•	Sek AK (goat anti-rabbit IgG-B)-Biotin conj.	Santa Cruz Biotechnology
•	Primer ST6GALNAC1 (AS+S) NM_018414	TIB MOLBIOL
•	Primer PMM1 (AS+S) NM_002676	TIB MOLBIOL
•	Primer GNE (AS+S) NM_005476	TIB MOLBIOL
•	Primer NANP (AS+S) NM_152667	TIB MOLBIOL
•	Primer FUT3 (AS+S) NM_000149	TIB MOLBIOL
•	Primer ST3GAL4 (AS+S) NM_006278	TIB MOLBIOL
•	Primer UGT2B17 (AS+S) NM_001077	TIB MOLBIOL
•	Primer HS6ST2 (AS+S) NM_001077188	TIB MOLBIOL
•	Oligo dT 15 Primer	Promega

2.3 Methoden

2.3.1 RNA Isolation aus humanem Kolongewebe

Die während der Operation gewonnenen Resektate wurden postoperativ in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C trocken gelagert.

Die Gesamt RNA wurde mit dem NucleoSpin® RNA II Isolation Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren,D) nach Herstellerangaben isoliert.

Zu Beginn wurden die Präparate mittels "Tissue-Tek" auf einer Metallplatte fixiert und bei -20°C in kürzester Zeit fixiert. Die Metallplatte wurde anschließend im Kryostat vor eine scharfe Klinge gespannt, um in Folge ca. 30mg Gewebe vom Resektatblock zu trennen. Mittels einer Pipettenspitze konnte danach das geschnittene Gewebe in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt werden. Um die gewonnenen Zellen aufzulösen, wurden die Eppendorfgefäße bei Raumtemperatur mit 350µl RA1 Puffer und 3,5µl β -mercaptoethanol befüllt. Mit einer 26G-Kanüle und einer 1ml Spritze wurde das Lysat auf und ab pipettiert bis die Zellen komplett in Lösung waren. Alle weiteren Schritte wurden exakt nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die gewonnene RNA wurde anschließend im Institut für Pathologie des Campus Benjamin Franklin, Steglitz mittels Bioanalyse von einer erfahrenen MTA auf Reinheit überprüft.

2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die von Kary B. Mullis im Jahre 1984 entwickelte PCR war ein Meilenstein für die Diagnostik und Grundlagenforschung in der Medizin und stellt heute eines der bedeutendsten Laborverfahren in der Molekularbiologie dar. Sie basiert auf dem Prinzip einer annähernd exponentiellen Vervielfachung kleinster Mengen DNA in sehr kurzer Zeit. Dabei wird auf die Hilfe von DNA-kopierenden Enzymen, den sogenannten DNA-Polymerasen, zurückgegriffen, welche aus hitzestabilen Bakterien (Thermus aquaticus) isoliert werden. Die DNA-Polymerasen beginnen mit der DNA-Synthese, nachdem sich DNA-spezifische Oligonukleotidsequenzen (*Primer*) an den DNA-Einzelstrang anlagern und somit das Startsignal zur DNA-Synthese einleiten. Die PCR wird in drei Phasen eingeteilt: (Phase 1 – Denaturierung) Durch eine dem Siedepunkt nahen Temperatur von 94°C werden die Doppelstränge der DNA-Probe linear aufgetrennt; (Phase 2 – Annealing) Durch Abkühlung auf 60°C wird eine optimale Temperatur für die Anlagerung der Primer an die komplementäre DNA geschaffen; (Phase 3 – Elongation)

Erhöht man nun die Temperatur auf 72°C, beginnt die DNA-Polymerase nach Anlagerung an den Primer mit dem Einbau der dNTPs, bis das 5´OH-Ende des DNA-Stranges erreicht ist und ein komplementärer Strang des Originalstranges vorliegt. Jeder folgende Zyklus führt theoretisch zur Verdopplung der vorhandenen DNA-Menge (2ⁿ⁻¹), was praktisch jedoch nicht zutrifft, da der durchschnittliche Kopiefaktor bei etwa 1,6 pro Zyklus liegt. Gründe dafür sind häufig suboptimale Reaktionsbedingungen sowie eine oft nachlassende Enzymaktivität.

2.3.2.1 Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA)

Ausgangsmaterial für die PCR ist immer DNA. Deshalb war es notwendig, aus der vom pathologischen Institut zur Verfügung gestellten RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (Moloney Murine Leukemia Virus RT = M-MLV-RT) cDNA zu synthetisieren. Die Reverse Transkriptase ist ein in verschiedenen Virusstämmen zu findendes Enzym und wurde erstmals in Retroviren (z.B. HIV) entdeckt. Die Viren benutzen die Reverse Transkriptase, um ihr Genom in DNA umzuschreiben und diese anschließend ins Wirtszell-Genom zu integrieren.

Alle für die cDNA Synthese benötigten Lösungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, von der Firma Promega (Madison, USA) bezogen. 2µg gelöste RNA wurden zu Beginn bei 70°C für 5 Minuten inkubiert und anschließend 1 Minute bei 4°C abgekühlt. Parallel dazu wurde ein Mastermix angesetzt, bestehend aus 2µl Oligo-dT-Primer, 2µl Desoxyribonukleotid-5`-triphosphat (10mM dNTPs; Sigma, München), 10µl M-MLV (5x) Puffer, 2µl M-MLV-RT sowie 2µl RNAsin (RNAse Inhibitor). Nachdem die RNA abgekühlt und Kondensüberstände herunterzentrifugiert (Zentrifuge mini Spin plus; Eppendorf AG) waren, wurde 18µl Mastermix in jede RNA-Probe pipettiert. Durch vorsichtiges Vortexen wurde ein Konzentrationsausgleich der RNA-Mastermix-Lösung hergestellt. Danach wurde die RNA-Mastermix-Lösung für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, wobei die cDNA-Synthese ablief. Anschließend wurde die Probe für 15 Minuten bei 70°C inkubiert, sodass die Reverse Transkriptase zerstört und bei der weiteren Verwendung der nun vorhandenen cDNA keinen Störfaktor mehr darstellte. Die für die real time PCR hergestellte cDNA wurde bei –20°C tiefgefroren.

2.3.2.2 Funktionsweise der quantitativen real time PCR

Die qRT-PCR ist ein schnelles und vollautomatisiertes Verfahren zur Quantifizierung der aus mRNA synthetisierten cDNA und erlaubt Rückschlüsse auf die

Genexpressivität. Sie ist gleich der herkömmlichen PCR eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, bei der mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen die Quantifizierung der gewonnenen DNA durchgeführt wird. Die Fluoreszenz-Messung wird während jedes PCR-Zyklus in Echtzeit (daher die Bezeichnung "real time") gemessen und ist proportional zur Menge des PCR-Produktes. Dies macht den Unterschied zu anderen quantitativen PCR-Verfahren deutlich, bei denen die guantitative Auswertung erst am Ende, meist durch gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente, stattfindet. Die Quantifizierung bei der real time PCR erfolgt in der exponentiellen Phase, da nur zu diesem Zeitpunkt optimale Reaktionsbedingungen gegeben sind. Allerdings ist die Phase der exponentiellen Vervielfältigung eher kurz, da die DNA-Vermehrung in der Start- sowie Endphase der PCR suboptimalen Bedingungen ausgesetzt ist und somit nicht exponentiell, sondern linear verläuft. Durch die Quantifizierung in der exponentiellen Phase ist es möglich, die Ausgangstemplatemenge (Template= DNA-Gehalt in der verwendeten Probe) mathematisch zu berechnen und darauf basierend genaue Aussagen über die Genexpression treffen zu können. Dabei bedient man sich der Hilfe von Standards mit bekannter Ausgangskonzentration, mit welchen es möglich ist, die Menge der ursprünglich in der Probe vorhandenen DNA zu bestimmen (siehe Kapitel 2.3.2.6).

Der in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. An diesen gebunden, absorbiert der Farbstoff-DNA-Komplex blaues Licht maximal bei einer Wellenlänge von 494nm und emittiert grünes Licht maximal bei einer Wellenlänge von 521nm. Die Emission bei 521nm wird sich bei dieser Methode zunutze gemacht. SYBR Green I war in dem von Fermentas gelieferten Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) enthalten, in welchem außer dem Fluoreszenzfarbstoff die DNA-Polymerase sowie die dNTP`s enthalten sind. Die Kombination dieser Substanzen in einem Mastermix ist sehr anwenderfreundlich und vermindert das Risiko von Pipettierfehlern.

2.3.2.3 Primer

Alle Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL Synthese GmbH (Berlin, Deutschland) bezogen. Um die Effektivität der Primer beurteilen zu können, wurden die Primer an verschiedenen Kolonzelllinien (LOVO, SW620 und HTC 116) getestet und die Schmelzkurven (melting curves – siehe Abbildung 6) der einzelnen Läufe beurteilt.

Waren diese nicht zufriedenstellend, wurde ein neuer Primer entwickelt und bei der Firma TIB MOLBIOL Synthese GmbH bestellt.



Abbildung 6: Schmelzkurvenanalyse

Haushaltungs-Gen (Housekeeping-Gen) Als Referenzgen wurde das PMM1 (Phosphomannomutase 1) verwendet. Housekeeping-Gene kodieren für spezifische Proteine, die an der Funktionalität des Zellstoffwechsels erheblich beteiligt sind und sollten idealerweise in jedem Zelltyp und Zellstadium konstant exprimiert werden, ohne durch interne oder externe Einflüsse in ihrer Expressivität beeinflusst zu werden. Der Einsatz eines solchen Housekeeping-Gens ist notwendig, da ohne dessen Verwendung die quantitative Korrelation zwischen RNA und cDNA während der Reversen Transkription einer ungewissen Ausbeute unterliegt und somit die Ermittlung der cDNA-Konzentration keinerlei Rückschluss auf die Ursprungs-RNA-Konzentration geben würde. Durch dessen Einsatz lassen sich bei Genexpressionsanalysen relative Quantifizierungen von Zielgenen durchführen. Die Primer für die zu untersuchenden Ziel-Gene von GNE, NANP, ST6GALNAC1, ST3GAL4, FUT3, UGT2B17 und HS6ST2 sowie für das Housekeeping-Gen PMM1 wurden mit Hilfe der Light Cycler Probe Design Softeware 2.0 entworfen (Tabelle 4).

Primer	Sequenz (5`zu 3`)	Position	Annealing- Temperature (C°)
GNE Sense	AGA GTG GAA CTC TGT GGA C	1694-1713	60
GNE Antisense	TCC TGT GCC TGT GAT AAG	1850-1832	60
NANP Sense	TTC TCG GAG TAC AAC CTG	591-609	60
NANP Antisense	AGC AGG TAA CTC TAG CAC AG	769-749	60
ST6GALNAC1 Sense	GAG CTC AAC TAC TCC TTG G	1159-1178	60
ST6GALNAC1 Antisense	AGT CGT GAC TGC TCA TTC TCC	1336-1316	60
ST3GAL4 Sense	CCA TCT GCT TAC GAG CTG	553-570	60
ST3GAL4 Antisense	CTG ATG ACC ACA TCG TAC TTG	749-729	60
FUT3 Sense	GTG GCT GTG TGT TTC TTC	714-732	60
FUT3 Antisense	TGT CCA TAG CAG GAT CAG	845-827	60
UGT2B17 Sense	TCA GTG TGG ACA TCA GGA C	1327-1345	60
UGT2B17 Antisense	TCA ATC CAG AAG ACT GCT CG	1483-1464	60
HS6ST2 Sense	CTC GGA GGA TGA GAG CTC	1417-1434	60
HS6ST2 Antisense	CTC CAG CTG GAT GTT ACG	1591-1574	60
PMM1 Sense	ATG CTG AAC ATC TCG CC	?	60
PMM1 Antisense	GTC AAA GCT GAT CAT GCC T	?	60

Tab. 4: Sequenzen der verwendeten Primer

2.3.2.4 Durchführung der quantitativen real time PCR Methode

Nachdem mit Hilfe der Reversen Transkriptase die mRNA-Proben aus Normal- sowie Tumorgewebe von 17 Kolonkarzinompatienten in cDNA umgeschrieben waren, konnte der Ansatz für die real time PCR erstellt werden. Es standen daher 34 DNA- Proben bereit, die auf Genexpression (von GNE, NANP, ST6GALNAC1, ST3GAL4, FUT3, UGT2B17 und HS6ST2) jeweils in Doppelbestimmung untersucht werden sollten. Aus dem PCR-Produkt der anfangs erstellten Standardkurven (siehe Abbildung 7) für die Zielgene und PMM1 wurde für jedes Gen jeweils eine Verdünnungsreihe gewählt und mit Verdünnungsreihen den der anderen Zielgene zu einem Kalibrator zusammengemischt. Dieser Kalibrator wurde in jedem PCR-Lauf in Doppelbestimmung für Ziel- und Housekeeping-Gen eingesetzt, um die PCR-Effizienz der einzelnen Läufe untereinander vergleichen zu können. Die sich daraus ergebenden 644 Messungen wurden in 42 Läufen unter jeweils gleichen Bedingungen durchgeführt.

Alle Vorbereitungsarbeiten für jeden real time PCR-Lauf mit dem LightCycler (Kapitel 2.3.2.5) fanden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank (Tritec) statt. Zu Beginn wurde

die cDNA aufgetaut, im Verhältnis 1:4 mit nukleasefreiem-Wasser (DMPC-Wasser = Dimethyl-Pyrocarbonat/ von SIGMA-ALDRICH) verdünnt und anschließend auf Eis gelagert. Vor seiner Anwendung wurde DMPC (SIGMA-ALDRICH) 1:1000 mit H₂O verdünnt und anschließend autoklaviert. Um Pipettierfehler zu vermeiden, wurde ein Mastermix angesetzt, welcher die Primer (Sense und Antisense) sowie den von Fermentas gelieferten Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) enthielt. Der Mastermix enthielt pro zu untersuchender Probe 0,5µl jedes Primers (S und AS) sowie 5µI Maxima[™] SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) und wurde ebenso auf Eis gelagert. Je nach Anzahl der durchzuführenden Reaktionen wurden die einzelnen Volumina vergrößert und anschließend vorsichtig mit Hilfe des Vortexers (Vortex-Genie2 / Scientific Industries) gemischt. Nun wurden die Kapillaren für den real time PCR-Lauf (LightCycler® Capillaries (20µl) /Roche) in einen Aluminium Kühlblock (Roche) gestellt und mit 6µl Mastermix unter Verwendung von nukleasefreien Pipettenspitzen (Biosphere®Filter Tips (DNA-free)/ Eppendorf/Gilson) befüllt. Danach wurden die Kapillaren mit 4µl Patienten-cDNA befüllt, sodass in jeder Kapillare ein PCR-Ansatz von 10µl zu finden war.

In jedem Lauf wurden zusätzlich zwei Messungen mit DMPC- Wasser anstelle der Patienten cDNA durchgeführt, welches zu den Reagenzien des jeweiligen Mastermixes in die Kapillaren pipettiert wurde und als Kontaminationskontrolle der eingesetzten Reagenzien diente. Anschließend wurden die Kapillaren verschlossen und bei 3000 x g für 5 Sekunden in einer Tischzentrifuge (Zentrifuge mini spin plus / Eppendorf AG) zentrifugiert. Daraufhin wurden die Kapillaren in das Probenkarussel des LightCyclers (Roche) einsortiert und der Deckel des Gerätes verschlossen. Durch Öffnen der LightCycler Software Version 3.5 (Roche) (Kapittel 2.3.2.5) wurde das Programm gestartet und die Proben in Echtzeit untersucht. Am Ende eines jeden Laufes wurde der Rotor entladen und die Kapillaren verworfen.

P	is Name	Standard	Calculat	Cross	Step 1: Baseline Step 2: Analysis
- 1	NANP 1:10E5	1.000E+07	1 096E+07	12.78	Hick-
- 2	Repli. of NANP 1:10E5	1.000E+07	1.083E+07	12.80	
- 3	NANP 1:10E6	1.000E+06	9.876E+05	16.63	
- 4	Repli. of NANP 1:10E6	1.000E+06	9.814E+05	16.64	57
- 5	NANP 1:10E7	1.000E+05	9.957E+04	20.29	
- 6	Repli, of NANP 1:10E7	1.000E+05	1.008E+05	20.27	5.5-
- 7	NANP 1:10E8	1.000E+04	9 506E +03	24.05	
- 8	Repli. of NANP 1:10E8	1.000E+04	9.564E+03	24.04	5-
- 9	NANP 1:10E9	1.000E+03	8 931E+02	27.82	
- 10	Repli. of NANP 1:10E9	1.000E+03	1.003E+03	27.64	45-
- 11	NANP 1:10E10	1.000E+02	9.949E+01	31.33	
- 12	Repli, of NANP 1:10E10	1.000E+02	7.245E+01	31.84	4-
- 13	NANP 1:10E11	1.000E+01	1.487E+01	34.37	
- 14	Repli. of NANP 1:10E11	1.000E+01	9 426E+00	35.10	
- 15	NANP 1:10E12	1.000E+00			
- 16	Repli. of NANP 1:10E12	1.000E+00	1.053E+00	38.60	
- 17	H20 NANP				
1,	2 Grouped Means	1.000E+07	1.089E+07	12.79	
	Grouped S.D.		9 283E+04	0.0136	Ē 2,5-
3,	4 Grouped Means	1.000E+06	9.845E+05	16.63	
	Grouped S.D.		4.430E+03	0.00719	2-
5,	Grouped Means	1.000E+05	1.002E+05	20.28	
	Grouped S.D.		8.870E+02	0.0141	
7,	3 Grouped Means	1.000E+04	9 535E+03	24.04	
	Grouped S.D.		4.122E+01	0.00691	
9,	10 Grouped Means	1.000E+03	9.482E+02	27.73	
	Grouped S.D.		7.792E+01	0.131	
11	,12 Grouped Means	1.000E+0Z	8.597E+01	31.58	
	Grouped S.D.		1.912E+01	0.358	
13	,14 Grouped Means	1.000E+01	1.215E+01	34.73	
	Grouped S.D.		3847E+00	0.515	
15	,16 Grouped Means	1.000E+00	1.053E+00	38.60	0.5-1
	Grouped S.D.				0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
					Lycis Number

Abbildung 7: Standartkurve am Beispiel des Target Gens NANP



Abbildung 8: Beispiel eines qRT-PCR Laufes mit 30 Proben

2.3.2.5 Light Cycler-System

Die real time PCR Läufe wurden mit dem LightCycler[™] real time PCR System der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) durchgeführt. Zu seinen Funktionseinheiten gehören eine beheizbare Reaktionskammer (Thermocycler), das Probenkarussell, in welchem pro Lauf maximal 32 Proben Platz finden, sowie ein Fluorimeter, welches die optische Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes zur Aufgabe hat. Mit Hilfe der LightCycler Software Version 3.5 (Roche) konnten die Floureszenzkurvenscharen direkt online auf dem PC verfolgt werden. Die Programmierung des LightCyclers erfolgte vor Beginn der Experimente (siehe Tabelle 5).

<u>1. Aktivierung:</u> Zu Beginn wurden die Proben für 10 Minuten mit einer maximalen Geschwindigkeit von 20 °C/Sekunde auf 95°C hochgeheizt, was zur Denaturierung doppelsträngiger DNA und zur Aktivierung der bis dahin inhibierten DNA-Polymerase führte.

<u>2. Amplifikation:</u> Die Amplifikationsphase wurde auf 45 Zyklen programmiert, wobei ein Zyklus in drei Abschnitte gegliedert war. Am Anfang jedes Zyklusses wurde die Temperatur auf 95°C erwärmt und für 5 Sekunden konstant gehalten, was zur Denaturierung der doppelsträngigen cDNA führte. Anschließend wurde durch die Abkühlung auf 60°C und das Halten dieser Temperatur für 10 Sekunden die Anlagerung der Primer an die sequenzspezifische Ziel-DNA erreicht. Im dritten Schritt wurden durch Temperaturerhöhung auf 72°C optimale Arbeitsbedingungen für die DNA-Polymerase geschaffen. Diese Bedingungen wurden für 20 Sekunden aufrecht erhalten und führten jeweils zu einer Verlängerung (Elongation) der vorhandenen DNA-Stränge. Am Ende dieser Reaktionsphase wurde automatisch die Fluoreszenzmessung durchgeführt (Aquisition mode: single) und der Anstieg der PCR-Produkte während der laufenden PCR mit Hilfe der Software auf dem Bildschirm des PC sichtbar gemacht. Die Temperaturregelung aller drei Schritte erfolgte mit einer maximalen Geschwindigkeit von 20°C/Sekunde.

<u>3. Schmelzkurve:</u> Während des Programmabschnittes zur Schmelzkurvenermittlung wird im letzten Schritt die Temperatur von 65°C mit einer Geschwindigkeit von 0,1°C/Sekunde sehr langsam auf 95°C erhöht. Da die Fluoreszenzmessung in diesem Abschnitt des Programmes kontinuierlich verläuft (Acquisition Mode: Continuous), kann man mit zunehmender Temperatur eine abnehmende Fluoreszenz verfolgen, da sich die Doppelstränge langsam trennen. In Abhängigkeit der zwischen den einzelnen Basenpaaren existierenden Wasserstoffbrückenbindungen gibt es für jeden DNA-

Doppelstrang eine bestimmte "Schmelzpunkttemperatur", bei der das gemessene Fluoreszenzsignal schlagartig gegen Null geht. Enthält ein DNA-Doppelstrang viele Cytosin – Guanin Basenpaare, zwischen denen drei Wasserstoffbrücken existieren, ist die zu erwartende "Schmelzpunkttemperatur" höher als in einem Adenin – Thymin (zwei Wasserstoffbrücken) reichen DNA-Doppelstrang.

<u>4. Kühlung:</u> Am Schluss wird das Gerät mit einer Geschwindigkeit von 20°C/Sekunde für 30 Sekunden auf eine Temperatur von 40°C abgekühlt.

Tab. 5: Versuchsprotokoll mit den PCR-Bedingungen während aller Läufe im LightCycler (Roche)

Experimental Protocol							
Program:	Activation			Type:	None	Cycles	1
Segment	Temperature	Hold Time	Slope	2° Target	Step Size	Step Delay	Acquisition
Number	Target (°C)	(sec)	(C°/sec)	Temp (°C)	(C°)	(Cycles)	Mode
1	95	600	20	0	0	0	None
Program:	Amplification			Type:	Quantification	Cycles	45
Segment	Temperature	Hold Time	Slope	2° Target	Step Size	Step Delay	Acquisition
Number	Target (°C)	(sec)	(C°/sec)	Temp (°C)	(C°)	(Cycles)	Mode
1	95	5	20	0	0	0	None
2	60	10	20	0	0	0	None
3	72	20	20	0	0	0	Single
Program:	Melting Curve			Type:	None	Cycles	1
Segment	Temperature	Hold Time	Slope	2° Target	Step Size	Step Delay	Acquisition
Number	Target (°C)	(sec)	(C°/sec)	Temp (°C)	(C°)	(Cycles)	Mode
1	95	0	20	0	0	0	None
2	65	15	20	0	0	0	None
3	95	0	0.1	0	0	0	Continuous
Program:	cooling			Type:	None	Cycles	1
Segment	Temperature	Hold Time	Slope	2° Target	Step Size	Step Delay	Acquisition
Number	Target (°C)	(sec)	(C°/sec)	Temp (°C)	(C°)	(Cycles)	Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

2.3.2.6 Auswertung der Ergebnisse

Die während der real time PCR an den PC übermittelten Messwerte wurden mit der RelQuant Software Version 1.0 (Roche) ausgewertet. Bei der relativen Quantifizierung ist es nötig, die Expression der Ziel-DNA auf ein Referenzgen (Housekeeping-Gen) zu beziehen, wodurch es möglich wird, die Expression der Ziel-DNA in verschiedenen Proben miteinander zu vergleichen. Durch die Unterschiede der real time PCR-Effizienzen für die Zielgene und das Referenzgen, welche u.a. durch Abweichungen des Primer-Annealings, des Guanin-Cytosin-Gehaltes sowie der Länge des PCR-Produktes hervorgerufen werden, ist es notwendig, zur relativen Quantifizierung für jedes Gen eine Standartkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsreihen zu erstellen und aus deren Steigung die jeweilige PCR-Effizienz zu berechnen. Die RelQuant Software errechnet aus den Crossing Points (Cp) der Proben unter Verwendung der vorher bestimmten Standardkurve das Verhältnis von cDNA gegenüber dem Referenzwert. Als Cp wird der Wert definiert, der den Zyklus beschreibt, bei dem erstmals ein Fluoreszenzsignal der Probe über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

2.3.3 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Färbung wurden Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte verwendet. Zwei Gene (ST6GALNAC1 und NANP) wurden für die immunhistochemische Analyse ausgewählt. Diese standen im Fokus, da NANP bei der Genexpressionsanalyse gemittelt eine über 3-fach gesteigerte Expression im Tumorgewebe bei allen Patienten zeigte und dadurch die Hoffnung geweckt wurde, einen potentiellen Biomarker für das Kolonkarzinom gefunden zu haben. ST6GALNAC1 war aus molekularbiologischer Sicht hoch interessant, da sich viele wissenschaftliche Arbeiten bereits mit diesem Enzym und dessen Produkt beschäftigten und der Vergleich mit meinen Ergebnissen eine spannende Diskussion vermuten ließ.

Alle Paraffinschnitte, die in dieser Arbeit für die immunhistochemische Färbung verwendet wurden, sind von einer erfahrenen MTA im chirurgischen Forschungslabor angefertigt und für meine Arbeit zur Verfügung gestellt worden.

2.3.3.1 Die ABC-Methode

Avidin-Biotin-Enzym-Komplex Die Methode ist ein hochsensitives immunhistochemisches Verfahren, welches auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin, einem Hühnereiweiß- Glykoprotein, zum Biotin (Vitamin H) beruht. Zum Einsatz kommen enzymmarkierte Avidin-Biotin-Komplexe, welche an einen biotinylierten Sekundären-Antikörper binden. Dieser Sekundär-Anitkörper ist wiederum an einen Primären-Antikörper gebunden, welcher hochspezifisch an die zu untersuchende Antigendeterminante bindet. Das Avidin der ABC-Methode, wurde in dieser Arbeit durch Streptavidin, einem 60 kDa Protein aus dem Bakterium Streptomyces avidinii ersetzt und führt daher zu der Bezeichnung Labelled Streptavidin-Biotin Methode (LSAB-Methode). Das Streptavidin des Biotin-Enzymkomplexes kann in Geweben mit reichlich endogenem Biotin, wie Leber, Gehirn und Niere, an dieses binden und so zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung führen. Da kolorektales Gewebe scheinbar nur wenig endogenes Biotin besitzt, zeigte sich diesbezüglich keine unspezifische Hintergrundfärbung. Als Enzym wurde Streptavidin gekoppelte alkalische Phosphatase verwendet, welche nach Reaktion mit seinem Substrat zu einer roten Farbreaktion führt. Eine vermehrte Aktivität endogener Phosphatase findet sich in Geweben wie dem Blasenepithel, der Lamina propria von Eierstöcken, Niere und Speicheldrüsen sowie dem Bürstensaum von Dünndarmepithelzellen. Um die Gefahr einer unspezifischen Hintergrundfärbung durch endogene Phosphatase zu verhindern, wurden die Paraffinschnitte für 10 min in 1M Zitronensäure inkubiert um die endogene Phosphataseaktivität zu blockieren.

Grundvoraussetzung für einen erfolgreichen immunhistochemischen Nachweis von Antigenen in Geweben sind der Erhalt des antigenen Bereiches sowie die Zugänglichkeit zur antigenen Determinante, um eine Bindung des Primär-Antikörpers zu gewährleisten. Da Antigene im fixierten Gewebe häufig maskiert sind, ist es notwendig, den entparaffinierten Schnitt vor Aufbringen des Primär-Antikörpers vorzubehandeln. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Gewebeschnitte in dieser Arbeit in 10mM Natriumcitrat Puffer (pH 6) einer Hitzbehandlung in der Mikrowelle unterzogen. Die dabei einwirkende Hitze führt zum Aufbrechen der bei der Formalinfixierung entstehenden Methylbrücken, welche durch Quervernetzung zu Strukturveränderungen von Proteinen führen und somit die gesuchten Antigene verdecken. Bei der Mikrowellenbehandlung muss streng darauf geachtet werden, dass eine Austrocknung des Gewebes vermieden wird, da die Zellen sonst zerstört würden und für eine immunhistochemische Untersuchung unbrauchbar wären.



Abbildung 9: Die ABC- (LSAB) Methode: An die zu untersuchende Antigendeterminante bindet hochspezifisch der Primär-Antikörper, an welchen wiederrum ein biotinylierter Sekundärantikörper gebunden wird. Duch die Substitution von enzymmarkierten (alkalische Phosphatase) Streptavidin-Biotin Molekülen kommt es im weiteren Verlauf zur Bindung dieser Moleküle an das Biotin des Sekundär-Antikörpers. Im letzten Schritt erfolgt das Aufbringen der Farbreagenz, durch welche es enzymbedingt zu einer Rotfärbung der Antigendeterminate kommt.

2.3.3.2 Protokoll der immunhistochemischen Färbung

Falls nicht anders beschrieben, wurden alle Schritte unter Raumtemperatur durchgeführt. Bei jedem Durchlauf wurde zu den Objektträgern mit dem zu untersuchenden Patientengewebe parallel eine Negativ- und Positivkontrolle gefärbt, um die Effizienz der Methode zu bestätigen. Bei der Negativkontrolle wurde anstelle des Primär-Antikörpers ausschließlich Antikörperverdünnungspuffer auf den Gewebeschnitt aufgetragen. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um einen Objektträger mit Kolonkarzinomgewebe, welcher bei der Etablierung des Primär-Antikörpers eine ausgesprochen starke Färbung zeigte.

1. Entparaffinierung

 Alle Paraffinschnitte wurden zu Beginn 3-mal f
ür jeweils 5 Minuten in 100%igem Xylol (J.T.Baker) entparaffiniert. Im direkten Anschluss wurden die Schnitte wiederum f
ür jeweils 5 Minuten in absteigender Alkoholreihe bis zum Aqua bidest. (2-fach destilliertes Wasser) hydratisiert, beginnend mit 2-mal jeweils 5 Minuten in 100%igem Ethanol (ROTH), über 5 Minuten in 96%igem Ethanol und letztlich 5 Minuten in 70%igem Ethanol. Es folgte eine zweimalige kurze Hydratisierung in 2-fach destilliertem Wasser.

2. Demaskierung der Antigene

- Die Objektträger wurden aus dem Wasserbad genommen, in mit 10mM Citrat Puffer (pH6) gefüllte Glasküvetten gestellt und diese in der Mikrowelle postiert. Der Puffer wurde mit Na-Citrat (SIGMA) hergestellt, wobei der pH von 6 mit HCl (MERCK) eingestellt wurde.
- In der Mikrowelle folgten 2 Kochdurchgänge. Durchgang 1 dauerte 5 Minuten bei einer Leistung von 900 Watt und Durchgang 2 weitere 5 Minuten bei einer Leistung von 180 Watt.
- Nach dem Kochen wurden die Schnitte aus der Mikrowelle genommen und f
 ür 25 Minuten bei Raumtemperatur abgek
 ühlt.
- Nachdem die Schnitte abgekühlt waren, wurden sie 2-mal kurz in 2-fach destilliertem Wasser gewaschen.

3. Blockierung der endogenen Phosphatase

- Um eine unspezifische Gewebereaktion in den Paraffinschnitten zu vermeiden, wurde die endogene Phosphatase mittels 1M Zitronensäure für einen Zeitraum von 10 Minuten geblockt.
- Im Anschluss wurden die Objektträger wieder 2-mal mit 2-fach destilliertem Wasser gespült.

4. Proteinblock

- Nachdem die Schnitte 2-mal kräftig mit Aqua bidest. gespült wurden, folgte im Anschluss ein 5 minütiger Waschvorgang in TBS (pH 7,6)+ 0,1% Tween (=TBST) Waschpufferlösung.
- Nun wurden die Objektträger aus dem Pufferbad genommen, in eine feuchte Kammer gelegt und die auf dem Objektträger verbleibende Pufferlösung

vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurde der Paraffinschnitt mit einem Fettstift (Pap Pen von BioGenex) zirkulär umrandet und erneut mit TBST beträufelt, um diesem vor dem Austrocknen zu schützen.

 Nachdem diese Prozedur mit allen Objektträgern erfolgt war, wurden die Objektträger erneut vorsichtig abgesaugt und für 5 Minuten mit einer Blockierungsreagenz (Power Block™ der Firma BioGenex) betropft, welche 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt wurde. Dieser Schritt erfolgte, um eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden.

5. Aufbringen des Primär-Antikörpers

- Das Blockierungsreagenz wurde vorsichtig abgesaugt und der bei –20°C gelagerte Primär-Antikörper (ST6GALNAC1 antibody produced in rabbit/ HPA014975 / SIGMA-ALDRICH), nachdem er bei Raumtemperatur aufgetaut war, in einer Verdünnung von 1:200, bzw. der bei -80°C gelagerte Primär-Antikörper (NANP antibody produced in rabbit/ SAB2900071 / SIGMA-ALDRICH) in einer Verdünnung von 1:150, auf das Gewebe aufgetragen. Durch eine Reihe von vorangegangenen Versuchen konnte diese Antikörperkonzentration als die optimale ermittelt werden. Als Verdünnungsmittel diente ein Antikörperverdünnungspuffer (DCS LabLine), welcher durch die spezifische Primär-Antikörpers eine ungewünschte Hintergrundfärbung Bindung des hemmen soll, eine Stabilisierung des AK auf chemischer und mikrobiologischer Ebene bewirkt und die Zerstörungsgefahr des AK durch Proteasen verringert.
- Die Inkubation erfolgte über eine Zeitspanne von 45 Minuten in einem Brutschrank (HERAEUS) bei 37°C.
- Nach der Inkubation wurden die Objektträger 3-mal f
 ür jeweils 5 Minuten in TBST- Waschpuffer getaucht und somit abgesp
 ült.

6. Aufbringen des Sekundär-Antikörpers

 Vorsichtig wurden die Waschpufferüberstände abgesaugt und der Sekundär-Antikörper (Goat-Anti rabbit IgG-biotinylierter AK / CatFF: SC-2040 / Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen. Als Verdünnungsmittel diente erneut die Antikörperverdünnung (DCS LabLine).

- Die Inkubation erfolgte über eine Zeitspanne von 30 Minuten in einem Brutschrank (HERAEUS) bei 37°C.
- Nach der Inkubation wurden die Objektträger 3-mal f
 ür jeweils 5 Minuten in TBST- Waschpuffer getaucht und somit abgesp
 ült.

7. Aufbringen des Streptavidin-Biotin-Enzymkomplexes

- Vorsichtig wurden die Waschpufferüberstände abgesaugt und das Gewebe mit Streptavidin-Biotin gebundener Phosphatase (KPL) betropft.
- Die Inkubation erfolgte über eine Zeitspanne von 30 Minuten in einem Brutschrank (HERAEUS) bei 37°C.
- Nach der Inkubation wurden die Objektträger 3-mal f
 ür jeweils 5 Minuten in TBS-Waschpuffer getaucht und somit abgesp
 ült.

8. Farbreaktion

- Parallel zum Spülen der Objektträger wurde die Farbreagenz vorbereitet, welche mit der Streptavidin-Biotin gebundenen Phosphatase eine rote Farbreaktion ergeben sollte. Das Substrat (Buffered Substrate Solution / KPL) wurde 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. Der Farbstoff (Ph Thalo RED / KPL) wurde 1:1 mit einem Aktivator (Activator Solution / KPL) bei abgedunkeltem Raum vermischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesen 3 Minuten wurde die Substratverdünnung in das Farbstoff-Aktivator Gemisch pipettiert.
- Nun wurden die Waschpufferüberstände vorsichtig von den Objektträgern abgesaugt und das Substrat-Farbstoffgemisch auf die Gewebeschnitte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten konnten makroskopisch rote Färbungen im Gewebeschnitt gesehen werden.
- Die Objektträger wurden kurz in TBS gespült, bevor sie 30 Sekunden zum Färben in ein Hämatoxylinbad gestellt wurden.
- Anschließend wurden sie zum Bläuen für 5 Minuten in einer Färbeküvette unter fließendes Leitungswasser gestellt.

- 9. Entwässerung und Eindecklung der Objektträger
 - Zur Entwässerung der Gewebeschnitte wurden die Objektträger jeweils kurz in 70%iges Ethanol, dann in 96%iges Ethanol getaucht, bevor sie für 2 Minuten in ein 100%iges Ethanolbad (ROTH) gestellt wurden.
 - Anschließend wurden die Objektträger 2-mal f
 ür jeweils 5 Minuten in 100%igem Xylol entwässert.
 - Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Objektträger einzeln aus dem Xylol genommen. Ein Deckglas (MENZEL GLÄSER) wurde mit Hilfe eines Spatels dezent mit Roti Histokit (ROTH) bestrichen und auf dem Objektträger über dem Gewebeschnitt platziert.
 - Zum Trocknen wurden die Präparate über Nacht bei Raumtemperatur unter der Abzugshaube aufbewahrt.

2.3.3.3 Permeabilisierung

Zusätzlich ist es möglich, während der immunhistochemischen Färbung die Zellenmembranen für eine bessere intrazelluläre Färbung verstärkt durchgängig zu machen. Dieser Schritt wurde bei der Färbung von NANP nach der Demaskierung der Antigene mittels 10mM Natrium Citrat Puffer (2.Schritt im Protokoll) durchgeführt. Die Substanz, welche dies ermöglichte, ist Triton X100.

- Nach der Demaskierung der Antigene wurden die Objektträger nun 5 min in Glasgefäße gestellt, welche mit 0,1% -igem Triton X100 gefüllt waren.
- Anschließend wurden die Objektträger 2-mal kräftig mit 2-fach destilliertem Wasser gespült.
- Es folgte (siehe Protokoll) die Blockierung der endogenen Phosphatase.

2.3.3.4 Auswertung der Ergebnisse

Die fertig gefärbten und eingedeckten Objektträger wurden nun unter dem Mikroskop begutachtet, ausgewertet und abfotografiert. Begutachtet wurden mehrere high power fields in den jeweiligen Vergrößerungen. Um subjektive Fehleinschätzungen zu vermeiden, erfolgte eine Kontrolle durch eine erfahrene MTA. Zur Auswertung wurden verschiedene Scores verwendet.

- wurde die F\u00e4rbeintensit\u00e4t der jeweiligen Gewebe (Tumor- oder Normalgewebe) beurteilt. Intensit\u00e4t: 0=keine; 1=schwach; 2=mittel; 3=stark
- wurde die Anzahl der Zellen in den jeweiligen Geweben (Tumor- oder Normalgewebe) ausgezählt, in welchen eine Farbrektion zu sehen war. Anzahl: 1:<25%; 2: 25-49%; 3: 50-75%; 4:>75% und
- wurde die Intensität der Färbung beider Gewebe (Tumor- gegen Normalgewebe) miteinander verglichen und mit den Worten schwächer, gleich und stärker beschrieben.

Die Bilder wurden mit Hilfe der am Mikroskop befestigten Kamera abfotografiert und mit der Software Axio Vision 3.1 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bearbeitet, welche im Betriebssystem Windows 95 installiert war.

2.3.4 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde die Software von Microsoft Excel (Version 2003) sowie SPSS (Version 18.0) verwendet. Für die Ermittlung des Grades des Zusammenhanges der Messdaten zwischen den beiden Messverfahren (MA und qRT-PCR) diente die Korrelationsanalyse nach Spearman Rho. Diese wurde gewählt, da sie robust gegenüber Ausreißern ist und nicht von einer linearen Beziehung zwischen den zu untersuchenden Variablen ausgeht.

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede der Genexpression zwischen Normal- und Tumorgewebe wurde der Wilcoxon Test verwendet. Dieser ist ein nichtparametrischer Test, mit welchem überprüft werden kann, ob sich die zentrale Tendenz zweier verbundener Stichproben signifikant voneinander unterscheidet. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p<0,05 angenommen.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expressivität ausgewählter Gene (siehe 1.5) auf transkriptionaler Ebene in gesunder Kolonschleimhaut (Normalgewebe = N) sowie in maligne veränderter Kolonschleimhaut (Tumorgewebe = T) mittels quantitativer real time Polymerase Kettenreaktion untersucht. Die ermittelten qRT-PCR Ergebnisse wurden mit den vorliegenden, am selben Gewebe gewonnenen, MA-Genexpressionsdaten verglichen.

Der Korrelationsgrad beider Analyseverfahren bildete den Schwerpunkt des Vergleichs. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe wurde der Wilcoxon Test angewendet. Des weiteren wurde für zwei der untersuchten Gene (siehe 3.6) eine Proteinexpressionsanalyse mittels Immunhistochemie durchgeführt und mit den für diese Gene ermittelten Genexpressionswerten abgeglichen.

3.1 Deskriptive Analyse der mittels gRT-PCR untersuchten Gene

Es wurden 7 Ziel Gene (Targets) ausgewählt, die bei der Genexpressionsanalyse mittels MA relevante Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe gezeigt hatten (siehe 1.4). Fünf dieser Gene codieren für Enzyme, die an der Sialinsäurebiosynthese beteiligt bzw. an der Synthese sialinsäuretragender Antigene beteiligt sind. Weiterhin wurden die zwei Gene untersucht, die bei der MA-Analyse den größten positven und den größten negativen Expressionsunterschied zeigten. Einführend wird zu jedem Gen der Mittelwert, Median, Maximalwert, Minimalwert, Fold Change (N/T) sowie die Standardabweichung der nicht kritisch beurteilten Expressionswerte ausgewiesen. Erwartungsgemäß ergeben sich bei einigen Genen nicht unerhebliche Differenzen zwischen Median und Mittelwert, da wegen der geringen Stichprobenzahl weder ein Test auf Normalverteilung noch auf die Existenz von Ausreißern der nicht kritisch beurteilten Expressionswerte erfolgte. Weiterhin wurde anhand der klinischen Parameter jedes einzelnen Patienten versucht, einen Zusammenhang zur jeweiligen Genexpression herzustellen.

3.1.1 Deskriptive Analyse des Target Gens GNE

Für das Target-Gen GNE wurde für die beiden untersuchten Nukleotidsequenzen (Normal- und Tumorgewebe) eine heterogene Tendenz der Genregulation gefunden. Bei 5 Patienten (1,2,4,7 und 8; entspricht 29,4%) konnte im Tumorgewebe eine erhöhte Genexpression nachgewiesen werden, wohingegen sich bei den übrigen 12 Patienten (70,6%) die Genexpression im Tumorgewebe als erniedrigt darstellte (siehe Abbildung 10).



Abbildung 10: Relative Expressionswerte des Target Gens GNE im Normal- und Tumorgewebe beim Kolonkarzinom

Das arithmetische Mittel aller Werte des Normalgewebes beträgt 0,06, bei einer Standardabweichung von 0,05. Das arithmetische Mittel aller Werte für das Tumorgewebe war 0,04, bei einer Standardabweichung von 0,05. Der mittels qRT-PCR ermittelte Fold Change (N/T) der Mittelwerte beträgt demnach 1,5. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe war 0,01, der größte (Max) 0,19. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 0,01, der größte ermittelte Wert (Max) bei 0,21. Der Median für die Messwerte des Normalgewebes konnte mit 0,05 ermittelt werden. Der Median für die Messwerte des Tumorgewebes war 0,03. Hinsichtlich der Heterogenität bei der Genexpression einzelner Patientenstichproben für das Zielgen GNE konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zu Tumorlokalisation, Entstehung von Rezidiven, Alter des Patienten und dem Grad oder Stadium der Erkrankung festgestellt werden (siehe Tabelle 3, Kapitel 2.1).

3.1.2 Deskriptive Analyse des Target Gens NANP

Bei allen 17 Patienten (100%) zeigte sich auf mRNA Ebene eine gesteigerte Expression des Gens NANP im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe (siehe Abbildung 11).



Abbildung 11: Relative Expressionswerte des Target Gens NANP im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Das arithmetische Mittel aller Werte des Normalgewebes beträgt 0,14 bei einer Standardabweichung von 0,06. Das arithmetische Mittel für das Tumorgewebe beträgt 0,48 bei einer Standardabweichung 0,19, 3,4-fachen von was einer Genexpressionserhöhung im Tumorgewebe verglichen zum Normalgewebe entspricht. Der mittels gRT-PCR ermittelte Fold Change (N/T) der Mittelwerte beträgt demnach 0,29. Der Median aller Werte im Normalgewebe beträgt 0,13 und im Tumorgewebe 0,51. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe war 0,06, der größte (Max) 0,33. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 0,19, der größte ermittelte Wert (Max) bei 0,86. Aufgrund der einheitlich gesteigerten Genexpression im Tumorgewebe kann vermutet werden, dass NANP möglicherweise eine Rolle bei der Pathogenese des Kolonkarzinoms einnimmt.

3.1.3 Deskriptive Analyse des Target Gens ST6GALNAC1

Dieses Gen konnte nur bei 14 Patienten erfolgreich untersucht werden, da bei 3 Patienten (13, 14 und 15) sämtliche Wiederholungen der real time PCR Läufe aufgrund von verunreinigten cDNA Proben missglückten. Letztendlich stand keine cDNA mehr zur Verfügung und sämtliches Gewebe für eine erneute RNA Isolation war aufgebraucht. Bei 13 Patienten (92,9%) lässt sich im Normalgewebe eine deutlich erhöhte Genexpression im Vergleich zum Tumorgewebe nachweisen (siehe Abbildung 12). 1 Patient (Pat. 10) zeigt eine höhere Expression im Tumorgewebe.



Abbildung 12: Relative Expressionswerte des Target Gens ST6GALNAC1 im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Der Mittelwert der Genexpression im Normalgewebe beträgt 4,33 bei einer Standardabweichung von 1,55. Der für das Tumorgewebe bestimmte Mittelwert liegt bei 1,5, bei einer Standardabweichung von 1,91. Der mittels qRT-PCR ermittelte Fold Change (N / T) der Mittelwerte beträgt demnach 2.89. Der Median beim Normalgewebe liegt bei 4,02, beim Tumorgewebe bei 0,89. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe war 2,34, der größte (Max) 7,83. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 0,16, der größte ermittelte Wert (Max) bei 7,43. Ohne den irregulär erscheinenden Patienten 10 ist eine wesentlich geringere Variationsbreite zu verzeichnen und der Max-Wert im Tumorgewebe verringert sich auf 2,96. Da fast ausschließlich alle Patienten eine Expressionsverringerung im Tumorgewebe zeigten,

ist davon auszugehen, dass ST6GALNAC1 im Zusammenhang mit der Pathogenese des Kolonkarzinoms steht.

3.1.4 Deskriptive Analyse des Target Gens ST3GAL4

Auch für das Gen ST3GAL4 lässt sich für die beiden untersuchten Nukleotidsequenzen eine heterogene Genexpression feststellen (siehe Abbildung 13). Bei 7 Patienten (1,3,4,7,8,9 und 10) (41,2%) zeigte sich im Tumorgewebe eine gesteigerte Genexpression, wohingegen bei den übrigen 10 Patienten (58,8%) eine verringerte Genexpression im Tumorgewebe festzustellen ist.



Abbildung 13: Relative Expressionswerte des Target Gens ST3GAL4 im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Das arithmetische Mittel der Genexpressionswerte für das Normalgewebe beträgt 1,64 bei einer Standardabweichung von 1,55. Das für das Tumorgewebe bestimmte arithmetische Mittel der Genexpression beträgt 0,85 bei einer Standardabweichung von 1,11. Der mittels qRT-PCR ermittelte Fold Change (N/T) der Mittelwerte beträgt demnach 1,93. Der Median für Normalgewebe beträgt 1,43, für Tumorgewebe 0,51. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe war 0, der größte (Max) 4,99. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 0,01, der größte ermittelte Wert (Max) bei 4,78. Hinsichtlich der Genexpression des Zielgens ST3GAL4 für die untersuchten Patientenproben konnte anhand der klinischen Parameter ein zwischen Tumorlokalisation und erhöhter Zusammenhang Genexpression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe festgestellt werden. Bei allen Patienten, bei denen ST3GAL4 im Tumorgewebe stärker exprimiert ist als im Normalgewebe, findet sich der Primärtumor im Bereich des rechten Hemikolons (vom Zökums bis zur rechten Flexur) (Tabelle 3, Kapitel 2.1). Lediglich Patient 13, dessen Primärtumor ebenfalls im rechten Hemikolon (Zökum) lokalisiert ist, zeigt für ST3GAL4 eine verringerte Genexpression im Tumorgewebe gegenüber des Normalgewebes. Bei allen weiteren Patienten, bei denen ST3GAL4 im Tumorgewebe schwächer exprimiert wird als im Normalgewebe, liegt der Primärtumor aboral der rechen Flexur (vom Kolon transversum bis zum Kolon sigmoideum).

3.1.5 Deskriptive Analyse des Target Gens FUT3

Für das Target-Gen FUT3 konnte eine heterogene Genexpression zwischen Normalund Tumorgewebe bei den untersuchten 17 Patienten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14). Bei 5 Patienten (8,10,11,14 und 15) (29,4%) konnte eine abgeschwächte Genexpression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden, wohingegen bei den anderen 12 Patienten (70,6%) die Expression von FUT3 im Tumorgewebe gesteigert war.



Abbildung 14: Relative Expressionswerte des Target Gens FUT3 im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Der Mittelwert aller im Normalgewebe gemessenen Expressionswerte beträgt 0,11 bei einer Standardabweichung von 0,04. Der Mittelwert der im Tumorgewebe gemessenen Expressionswerte beträgt 0,17 bei einer Standardabweichung von 0,14. Der mittels qRT-PCR ermittelte Fold Change (N/T) der Mittelwerte beträgt demnach 0,64. Der Median aller Werte für das Normalgewebe liegt bei 0,11, welcher erwartunsgemäß wegen der sehr niedrigen Standardabweichung dem Mittelwert entspricht. Der Median aller im Tumorgewebe gemessenen Werte ist 0,13. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe war 0,05, der größte (Max) 0,16. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 0, der größte ermittelte Wert (Max) bei 0,16.

Anhand der klinischen Parameter konnte für FUT3 kein Zusammenhang zwischen Tumorlokalisation, Entstehung von Tumorrezidiven, dem Alter der Patienten, dem Grad oder dem Tumorstadium gegenüber der gegenläufigen Genexpression festgestellt werden.

3.1.6 Deskriptive Analyse des Target Gens UGT2B17

Bei allen untersuchten Patienten (100%) konnte eine Verringerung der Genexpressivität für UGT2B17 mittels qRT-PCR im Tumorgewebe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 15).



Abbildung 15: Relative Expressionswerte des Target Gens UGT2B17 im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Das arithmetische Mittel aller nicht kritisch beurteilten Expressionswerte im Normalgewebe beträgt 68,87 bei einer Standardabweichung von 50,03. Das arithmetische Mittel ebenfalls aller nicht kritisch beurteilten Expressionswerte im Tumorgewebe beträgt 2,7 bei einer Standardabweichung von 2,91. Der mittels qRT-PCR ermittelte Fold Change (N/T) der Mittelwerte beträgt demnach 25,51. Der Median für die Werte des Normalgewebes beträgt 76,59, für die Werte im Tumorgewebe 1,74. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe war 0,02, der größte (Max) 151,68. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 0,01, der größte ermittelte Wert (Max) bei 10,13. Aufgrund des einheitlichen Expressionsverlustes im Tumorgewebe bei allen untersuchten Patienten ist davon auszugehen, dass UGT2B17 im Zusammenhang mit der Pathogenese des Kolonkarzinoms steht.

3.1.7 Deskriptive Analyse des Target Gens HS6ST2

Bei der Auswertung der für HS6ST2 ermittelten Expressionswerte fällt auf, dass die Genexpression bei 14 Patienten (82,4%) im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe erhöht ist (siehe Abbildung 16). Bei 3 Patienten (1,2 und 17; entspricht 17,6%) verringert sich die Genexpression im Tumorgewebe.



Abbildung 16: Relative Expressionswerte des Target Gens HS6ST2 im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Das arithmetische Mittel aller Werte für das Normalgewebe beträgt 0,07 bei einer Standardabweichung von 0,04 und einem Median von 0,07. Das arithmetische Mittel aller für das Tumorgewebe ermittelten Werte ist 0,39 bei einer Standardabweichung von 0,38 und einem Median von 0,2. Der mittels qRT-PCR ermittelte Fold Change (N/T) der Mittelwerte beträgt demnach 0,18. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe war 0,02, der größte (Max) 0,20. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 0,05, der größte ermittelte Wert (Max) bei 1,17. Nach der Betrachtung der klinischen Parameter der einzelnen Patienten konnten keine signifikanten Zusammenhänge hinsichtlich der ermittelten Genexpressionswerte festgestellt werden.

3.1.8 Zusammenfassung der Analyseergebnisse

Bei der Analyse der Genexpressionswerte für die einzelnen Ziel-Gene konnte ein Gen (NANP) identifiziert werden, bei welchem eine annähernd homogen gesteigerte Genexpression im Tumorgewebe bei allen Patienten nachgewiesen werden konnte. Bei einem Fold Change (N / T) der Mittelwerte von 0,29 wird dieses Gen im Tumorgewebe um das 3,4-fache stärker exprimiert als im Normalgewebe. Bei einem anderen Gen (UGT2B17) konnte für alle Patienten hingegen eine Expressionverringerung im Tumorgewebe gegenüber den Werten des Normalgewebes gezeigt werden. Diese lag im Mittel 25,5-fach tiefer als im Normalgewebe und deutet darauf hin, dass das Gen und damit auch dessen Protein im Tumorgewebe annähernd verschwindet. Für ST6GALNAC1 konnte bis auf einen "Ausreißer" (Patient 10) ebenfalls bei allen Patienten eine Expressionsverringerung im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Gemittelt war diese im Tumorgewebe 2,9-fach schwächer. Hypothetisch ist davon auszugehen, dass diese 3 Gene stark im Zusammenhang mit der Pathogenese des KRK stehen und somit interindividuelle Variabilitäten in ihrer Wirksamkeit nicht hervortreten. Alle weiteren untersuchten Gene zeigen aufgrund von interindividueller Variabilität ein heterogenes Genexpressionsmuster. Hier wurde bei nur einem Gen (ST3GAL4) anhand der klinischen Parameter der Verdacht auf Zusammenhang von heterogener Genexpression und Tumorlokalisation geäußert. Annähernd alle Patienten (7/8), bei welchen der Primärtumor an oder proximal der rechten Kolonflexur lokalisiert war, zeigten erhöhte Genexpressionswerte für ST3GAL4 im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe, wohingegen alle Patienten (9/9) bei denen der Tumor distal der rechten Kolonflexur entfernt wurde eine Genexpressionsverringerung von ST3GAL4 im Tumorgewebe aufwiesen.

3.2 Deskriptive Analyse der vorliegenden MA- Ergebnisse für die zu untersuchenden Gene

Dieses Kapitel beschreibt anhand der Rohdaten des MA das Expressionsverhalten der sieben Gene, die mittels qRT-PCR nachuntersucht wurden.

3.2.1 Deskriptive Analyse des Target Gens GNE

Für das Target-Gen GNE zeigten die vorliegenden MA-Daten für die beiden untersuchten Nukleotidsequenzen (Normal- und Tumorgewebe) eine heterogene Tendenz der Genregulation. Bei 2 Patienten (4 und 7; entspricht 11,8%) konnte im Tumorgewebe eine gesteigerte Genexpression nachgewiesen werden, wohingegen sich bei den übrigen 15 Patienten (89,2%) die Genexpression im Tumorgewebe als erniedrigt darstellte (siehe Abbildung 17)



Abbildung 17: Relative Expressionswerte des Target Gens GNE im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Das arithmetische Mittel aller Werte des Normalgewebes beträgt 9,03 bei einer Standardabweichung von 0,54. Das arithmetische Mittel für die Messwerte des Tumorgewebes beträgt 7,36 bei einer Standardabweichung von 1,08. Gemittelt entspricht dies einer leichten Genexpressionsverminderung im Tumorgewebe. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe war 8,05, der größte (Max) 9,82. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 5,68, der größte ermittelte Wert (Max) bei 9,37. Der Median für die Messwerte des Normalgewebes konnte mit 9,04 ermittelt werden bei einer Standartabweichung von 0,54. Der Median für die Messwerte des Tumorgewebes war 7,41, bei einer Standartabweichung von 1,08. Hinsichtlich der Heterogenität bei der Genexpression einzelner Patientenstichproben für das Zielgen GNE konnte jedoch kein offensichtlicher Zusammenhang zu Tumorlokalisation, Entstehung von Rezidiven, Alter des Patienten oder dem Grad bzw. Stadium der Erkrankung festgestellt werden (siehe Tabelle 3, Kapitel 2.1).

3.2.2 Deskriptive Analyse des Target Gens NANP

Bei fast allen 17 Patienten (ausgenommen Patient 15) zeigte sich auf mRNA Ebene eine gesteigerte Expression des Gens NANP im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe (siehe Abbildung 18).



Abbildung 18: Relative Expressionswerte des Target Gens NANP im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Das arithmetische Mittel aller Werte des Normalgewebes beträgt 6,33 bei einer Standardabweichung von 0,26. Das arithmetische Mittel für das Tumorgewebe beträgt 7,95 bei einer Standardabweichung von 0,67. Der Median aller Werte im Normalgewebe beträgt 6,35 und im Tumorgewebe 7,86. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe war 5,79, der größte (Max) 6,70. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 6,21, der größte ermittelte Wert (Max) bei 9,06.

3.2.3 Deskriptive Analyse des Target Gens ST6GALNAC1

Bei allen Patienten (100%) lässt sich im Normalgewebe eine signifikant höhere Genexpression im Vergleich zum Tumorgewebe nachweisen (siehe Abbildung 19).



Abbildung 19: Relative Expressionswerte des Target Gens ST6GALNAC1 im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Der Mittelwert der relativen Genexpressionswerte im Normalgewebe beträgt 11,17 bei einer Standardabweichung von 0,41. Der für die Messwerte des Tumorgewebes bestimmte Mittelwert liegt bei 8,17 bei einer Standardabweichung von 1,61. Der Median beim Normalgewebe liegt bei 11,04, beim Tumorgewebe bei 7,76. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe betrug 10,52, der größte (Max) 11,85. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 5,56, der größte ermittelte Wert (Max) bei 10,47.

3.2.4 Deskriptive Analyse des Target Gens ST3GAL4

Auch für das Gen ST3GAL4 lässt sich für die beiden untersuchten Nukleotidsequenzen eine heterogene Tendenz der Genexpression feststellen (siehe Abbildung 20). Bei 4 Patienten (1,3,7 und 8) (23,5%) zeigte sich im Tumorgewebe eine gesteigerte Genexpression, wohingegen bei den übrigen 13 Patienten (76,5%) eine verringerte Genexpression im Tumorgewebe festzustellen ist.



Abbildung 20: Relative Expressionswerte des Target Gens ST3GAL4 im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Das arithmetische Mittel der Genexpressionswerte für das Normalgewebe beträgt 6,18 bei einer Standardabweichung von 1,18. Das für das Tumorgewebe bestimmte arithmetische Mittel der Genexpression beträgt 5,11 bei einer Standardabweichung von 0,36. Der Median für die Werte des Normalgewebes beträgt 6,15, für das Tumorgewebe 5,08. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe war 4,62, der größte (Max) 7,89. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 4,53, der größte ermittelte Wert (Max) bei 6,08. Hinsichtlich der Heterogenität der Genexpression einzelner Patientenstichproben für das Zielgen ST3GAL4 konnte jedoch kein offensichtlicher Zusammenhang zu Tumorlokalisation, Entstehung von Rezidiven, Alter des Patienten, dem Grad oder Stadium der Erkrankung festgestellt werden (siehe Tabelle 3, Kapitel 2.1).

3.2.5 Deskriptive Analyse des Target Gens FUT3

Bei allen Patienten (100%) lässt sich im Normalgewebe eine gesteigerte Genexpression verglichen zum Tumorgewebe nachweisen (siehe Abbildung 21).



Abbildung 21: Relative Expressionswerte des Target Gens FUT3 im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Der Mittelwert aller im Normalgewebe gemessenen Expressionswerte beträgt 8,91 bei einer Standardabweichung von 0,34. Der Mittelwert der im Tumorgewebe gemessenen Expressionswerte beträgt 7,96 bei einer Standardabweichung von 0,99. Der Median aller Werte für das Normalgewebe liegt bei 9,06. Der Median aller im Tumorgewebe gemessenen Werte ist 8,13. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe war 8,28, der größte (Max) 9,36. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 5,28, der größte ermittelte Wert (Max) bei 8,9.

3.2.6 Deskriptive Analyse des Target Gens UGT2B17

Die Daten der MA-Untersuchung zeigen bei allen untersuchten Patienten (100%) eine Verringerung der Genexpressivität für UGT2B17 im Tumorgewebe (siehe Abbildung 22).



Abbildung 22: Relative Expressionswerte des Target Gens UGT2B17 im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Das arithmetische Mittel aller Expressionswerte im Normalgewebe beträgt 11,34 bei einer Standardabweichung von 3,04. Das arithmetische Mittel aller Expressionswerte im Tumorgewebe beträgt 6,33 bei einer Standardabweichung von 1,97. Der Median für die Werte des Normalgewebes beträgt 12,41, für die Werte im Tumorgewebe 6,52. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe betrug 3,29, der größte (Max) 13,17. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 3,22, der größte ermittelte Wert (Max) bei 9,36.

3.2.7 Deskriptive Analyse des Target Gens HS6ST2

Bei der Auswertung der für HS6ST2 vorliegenden Expressionswerte fällt auf, dass die Genexpression bei 12 Patienten (70,6%) im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe erhöht ist (siehe Abbildung 23). Bei 5 Patienten (2,6,10,16 und 17; entspricht 29,4%) ist die Genexpression im Tumorgewebe hingegen schwächer ausgeprägt.



Abbildung 23: Relative Expressionswerte des Target Gens HS6ST2 im Normal- und Tumorgewebe des Kolonkarzinoms

Das arithmetische Mittel aller Werte für das Normalgewebe beträgt 4,57 bei einer Standardabweichung von 0,54. Der Median ist 4,68. Das arithmetische Mittel aller für das Tumorgewebe ermittelten Werte ist 6,46 bei einer Standardabweichung von 2,13. Der Median ist 5,25. Der kleinste gemessene Wert (Min) im Normalgewebe war 3,74, der größte (Max) 5,5. Im Tumorgewebe lag der kleinste gemessene Wert (Min) bei 4,05, der größte ermittelte Wert (Max) bei 9,49. Nach der Betrachtung der klinischen Parameter der einzelnen Patienten konnten keine offensichtlichen Zusammenhänge hinsichtlich der ermittelten Genexpressionswerte für HS6ST2 festgestellt werden.

3.2.8 Zusammenfassung der Analyseergebnisse

Anhand der durch die MA-Analyse erhobenen Daten konnten mehrere Gene ermittelt werden, bei denen bei allen untersuchten Patienten die Expression des Gens im Tumorgewebe schwächer ausgeprägt war, verglichen zur gesunden Kolonmukosa. Der deutlichste Expressionsverlust war dabei bei UGT2B17 (siehe 3.2.6) zu verzeichnen. Ein Expressionsverlust bei allen Patienten konnte ebenfalls für die Gene ST6GALNAC1 und FUT3 gezeigt werden. Beim Target-Gen NANP konnte bei fast allen Patienten eine Expressionszunahme im Tumorgewebe gezeigt werden.

3.3 Vergleichende Betrachtung der ermittelten Fold Changes beider Methoden

In diesem Kapitel werden die aus den Mittelwerten berechneten Fold Changes (N/T) beider Methoden miteinander verglichen. Dabei wurden die Fold Changes der MA-Methode verwendet, welche das Interesse an dieser Arbeit geweckt haben (siehe 1.4). Dabei muss erwähnt werden, dass die MA-Daten an einem Patientengut von n=70 erhoben wurden. Die mittels qRT-PCR ermittelten Daten stammen jedoch nur von n=17 Patienten und sind somit als Stichprobe aus der angenommenen Grundgesamtheit von n=70 zu betrachten.

Fold Change (N/T)					
Target	MA	qRT-PCR			
GNE	2,72	1,5			
NANP	0,36	0,29			
ST6GALNAC1	5,95	2,89			
ST3GAL4	2,39	1,93			
FUT3	1,96	0,64			
UGT2B17	30,47	25,51			
HS6ST2	0,21	0,18			

Гаb. 6:	Vergleichende Betrachtung der mittels qRT-PCR ermittelten Fold Changes (N/T) für die
	untersuchten Gene mit den vorliegenden Fold Changes (N/T) der MA-Analyse.

Wie Tabelle 6 zu entnehmen ist, gibt es für 6 der 7 untersuchten Gene eine homogene Tendenz im Expressionsverhältnis zwischen Normal- und Tumorgewebe. Lediglich bei FUT3 konnte die Tendenz der MA-Daten mittels qRT-PCR nicht bestätigt werden. Bei diesem Gen ergaben die vorliegenden MA-Daten einen im Mittel 1,96-fachen Expressionsverlust im Tumorgewebe, wohingegen die erhobenen qRT-PCR Daten gemittelt eine Expressionszunahme von FUT3 im Tumorgewebe zeigen.

3.4 Untersuchung der Kongruenz beider Analyseverfahren

3.4.1 Ermittlung der Art des Zusammenhanges zwischen den erhobenen qRT-PCR- Ergebnissen und den vorliegenden MA- Ergebnissen

Es wurde versucht einen funktionalen Zusammenhang beider Messreihen mit Hilfe von Regressionsverfahren zu finden. Dabei konnte festgestellt werden, dass eher ein logarithmischer als linearer Zusammenhang besteht (siehe Beispiel Abb. 24), wobei jedoch das Bestimmtheitsmaß (R²) je nach Gewebeart und Gen stark variieren. Mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,97 wurde beim Gen UGT2B17 für die Messreihen des Normalgewebes die beste und für das Gen NANP mit 0,006 für die Messreihen des Normalgewebes die schlechteste Approximation erzielt.



Art des Zusammenhanges zwischen MA und gRT PCR

Abbildung 24: Art des Zusammenhanges der Messwerte von MA und qRT-PCR am Beispiel UGT2B17 (Normalgewebe). Die logarithmische Funktion (grüne Kurve) mit dem Bestimmtheitsmaß (R²) von 0,97 verdeutlicht, dass eher ein logarithmischer Zusammenhang für die Messreihen beider Messverfahren besteht als ein linearer.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es keinen eindeutigen mathematisch funktionellen Zusammenhang zur quantitativen Beschreibung zwischen den Expressionsdaten beider Genanalyseverfahren gibt, der unabhängig von der Gewebeart bzw. des gewählten Gens ist. Qualitativ ist jedoch bei allen Vergleichen eine Gleichläufigkeit zu verzeichnen (positiver Anstieg)!

Des weiteren konnte bei einzelnen Genen festgestellt werden, dass im Streudiagramm eine gewisse Inhomogenität in Form von Punktwolken zu verzeichnen war (siehe
folgendes Beispiel). Deshalb sollte kritisch hinterfragt werden, ob es diesbezüglich einen medizinisch klinischen Hintergrund gibt und ob die einzelnen Gruppen (Punktwolken) nicht separat auf die Art ihres Zusammenhanges hin zu untersuchen wären.

Zum medizinisch klinischen Hintergrund beim Gen ST3GAL4 konnte beispielsweise festgestellt werden, dass bei allen Patienten die zur Punktwolke 1 (blau) gehören, die Gewebeentnahme im Bereich zwischen Zökum und rechter Kolonflexur durchgeführt wurde. Hingegen wurde die Gewebeentnahme bei allen Patienten, die zur Punktwolke 2 (rot) gehören, mehrheitlich distal der rechten Kolonflexur durchgeführt (Abb.:25). Weitere Parameter wie Grad, Tumorstadium, Alter des Patienten oder die Entstehung eines Rezidives konnten nicht eindeutig einer der beiden Punktwolken zugeordnet werden.



Abbildung 25: Genexpression von ST3GAL4 in gesunder Kolonmukosa bezogen auf die Lokalisation im Dickdarm. Punktwolke 1 beschreibt die im proximalen Kolon durch beide Methoden nachgewiesene deutlich schwächere Expression von ST3GAL4, Punktwolke 2 hingegen die im distalen Kolon verstärkte Expression.

3.4.2 Ermittlung des Grades des Zusammenhanges zwischen den einzelnen Messreihen der erhobenen qRT-PCR- Daten mit den vorliegenden MA-Daten

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die vorliegenden MA-Daten mittels qRT-PCR zu überprüfen, um anschließend eine Aussage über die Validität der vorliegenden Daten treffen zu können. Dazu wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (Version 18.0) eine Korrelationsanalyse beider Datensätze nach Spearman-Rho durchgeführt und der Grad des Zusammenhanges ermittelt. Spearman-Rho wurde gewählt, da dieses Verfahren, anderes als die häufig gebräuchliche Korrelation nach Pearson, nicht von einer linearen Beziehung zwischen zwei Variablen ausgeht und robuster gegenüber Ausreißern ist. Jeder Datensatz enthielt 17 (n) Genexpressionswerte, ausgenommen der für das Zielgen ST6GALNAC1, welcher nur 14 Genexpressionswerte umfasste.

3.4.2.1 Korrelation der Messreihen beider Methoden für das Target Gen GNE

Für die Expressionswerte des Zielgens GNE im Normalgewebe konnte ein Korrelationskoeffizient (r) von 0,64 (p=0,006) ermittelt werden, was einer signifikanten Korrelation auf dem 1% Niveau entspricht. Für die Werte des Tumorgewebes konnte eine hochsignifikante Korrelation von r=0,73 (p=0,001) ermittelt werden.

3.4.2.2 Korrelation der Messreihen beider Methoden für das Target Gen NANP

Der für das Normalgewebe von NANP ermittelte Korrelationskoeffizient (r) beträgt -0,27 (p=0,92), sodass kein Zusammenhang der Werte des Microarrays mit den Expressionswerten der qRT-PCR gezeigt werden konnte. Für die Messreihen im Tumorgewebe konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,58 (p=0,015) bestimmt werden, was einer signifikanten Korrelation auf dem 5% Niveau entspricht.

3.4.2.3 Korrelation der Messreihen beider Methoden für das Target Gen ST6GALNAC1

Der Korrelationskoeffizient beider Messreihen für ST6GALNAC1 im Normalgewebe beträgt 0,63 (p=0,011) und ist auf dem 5% Niveau signifikant. Für die Messreihen im Tumorgewebe konnte eine hochsignifikante Korrelation von r=0,95 (p<0,0001) ermittelt werden.

3.4.2.4 Korrelation der Messreihen beider Methoden für das Target Gen ST3GAL4

Eine hochsignifikante Korrelation von r=0,82 (p<0,0001) konnte für die Genexpressionswerte beider Messreihen von ST3GAL4 im Normalgewebe bestimmt werden. Für die Messreihen des Tumorgewebes zeigte sich ebenso eine signifikante Korrelation von r=0,66 (p=0,004).

3.4.2.5 Korrelation der Messreihen beider Methoden für das Target Gen FUT3

Der Korrelationskoeffizient für FUT3 im Normalgewebe beträgt 0,51 (p=0,037) und ist somit auf dem 5% Niveau signifikant. Für das Tumorgewebe beträgt der Korrelationskoeffizient 0,61 (p=0,01), sodass die Korrelation auf dem 1% Niveau hochsignifikant ist.

3.4.2.6 Korrelation der Messreihen beider Methoden für das Target Gen UGT2B17

Für die Messreihen des Zielgens UGT2B17 konnte sowohl für das Normal- als auch für das Tumorgewebe eine hochsignifikante Korrelation beider Methoden ermittelt werden. Der Korrelationskoeffizient für die Normalgewebewerte beträgt 0,81 (p<0,0001). Der für die Werte des Tumorgewebes ermittelte Korrelationskoeffizient beträgt 0,95 (p<0,0001).

3.4.2.7 Korrelation der Messreihen beider Methoden für das Target Gen HS6ST2

Für die Genexpressionswerte des Zielgens HS6ST2 im Normalgewebe konnte ein Korrelationskoeffizient (r) von 0,46 (p=0,062) ermittelt werden, sodass kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden konnte. Für das Tumorgewebe hingegen konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,86 (p<0,0001) gezeigt werden, sodass eine hochsignifikante Korrelation beider Messreihen besteht.

3.4.2.8 Zusammenfassung zur Ermittlung des Grades des Zusammenhanges beider Messreihen

Durch die Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho konnte bei 12 der 14 Messreihen eine signifikante Korrelation der Genexpressionswerte zwischen beiden Methoden auf dem 5% Niveau nachgewiesen werden. Für 2 Messreihen (NANP und HS6ST2 im Normalgewebe) konnte jedoch keine Korrelation festgestellt werden. Aufgrund der zu kleinen Stichprobenzahl (n=17) kann man trotz der häufig bestimmten hohen Korrelationskoeffizienten nicht von einer hochsignifikanten Korrelation zwischen beiden Messverfahren sprechen. Zu beachten ist, dass der aus Stichproben geschätzte Korrelationskoeffizient immer mit einem Zufallshöchstwert verglichen und beurteilt werden muss. Bei einer Stichprobenzahl von n=17 beträgt dieser 0,4821. Das bedeutet, dass ein Korrelationskoeffizient, dessen Wert betragsgemäß kleiner als 0,4821 ist, nicht signifikant von 0 zu unterscheiden ist. Größere Werte deuten auf eine lineare Korrelation hin, die aber nur mäßig ausgeprägt sein kann.

Tab. 7: Darstellung der Korrelationskoeffizienten (r), sowie des Signifikanzniveaus (p-Wert) der Messwerte beider Methoden für die untersuchten Gene. Eine statistische Signifikamz wird bei einem p<0,05 angenommen.

Korrelation der qRT-PCR-Ergebnisse mit den Microarraydaten				
Target-Gen	r für Normalgewebewerte	<u>p-Wert</u>	<u>r für Tumorgewebewerte</u>	<u>p-Wert</u>
GNE	0,64	0,006	0,73	0,001
NANP	0,27	0,92	0,58	0,015
ST6GALNAC1	0,63	0,011	0,95	<0,0001
ST3GAL4	0,82	<0,0001	0,66	0,004
FUT3	0,51	0,037	0,61	0,01
UGT2B17	0,81	<0,0001	0,95	<0,0001
HS6ST2	0,46	0,062	0,86	<0,0001

3.4.3 Ermittlung des Grades des Zusammenhanges zwischen den Fold Changes (N/T) der Messreihen beider Messmethoden

Da unter Punkt 3.4.2 nicht alle Messreihen signifikante Korrelationen lieferten und bei einer Stichprobenzahl von n=17 immer von einer Zufallsverteilung der Messwerte ausgegangen werden muss, entschieden wir uns eine weitere Korrelationsanalyse durchzuführen. Dabei wurde der Fold Change (Quotient aus N/T) der einzelnen Messwerte beider Methoden für jedes Target-Gen ermittelt und diese anschließend gegeneinander ins Verhältnis gesetzt, um erneut den Grad des Zusammenhanges beider Methoden zu bestimmen. Die Korrelationsbestimmung wurde abermals nach Spearman-Rho durchgeführt. Dabei diente SPSS (Version 18.0) wiederum für die Verarbeitung der Daten und deren Analyse.

Tab. 8:Darstellung der Korrelationskoeffizienten (r), sowie des Signifikanzniveaus (p-Wert) aus den
Fold Changes beider Methoden für die jeweiligen Gene. Eine statistische Signifikanz wird
bei einem p<0,05 angenommen.</th>

Korrelation der Fold Changes (N/T) beider Messverfahren (MA/qRT-PCR)			
Target-Gen	<u>r</u>	<u>p-Wert</u>	
GNE	0,78	<0,0001	
NANP	0,28	0,28	
ST6GALNAC1	0,88	<0,0001	
ST3GAL4	0,90	<0,0001	
FUT3	0,79	<0,0001	
UGT2B17	0,94	<0,0001	
HS6ST2	0,80	<0,0001	

Mit der Korrelationsbestimmung nach Spearman-Rho konnte gezeigt werden, dass es zwischen den Fold Changes (N/T) der einzelnen Messwerte beider Methoden hochsignifikante Korrelationen für 6 der 7 untersuchten Gene gibt. Für die Messreihen von NANP (r=0,28) konnte hingegen keine signifikante Korrelation der Fold Changes für die beiden Methoden ermittelt werden.



Abbildung 26: Exemplarische Darstellung für den Grad des Zusammenhangs der Fold Changes (N/T) der einzelnen Messwerte beider Methoden für ST6GALNAC1. Das Bestimmtheitsmaß R² gibt den linearen Zusammenhang für die einzelnen Variablen an.

3.5 Ermittlung signifikanter Unterschiede der Genexpression zwischen Normalund Tumorgewebe

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede der Genexpression zwischen Normal- und Tumorgewebe für die untersuchten Gene wurde mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 18.0) der Wilcoxon-Test an den Messreihen beider Methoden durchgeführt. Der Unterschied ist auf dem 1% Niveau als signifikant zu betrachten.

3.5.1 Wilcoxon Test - GNE

Bei der Betrachtung der Genexpressionsdaten konnte für beide Methoden keine eindeutige Tendenz einer gesteigerten oder verminderten Genexpression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe gezeigt werden. Es wurde eine Heterogenität bei beiden Methoden festgestellt. Allerdings war diese bei den Messreihen der qRT-PCR etwas stärker ausgeprägt. So zeigten sich bei der qRT-PCR 5 Messungen (29,4%), bei denen GNE im Tumorgewebe stärker exprimiert war als im Normalgewebe (siehe Abbildung 10, Absatz 3.1.1). Bei allen weiteren Messungen war eine Heterogenität zu sehen. Bei der MA-Methode waren es nur 2 Messungen (Patient 4 und 7; entspricht 11,8%), welche im Tumorgewebe eine stärkere Expression von GNE im Vergleich zum gesunden Gewebe zeigten. Alle weiteren Messreihen waren gegenläufig. Mit dem Wilcoxon Test konnte gezeigt werden, dass die Messwerte für Normal- und Tumorgewebe, welche mit qRT-PCR erhoben wurden, sich aufgrund der zu starken Streuung nicht signifikant voneinander abheben (p=0,141). Für die Messwerte, welche mit der MA-Methode erhoben wurden, zeigte sich hingegen ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe (p<0,0001) in der Genexpressivität.



Abbildung 27: Boxplotdarstellungen der relativen Genexpression des Target Gens GNE im Normal- und Tumorgewebe beider Methoden

3.5.2 Wilcoxon Test - NANP

Bei der Betrachtung der Genexpressionswerte beider Methoden zeigte sich fast ausnahmslos für alle Patienten eine gesteigerte Genexpression im Tumorgewebe. Diese konnte mit Hilfe des Wilcoxon Testes für beide Methoden als hochsignifikant interpretiert werden. Für die qRT-PCR, als auch für die MA- Methode, wurde eine 2 seitige Signifikanz von p<0,0001 ermittelt.



Abbildung 28: Boxplotdarstellung der relativen Genexpression des Target Gens NANP im Normal- und Tumorgewebe beider Methoden

3.5.3 Wilcoxon Test - ST6GALNAC1

Für beide Methoden konnte für ST6GALNAC1 ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe gezeigt werden; für qRT-PCR (p=0,007) und für MA (p<0,0001). Die Messwerte beider Methoden zeigen fast ausnahmslos für alle untersuchten Patienten eine deutliche Expressionsverminderung des Gens im Tumorgewebe.



Abbildung 29: Boxplotdarstellung der relativen Genexpression des Target Gens ST6GALNAC1 im Normalund Tumorgewebe beider Methoden

3.5.4 Wilcoxon Test - ST3GAL4

Die für ST3GAL4 ermittelten Genexpressionswerte waren bei der qRT-PCR heterogen (Abbildung 13; Absatz 3.1.4). Bei 7 (41,2%) der 17 untersuchten Patienten konnte eine verstärkte Expression des Gens im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Alle weiteren untersuchten Patienten zeigten eine verringerte Genexpression. Bei der Auswertung der MA-Daten stellte sich ein ähnliches Bild dar. Im Tumorgewebe von 4 Patienten (23,5%) konnte eine gesteigerte Genexpression nachgewiesen werden. Trotz der Heterogenität in der Genexpression der untersuchten Patientengewebe konnte wegen der sehr geringen Streuung der Tumorwerte für die MA-Methode ein signifikanter Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe gezeigt werden (p=0,003). Für die qRT-PCR wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen (p=0,109).



Abbildung 30: Boxplotdarstellung der relativen Genexpression des Target Gens ST3GAL4 im Normal- und Tumorgewebe beider Methoden

3.5.5 Wilcoxon Test - FUT3

Bei der Betrachtung der Messreihen beider Methoden für FUT3 zeigt sich ein divergierendes Bild. Die mittels qRT-PCR erhobenen Messwerte zeigen bei der Genexpression eine Heterogenität, wobei die Mehrheit der Patienten eine gesteigerte Genexpression im Tumorgewebe aufweist (siehe Abbildung 14, Absatz 3.1.5). Analysiert man die mittels MA gemessenen Werte, zeigt sich bei allen Patienten eine Expressionsabnahme von FUT3 im Tumorgewebe. Bei der Durchführung des Wilcoxon Tests konnte für die Werte des MA ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Normalund Tumorgewebe gezeigt werden (p<0,0001). Bei den Messwerten der qRT-PCR besteht jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Normal-(p=0,069).



Abbildung 31: Boxplotdarstellung der relativen Genexpression des Target Gens FUT3 im Normal- und Tumorgewebe beider Methoden

3.5.6 Wilcoxon Test - UGT2B17

Für die Messreihen beider Methoden für das Zielgen UGT2B17 konnte für alle Patienten eine deutlich verminderte Genexpression im Tumorgewebe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 15 und 22; Absatz 3.1.6 und 3.2.6). Der Wilcoxon Test bestätigt für dieses Gen hochsignifikante Unterschiede beider Methoden zwischen Normal- und Tumorgewebe für beide Methoden (p<0,0001).



Abbildung 32: Boxplotdarstellung der relativen Genexpression des Target Gens UGT2B17 im Normal- und Tumorgewebe beider Methoden

3.5.7 Wilcoxon Test - HS6ST2

Bei der Analyse der Messreihen beider Methoden zeigt sich eine Heterogenität der Genexpression zwischen Normal- und Tumorgewebe. 3 Patienten (17,6%) haben bei qRT-PCR (siehe Abbildung 16, Absatz 3.1.7) und 5 Patienten (29,4%) bei MA eine verminderte Genexpression im Tumorgewebe. Bei allen weiteren Patienten wird HS6ST2 im Tumorgewebe verstärkt exprimiert. Für die HS6ST2-Expression beider Gewebe, konnte mittels der qRT-PCR ein signifikanter Unterschied (p=0,001) nachgewiesen werden. Ebenso weisen die Messreihen der MA-Methode einen signifikanten Unterschied (p=0,006) zwischen Normal- und Tumorgewebe auf.



Abbildung 33: Boxplotdarstellungen der relativen Genexpression für das Target HS6ST2 im Normal- und Tumorgewebe beider Methoden

3.5.8 Zusammenfassung – Genexpressionsunterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe

Für alle 7 untersuchten Gene konnte die Methode des Microarray signifikante Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe auf dem 5% Niveau nachweisen. Die qRT-PCR wies bei 4 (NANP, ST6GALNAC1, UGT2B17 und HS6ST2) der 7 untersuchten Gene einen signifikanten Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe auf dem 5% Niveau nach. Bei 3 Genen (GNE, ST3GAL4 und FUT3) konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Dies ist mit der unterschiedlichen Streuung einzelner Messwerte zu begründen, die bei der Methode der qRT-PCR deutlich stärker ausgeprägt war.

Wilcoxon Test - exakte Signifikanz (2-seitig)				
Target-Gen	<u>p (qRT-PCR)</u>	p (MA)		
GNE	0,141	<0,0001		
NANP	<0,0001	<0,0001		
ST6GALNAC1	0,007	<0,0001		
ST3GAL4	0,109	0,003		
FUT3	0,069	<0,0001		
UGT2B17	<0,0001	<0,0001		
HS6ST2	0,001	0,006		

Tab. 9: Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe für die jeweiligen Target Gene durch den Wilcoxon Test für die Messreihen beider Methoden. Eine statistische Sigifikanz wird bei einem p<0,05 angenommen.

3.6 Analyse der immunhistochemischen Färbungen

Sämtliche Präparate wurden unter dem Mikroskop begutachtet, ausgewertet und abfotografiert. Für die Auswertung wurden verschiedene Scores verwendet (siehe 2.3.3.4).

3.6.1 Immunhistochemische Auswertung – Primär-Antikörper ST6GALNAC1

Die Intensität der Proteinexpression von ST6GALNAC1 war auf allen Objektträgern im Normalgewebe deutlich stärker ausgeprägt verglichen mit dem Tumorgewebe (Abbildung 35). Die Proteinfärbung war weder im Zellkern, noch im Bereich der Zellmembran zu finden, sondern ausschließlich im Zytoplasma. Bei drei Präparaten (Patient 3, 10 und 16) konnte über die Intensität und Anzahl der gefärbten Zellen im Normalgewebe keine Aussage getroffen werden, da in den Gewebeschnitten ausschließlich Tumorgewebe zu finden war. Bei 7 Patienten (50%) war die Intensität der Färbung im Normalgewebe als mittelmäßig einzustufen, wohingegen bei 4 Patienten (28,6%) eine starke Färbung zu sehen war.

Bei 3 Patienten (21,4%) lag die Anzahl gefärbter Zellen im Normalgewebe bei 25%-49% (Score von 2), bei 5 Patienten (35,7%) zwischen 50-75% (Score von 3) und wiederum 3 Patienten zeigen >75% (Score von 4) gefärbter Zellen.

Eine sichtbare Färbung im Tumorgewebe konnte bei 200 facher Vergrößerung nicht bei jedem Patienten nachgewiesen werden. Bei drei Patienten wurde die Intensität daher mit 0 eingestuft und nur unter starker Vergrößerung (x400) in weniger als 5% der Zellen eine sehr schwache Färbung detektiert werden. Bei 9 Patienten (64,3%) war die

Färbung von ST6GALNAC1 nur schwach ausgeprägt. Lediglich jeweils ein Patient hatte eine mittlere und eine starke Färbung für ST6GALNAC1 im Tumorgewebe.

Die Anzahl gefärbter Tumorzellen war bei 9 Patienten <25% (Score von 1), bei 3 Patienten zwischen 25-49% (Score von 2), und jeweils bei einem Patienten um die 60% (Score von 3) und >75% (Score von 4).

Patient	Färbeintensität Tumorgewebe	Anzahl gefärbter Tumorzellen	Färbeintensität Normalgewebe	Anzahl gefärbter Zellen im Normalgewebe	Intensitätsvergleich Tumor gegen Normal
Positivkontrolle	3	4	2	2	stärker
Negativkontrolle	0	0	0	0	gleich
1	1	1	2	2	schwächer
2	1	1	2	2	schwächer
3	0	1	NB	NB	NB
4	1	1	2	3	schwächer
5	1	1	3	3	schwächer
6	1	2	2	3	schwächer
7	1	2	3	4	schwächer
8	0	1	2	2	schwächer
9	1	2	2	3	schwächer
10	0	1	NB	NB	NB
11	1	1	3	4	schwächer
12	2	3	3	4	schwächer
16	3	4	NB	NB	NB
17	1	1	2	3	schwächer

Tab. 10: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primär-Antikörper ST6GALNAC1. NB= nicht beurteilbar



Abbildung 34: Negativkontrolle, gesunde Kolonmukosa 100x vergrößert



Abbildung 35: Immunhistochemische Färbung mit ST6GALNAC1, 200x vergrößert, Normal-(unten/durchgezogener Pfeil) vs. Tumorgewebe (oben/gepunktelter Pfeil).



Abbildung 36: Immunhistochemische (zytoplasmatische/mit Pfeil gekennzeichnete) Färbung mit ST6GALNAC1, 400x vergrößert, Bsp.: Patient 11 Normalgewebe (rechts oben Tumor).



Abbildung 37: Immunhistochemischen (zytoplasmatische/Pfeil) Färbung mit ST6GALNAC1, 400x vergrößert, Tumorgewebe Patient 12

3.6.2 Immunhistochemische Auswertung – Primär-Antikörper NANP

Bei der Färbung der Gewebeschnitte mit dem Primär-Antikörper NANP konnte im Epithel gesunder Mucosazellen keinerlei Färbung detektiert werden (Abbildung 39). Bis auf wenige Ausnahmen (zwei Patienten/ Abbildung 40) waren auch alle Tumorzellen negativ. Eine starke Färbung hingegen konnte bei einigen Stromazellen gefunden werden. Mit Hilfe des Pathologen wurden diese als neuronale Ganglienzellen (Abbildung 41) identifiziert und waren hauptsächlich in der Submucosa des Kolons zu finden. Da eine solch spezifische Färbung für neuronale Ganglienzellen und Neurone für NANP bisher nicht bekannt war, wurden weitere Gewebe (Tonsille, Mamma, Leber und Großhirn) gefärbt, um die Spezifität für NANP für neuronale Strukturen auch in anderen Geweben nachzuweisen. In Nerven und Nervenzellkörpern der Tonsille konnte, ähnlich wie in der Submukosa des Kolon gezeigt, eine hochspezifische Färbung nachgewiesen werden. Für die übrigen Gewebe konnte eine solche Spezifität von NANP für neuronale Strukturen nicht gezeigt werden (Bilder nicht gezeigt).

Tab. 11: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit dem Primär-Antikörper NANP. NB = nicht beurteilbar

Patient	Färbeintensität Tumorgewebe	Färbeintensität Normalgewebe	Färbeintensität neuronaler Ganglienzellen
Positivkontrolle	0	0	3
Negativkontrolle	0	0	0
1	0	0	2
2	0	0	3
3	0	NB	2
4	0	0	2
5	0	0	2
6	1	0	2
7	0	0	2
8	0	0	2
9	0	0	2
10	0	NB	2
11	0	0	2
12	0	0	3
13	0	0	3
14	0	0	3
15	0	0	2
16	0	NB	2
17	1	0	2



Abbildung 38: Negativkontrolle, gesunde Kolonmukosa 100x vergrößert



Abbildung 39: immunhistochemische Färbung mit NANP, 200x vergrößert, Normal- (unten/durchgezogener Pfeil) vs. Tumorgewebe (oben/gepunktelter Pfeil).



Abbildung 40: immunhistochemische (zytoplasmatische) Färbung (Pfeile) mit NANP, 200x vergrößert, Tumorgewebe Patient 6



Abbildung 41: immunhistochemische Färbung mit NANP, 400x vergrößert, starke Rotfärbung neuronaler Ganglienzellen

4. Diskussion

4.1 Grundlage und Bedeutung der Untersuchungen

Die Aufgabe und Funktion von Glykoproteinen und Glykolipiden in humanen Zellen wird zu einem großen Teil durch die Art ihrer Glykosylierung moduliert und kontrolliert. Dabei sind viele biochemische Prozesse, wie die Faltung von Proteinen, ihre Stabilität und Lokalisation, Zell-Zell- und Zell-Matrix Interaktionen sowie Adhäsionsvorgänge von der Glykosylierung der jeweiligen Glykokonjugate abhängig ^{57,87,88}. Darüber hinaus wurde bei verschiedensten Erkrankungen (u.a. Malignomen) ein Zusammenhang zwischen deren Entstehung bzw. Progression und veränderter Glykosylierung der betroffenen Zellen diskutiert^{89,90}. Da Glykanketten auf ihren Trägermolekühlen eine solch wichtige Funktion einnehmen, liegt es nahe, dass Veränderungen der Glykanstruktur und zusammensetzung auch zu massiven Veränderungen des Trägermolekühls selbst und dessen Funktion führen, was letztendlich die Funktionseinheit Zelle aus dem "Gleichgewicht" bringen kann. Die Assoziation zwischen der Entstehung bzw. Progression von Krebs und veränderter Glykosylierung hat in den letzten Jahrzehnten zu einer Welle an Forschungsarbeiten geführt, die das Ziel verfolgten, aus diesen Veränderungen wertvolle Informationen für diagnostische und therapeutische Zwecke zu erlangen. Ein wesentlicher Zielpunkt dabei ist die Suche nach glykosylierten Biomarkern, die in der Frühdiagnostik Verwendung finden oder molekularen prognostisch starke Aussagekraft besitzen, um parallel zur histopathologischen Stadieneinteilung eingesetzt zu werden. Von immensem pharmazeutischen Interesse sind bisher unbekannte Moleküle, die in ihrer Funktion Einfluss auf Onkogene oder Tumorsuppressorgene besitzen, um als Angriffspunkt für neue Therapiekonzepte zu dienen.

Mittels Genexpressionsanalysen wird heutzutage versucht, Veränderungen zwischen gesundem und erkranktem Gewebe bereits auf RNA-Ebene zu detektieren, um durch die Analyse der Veränderungen ein Verständnis über den Pathomechanismus zu erlangen. Gelänge es, die Verschaltung und das Zusammenwirken aller Gene und deren Produkte innerhalb einer Zelle bzw. eines Zellverbandes zu verstehen, so wäre es mit hoher Wahrscheinlichkeit möglich, therapeutisch in diesen Schaltkreis einzugreifen. Eine Vielzahl an Verfahren steht zur Verfügung um Genexpressionsdaten zu erheben. Eines dieser Verfahren stellt die Microarray Technologie dar (siehe 1.4).

Ein wesentlicher Vorteil dieser Technologie gegenüber anderen Genexpressionsverfahren ist die Tatsache, dass mit dieser Methode viele Tausend Gene in nur einem Untersuchungslauf auf deren Expression untersucht werden können. Wie jede Methodik hat auch die Microarray Technologie ihre Schwächen (siehe 4.3), sodass die gewonnen Daten immer mit mindestens einer zweiten Methode validiert werden müssen, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu überprüfen. Ein wissenschaftlich häufig angewendetes Verfahren zur Validierung von Microarraydaten ist die quantitative real time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) ⁹¹⁻⁹⁴.

4.2 Einordnung der Ergebnisse in den derzeitigen Wissensstand

Die Messreihen der vorliegenden MA Daten und die mittels qRT-PCR ermittelten Genexpressionswerte korrelierten in überwiegender Mehrzahl auf dem 5% Niveau signifikant miteinander (siehe 3.4.2.8). Auch für die ermittelten Fold Changes (N/T) konnte für beide Methoden fast ausnahmslos eine hochsignifikante Korrelation gezeigt werden (siehe 3.4.3). Für vier der sieben untersuchten Gene konnte mit Hilfe des Wilcoxon Testes ein signifikanter Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe für beide Methoden ermittelt werden (siehe 3.5.8), sodass für zwei dieser vier Gene eine Proteinexpressionsanalyse mittels immunhistochemischer Färbungen durchgeführt wurde, um den nachgewiesenen Expressionsunterschied auf Proteinebene zu bestätigen (siehe 3.6).

4.2.1 GNE

bifunktionelles Enzym und gilt als das Schlüsselenzym GNE ist ein der Sialinsäurebiosynthese. Seine Epimerase- und Kinaseaktivität sorgen für eine irreversible Umwandlung von UDP-GlcNAc, dem Ausgangssubstrat für alle Sialinsäuren, zu ManNAc, um anschließend an der C-6-Position phosphoryliert zu werden ⁴⁶. Bei einer Anhäufung von CMP-Neu5Ac im Zytosol, dem aktivierten Nukleotidzucker der Sialinsäuren, wird GNE in seiner Epimeraseaktivität gehemmt, sodass keine weiteren Sialinsäuren synthetisiert werden ⁹⁵. Dieser Feed-Back-Mechanismus ist beim Krankheitsbild der Sialurie außer Kraft gesetzt, einer seltenen autosomal-dominant vererbten Stoffwechselkrankheit, bei der es zur Anhäufung von Sialinsäuren in den Geweben kommt und die durch die Ausscheidung großer Mengen freier Sialinsäuren über den Urin gekennzeichnet ist. Bei den Betroffenen führt dies zu Lebervergrößerung und Entwicklungsstörungen ⁹⁶. Ohne GNE hingegen sind Zellen nicht mehr in der Lage, Sialinsäuren zu bilden und zeigen erhebliche Defekte bei der Zell-Zell- und Zellmatrixinteraktion ^{46,97}. Das Ausschalten von GNE durch gezielte Mutagenese bei Mausembryonen führte nach spätestens 8,5 Tagen zum Absterben des Embryos und verdeutlicht die Rolle der Sialinsäuren während der Embryogenese⁹⁸. 2012 beschrieben Kemmner et al. dass das Ausschalten (Silencing) der Enzymaktivität von GNE in p16 aktivierten Pankreas Karzinomzellen zur Induktion von Anoikis führt. einer speziellen Form der Apoptose⁹⁹. Anoikis wird durch den Kontaktverlust der Zelle zu benachbarten Zellen oder der Matrix ausgelöst. Pankreaskarzinomzellen sind bekannt für ihren p16 Verlust, einem Tumorsuppressorgen, welches beim Übergang der G₁-Phase zur S-Phase des Zellzyklus, bei Schäden im Erbgut einen Zyklusarrest auslöst ^{99,100}. Weiterhin konnten Kemmner et al. belegen, dass p16 einen exzitativen Einfluss auf die Genexpression und Proteinexpression von GNE hat. Diese Erkenntnisse zeigen, dass GNE eine erhebliche Rolle innerhalb zellulärer Signalkreisläufe einnimmt, welche über Leben oder Tod der Zelle entscheiden. Zwischen 18-100% der in Studien untersuchten kolorektalen Karzinome weisen einen p16 Verlust durch Promoter Methylierung auf ^{101,102}. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen einem p16 Verlust beim kolorektalen Karzinom und klinisch prognostischen Parametern konnte allerdings bisher nicht gefunden werden.

Die für GNE ermittelten Expressionswerte dieser Studie zeigen aufgrund ihrer Heterogenität und starken Streuung keine signifikanten Unterschiede zwischen Normalund Tumorgewebe (p=0,141). Im Mittel ist jedoch ein Expressionsverlust von GNE im Tumorgewebe zu erkennen (Fold Change (N/T) von 1,5). Interessant wäre nun zu wissen, ob bei den untersuchten Tumoren, bei welchen ein Expressionsverlust von GNE zu verzeichnen war, ein p16 Verlust vorliegt. Sollte dies der Fall sein, könnte das erklären, weshalb sich zum einen die Genexpression von GNE verringert, zum anderen wäre es eine mögliche Erklärung dafür, weshalb die Tumorzellen nicht mehr in der Lage sind in den programmierten Zelltod überzugehen. Für all jene Patienten die eine gesteigerte Expression von GNE im Tumorgewebe hatten, ist dieser Lösungsansatz allerdings nicht zielführend. Die detaillierte Erforschung GNE abhängiger Signalwege wäre in naher Zukunft wünschenswert und könnte neue Zielstrukturen beinhalten, welche als Angriffspunkt für neue Medikamente zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms dienen könnten.

4.2.2 NANP

Bevor der aktivierte Nukleotidzucker (CMP-Neu5Ac) der Sialinsäuren gebildet werden kann, muss das Enzym NANP Neu5Ac-9-Phosphat zu Neu5Ac dephosphorylieren. Ob es sich bei NANP um eine spezifische Neu5Ac-9-Phosphat Phosphatase handelt oder ob diese Reaktion durch ein unspezifisches Enzym katalysiert wird, ist bis heute nicht geklärt ⁴⁶. Die von Van Rinsum 1984 durchgeführte Studie konnte zwar belegen, dass sich NANP von anderen Phosphatasen des Rattenleberzytosols unterscheidet, jedoch wurde das Enzym bis heute nicht aufgereinigt oder kloniert, sodass Untersuchungen zur Substratspezifität bis heute nicht existieren ⁷⁴. Wissenschaftliche Arbeiten zum Genexpressions- und Proteinexpressionsverhalten dieser Phosphatase zwischen Normal- und Tumorgewebe spezifischer Gewebe existieren bisher nicht. So sind diese Arbeit und die vorangegangene Microarrayanalyse die ersten Studien, welche sich mit dem Expressionsverhalten von NANP zwischen Normal- und Tumorgewebe beim Kolonkarzinom beschäftigen.

Trotz eher schlechter Korrelationen der Ergebnisse beider Studien (r(N)=0,27, p=0,92; r(T)=0,58, p=0,015; r(FC)=0,28, p=0,28) waren die Messewerte der Genexpression die für NANP für die beiden Gewebearten ermittelt wurden hochinteressant, da für beide Studien eine homogene annähernd 3-fache Expressionsteigerung (Fold Change (N/T) MA: 0,36 und Fold Change (N/T) qRT-PCR: 0,29) im Tumorgewebe ermittelt werden konnte (siehe 3.3). Mit Hilfe des Wilcoxon Testes konnten hochsignifikante Unterschiede der Genexpression zwischen Normal- und Tumorgewebe für beide Methoden ermittelt werden. Um zu klären, ob die Phosphatase NANP im Tumorepithel deutlich stärker nachweisbar ist als in gesunder Schleimhaut und ob es sich möglicherweise einen bisher unbekannten molekularen um Biomarker beim Kolonkarzinom handelt. wurde eine Proteinexpressionsanalyse mittels immunhistochemischer Färbung durchgeführt. Dieser Verdacht konnte leider nicht bestätigt werden, da es im Epithel der gefärbten Gewebe, bis auf wenige Ausnahmen im Tumorgewebe (2/17 schwache Färbung), zu keinem positiven Nachweis von NANP kam. Interessanterweise gab es in allen mit dem Primär-Antikörper NANP gefärbten Präparaten des Kolons eine hochspezifische Färbung neuronaler Ganglienzellen in der Submukosa. Um dem Verdacht nachzugehen, dass NANP möglicherweise ein hochspezifisches Protein in Neuronen und neuronalen Ganglien ist, wurden zusätzliche Präparate anderer Organe (Mamma, Tonsille, Leber und Großhirnrinde) auf die Expression von NANP untersucht. Ähnlich wie im Kolongewebe gezeigt, konnte in den Paraffinschnitten der Tonsille eine hochspezifische Färbung für NANP in Neuronen und neuronalen Ganglienzellen detektiert werden. In allen anderen Geweben konnte eine solche Spezifität für NANP für neuronale Strukturen nicht nachgewiesen werden.

Interessant ist die Tatsache, dass trotz des Genexpressionsverlustes von GNE im Tumorgewebe des Kolons und der daraus resultierenden verminderten Sialinsäurebiosynthese dieser Zellen, die Genexpression von NANP in jenen Zellen anzusteigen scheint. Wozu sollte die Zelle ein Enzym synthetisieren, wenn diesem kein Substrat zur Verfügung steht? Möglicherweise ist NANP nicht substratspezifisch für Neu5Ac-9-Phosphat und ist zusätzlich für die Dephosphorylierung bisher unbekannter Moleküle verantwortlich. Die Proteinexpressionsanalyse konnte den Nachweis erbringen, dass NANP nicht verstärkt in Tumorzellen des Kolonkarzinoms gebildet wird und somit auch kein potentieller Biomarker bei diesem Tumorleiden ist. Somit konnte der Verdacht, dass NANP neben Neu5Ac-9-Phosphat womöglich weitere Moleküle dephosphoryliert auch nicht untermauert werden. Weshalb das Gen NANP jedoch verstärkt in Tumorzellen des Kolonkarzinoms exprimiert wird, welche Einflussfaktoren seine Transkription regulierend beeinflussen, welche Moleküle es selbst regulierend beeinflusst und weshalb es nicht, wie zu erwarten war, vermehrt translatiert wird, ist bis heute unklar. Manche Autoren beschreiben, dass Veränderungen auf mRNA Ebene in weniger als 50% der Fälle mit Veränderungen auf Proteinebene korrelieren ¹⁰³. Der Grund dafür kann zum einen in der Ausführung bzw. Sensitivität der gewählten Methode liegen oder andererseits tatsächlich molekularbiologischen Ursprungs sein. Da NANP in allen angefärbten Paraffinschnitten in neuronalen Ganglienzellen detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Durchführung der Methode nicht die Ursache der Diskrepanz bei der Expression von NANP zwischen der mRNA- und Proteinebene ist. Möglicherweise ist der Verlust des Genproduktes mit dem Phänomen der RNA-Interferenz (auch RNA-Silencing) zu erklären, einem natürlich vorkommenden Mechanismus eukaryoter Zellen, bei dem es post-transkriptional zum gezielten Abschalten von Genen kommt. Dabei spielen micro-RNAs (miRNAs) eine entscheidende Rolle ¹⁰⁴. Diese binden mit unvollständiger Komplementarität an ihre Ziel-mRNA und hemmen damit deren Translation oder beschleunigen deren Abbau. Parallel mit der miRNA binden auch bestimmte Proteine (Ago, GW182) an die ZielmRNA und lösen eine beschleunigte Deadenylierung aus ¹⁰⁵. Durch die Deadenylierung des Poly-Adenosin(A)-Schwanzes am 3`Ende der mRNA, der als Schutzfaktor vor dem

Abbau durch RNAsen eine tragende Rolle spielt, kann die mRNA nun mit erhöhtem Tempo abgebaut werden.

Weshalb die Enzymaktivität von NANP in neuronalen Ganglienzellen und Nervenfasern mancher Gewebe sehr stark ausgeprägt zu sein scheint, ist ungewiss. Möglicherweise findet in diesen Zellen eine forcierte Sialinsäurebiosynthese statt. Polysialinsäuren (PSA) sind bekannt für ihren Einfluss bei der Wanderung neuronaler Vorläuferzellen bei der Entwicklung des Nervensystems während der Embryonalzeit. Dabei regulieren PSA die Ausdifferenzierung sowie die korrekte Innervierung der Zielorgane durch aussprossende Axone ¹⁰⁶. PSA findet man bei diesen Entwicklungsvorgängen auf dem neuronalen Zelladhäsionsmolkül (NCAM)¹⁰⁷. Seine Aufgabe liegt vor allem darin, durch adhäsive Vorgänge das neuronale Wachstum zu unterstützen. Bis zu 200 α 2,8verknüpfte Sialinsäuren finden sich in linearer Anordnung auf der Oberfläche dieses Zelladhäsionsmolküls, was eine forcierte Sialinsäurebiosynthese in den PSA-NCAM tragenden Zellen voraussetzt ¹⁰⁸. Postnatal verringert sich mit fortschreitender Entwicklung des Nervenssystems der PSA Gehalt NCAM tragender Zellen und beschränkt sich primär auf Bereiche mit kontinuierlicher Plastizität (z.B. Hypothalamus, Hippocampus und Thalamus)¹⁰⁶. Im Kontrast zum Zentralnervensystem sind PSA auf NCAM im peripheren Nervensystem nicht an der Myelinisierung der Gliazellen (Schwann Zellen) beteiligt, jedoch konnten Jungnickel et al. 2009 zeigen, dass die Expression von PSA-NCAM in der frühen Regenerationsphase nach der Verletzung peripherer Nervenzellen zu beschleunigter Heilung und Regeneration führt ¹⁰⁹. Damit ist anzunehmen, dass Polysialierung von NCAM an der Regeneration peripherer Nerven beteiligt ist. Weshalb es in peripheren neuronalen Ganglienzellen und Nervenfasern des Kolons und der Tonsillen zu einer vermehrten enzymatischen Expression von NANP kommt, ob in diesen Zellen eine starke Sialinsäurebiosynthese abläuft, und wenn ja, weshalb gerade in diesen Geweben, kann mit dieser Arbeit und anhand des derzeitigen Wissensstandes nicht geklärt werden. Möglicherweise tragen die mit NANP stark angefärbten Ganglienzellen und Neurone auf ihren Oberflächen PSA-NCAM, was eine starke intrazelluläre Sialinsäurebiosynthese erklären würde.

Trotz der Tatsache, dass das Protein NANP als prädiktiver oder prognostischer molekularer Biomarker bei Kolonkarzinomen keine Rolle zu spielen scheint, wäre es wünschenswert, die genauen Zusammenhänge der verstärkten Genexpression von NANP bei diesem Tumorleiden zu kennen. Möglicherweise ist die Transkriptionsrate von NANP, ähnlich wie für GNE gezeigt, ein regulierender Faktor gegenüber Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen oder spiegelt das Expressionsverhalten jener Gene wieder. Sollte sich diese Hypothese bestätigen, wäre NANP ein geeigneter Kandidat, um regulierend in den Zellzyklus einzugreifen, um dadurch das Verhalten dieser Tumorzellen zu beeinflussen.

4.2.3 ST6GALNAC1

Die durch die Sialyltransferase ST6GALNAC1 entstehende α 2,6-O-glykosidische Verbindung einer Sialinsäure zu einem N-Acetylgalaktosamin eines O-Glykans ist Merkmal für das Sialyl-Tn (sTn) Antigen. Für die Synthese dieses auf Muzinen zu findenden Antigen in humanen Zellen, ist ST6GALNAC1 zuständig^{110,111}. Während sTn in gesundem Gewebe nur vereinzelt nachgewiesen werden konnte, wird es auf der Oberfläche maligne entarteter Zellen häufig verstärkt exprimiert und steht als Marker für eine schlechte Prognose und das Versagen einer chemotherapeutischen Therapie 63,64,112,113. Mehrere Studien bestätigen eine verstärkte Expression von sTn bei kolorektalen Karzinomen unabhängig von klinischen Parametern^{64,114}. Da dieses O-Glykan oft auch in präneoplastischen Läsionen entdeckt wird, ist seine Rolle als molekularer Biomarker schon ausgiebig diskutiert wurden ¹¹⁴. Seine prognostische Aussagekraft als Serummarker vor operativen Eingriffen ist ebenfalls gut dokumentiert ^{76,115}. Dabei sind hohe präoperative Serumlevel (>45U/ml) häufig mit Fernmetastasen und einer schlechten Langzeitprognose verbunden. Der genaue biomolekulare Mechanismus, weshalb sTn in Tumorzellen häufig verstärkt exprimiert wird, ist bisher allerdings nicht bekannt. Ein naheliegender Erklärungsversuch wäre die Zunahme der Enzymaktivität von ST6GALNAC1 in humanen Tumorzellen. Vázquez-Martin et al. stellten in einer 2004 durchgeführten Studie fest, dass dieser Verdacht für das kolorektale Karzinom jedoch nicht zutreffend ist ¹¹⁶. Sie konnten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität von ST6GALNAC1 und der Expression von sTn feststellen. Zwischen Normal- und Tumorgewebe war kein signifikanter Aktivitätsunterschied von ST6GALNAC1 zu erkennen, jedoch zeigten 67% der Tumorpräparate einen positiven sTn Nachweis, wohingegen in nur 15% der ein gesunden Kolonschleimhautpärparate positiver sTn Nachweis gelang. Interessanterweise scheint die Aktivität von ST6GALNAC1 in präneoplastischem Kolongewebe anzusteigen und in Korrelation mit der dort ermittelten sTn-Expression (63% aller Gewebe) zu stehen ¹¹⁶. Auf bisher ungeklärte Weise fällt die Aktivität von ST6GALNAC1 im neoplastischen Gewebe wieder ab, die sTn-Expression bleibt aber

bestehen. Die Tatsache, dass sTn beim kolorektalen Karzinom verstärkt exprimiert wird und dass ST6GALNAC1 für dessen Synthese verantwortlich ist, ist ausgiebig dokumentiert ^{110,114,117}. Jedoch gibt es bisher keine Belege dafür, wie hoch die Genexpression von ST6GALNAC1 beim kolorektalen Karzinom ist und wie stark sich diese vom gesunden Kolongewebe unterscheidet.

Die dieser Arbeit vorliegenden MA-Daten hatten gemittelt einen fast 6-fachen Genexpressionsverlust (Fold Change (N/T) 5,95) von ST6GALNAC1 im Tumorgewebe ergeben. In dieser Höhe konnte dieses Ergebnis mittels gRT-PCR jedoch nicht bestätigt werden. Mit einem ermittelten Fold Change (N/T) von 2,89 war allerdings bewiesen, dass die Genexpression von ST6GALNAC1 in Kolonkarzinomen (Stadium UICC I und II) deutlich abnimmt. Zwischen den Fold Changes (N/T) der einzelnen Messwerte der Messreihen beider Methoden (siehe 3.4.3) konnte zudem ein hochsignifikanter Zusammenhang (r=0,88; Signifikanzniveau: p<0,0001) ermittelt werden, sodass zwei unabhängig voneinander durchgeführte Studien annährend zu dem selben Ergebnis kommen. Nachdem der Wilcoxon Test zwischen beiden Geweben für beide Methoden einen signifikanten Unterschied bestätigte (MA: p<0,0001; qRT-PCR: p=0,007), wurde eine Proteinexpressionsbestimmung mittels immunhistochemischer Färbungen durchgeführt. Die gefärbten Präparate spiegelten das auf mRNA-Ebene gezeigte Ergebnis wieder (siehe 3.6.1). So nahm sowohl die Intensität der Färbung als auch die Anzahl der gefärbten Zellen im Tumorgewebe ab. In Kombination belegen somit beide Arbeiten eine Genexpressions- und Proteinexpressionsabnahme von ST6GALNAC1 beim Kolonkarzinom (Stadium UICC I und II). Die genaue Ursache, weshalb in Kolonkarzinomen die Transkriptionsrate dieser spezifischen Sialyltransferase rückläufig ist, bleibt unklar, zumal damit, aufgrund der häufig dokumentierten sTn Ausbildung Kolorektaler Karzinome, nicht zu rechnen war. Möglicherweise gibt es wie für GNE gezeigt, andere Gene (wie p16) oder intrazelluläre Moleküle, die die Expression von ST6GALNAC1 regulierend beeinflussen, bis heute aber unbekannt sind. So könnte es durch die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens oder der Aktivierung eines Onkogens zu einer daran gekoppelten Inaktivierung von ST6GALNAC1 kommen, welche so in präneoplastischem Gewebe noch nicht gesehen werden kann. Denkbar wäre auch, dass ST6GALNAC2, dessen sTn-Synthaseaktivität in vitro bereits belegt wurde ¹¹⁰, womöglich nach der Inaktivierung von ST6GALNAC1 für die sTn-Expression beim Kolonkarzinom verantwortlich ist. Gut möglich wäre auch, dass sTn in präneoplastischem Gewebe synthetisiert wird, in welchem die ST6GALNAC1-Aktivität nachweislich hoch ist, in Folge jedoch beim Kolonkarzinom, trotz sinkender ST6GALNAC1-Aktivität, durch zunehmenden Sialidasemangel nicht mehr abgebaut wird und somit weiterhin exprimiert bleibt. Ein solcher Mangel wurde bereits bei Tumorzelllinien des kolorektalen Karzinoms im Mausmodel nachgewiesen, welche ein gesteigertes Metastasenpotential zeigen ¹¹⁸. Weitere Studien zur Klärung der molekulargenetischen und molekularbiologischen Zusammenhänge bezüglich des Expressionsverlustes von ST6GALNAC1 beim Kolonkarzinom wären wünschenswert. Einerseits um zu verstehen, weshalb trotz des Rückganges der Enzymaktivität das entstehende Antigen (sTn) bei diesen Tumoren deutlich ausgeprägt zu sein scheint, und andererseits, weil die Klärung der molekulargenetischen Zusammenhänge bei der Regulierung von ST6GALNAC1 zur Identifikation bisher unbekannter Moleküle führen kann, die von pharmakologischem Interesse sein könnten, um therapeutisch in die Expression von sTn einzugreifen, welches nachweislich negativen Einfluss auf die Langzeitprognose des Patienten zu haben scheint.

4.2.4 ST3GAL4 und FUT3

Metastasierung ist ein wesentliches Kennzeichen und Kriterium maligner Tumore. Die Ursache und die Entstehung von Metastasen ist bis heute nicht vollständig geklärt. Nach der Abkopplung vom Primärtumor gelangt die einzelne Tumorzelle über das Blutoder Lymphsystem in andere Organe, um sich dort anzusiedeln. Bevor die Tumorzelle das Blut- oder Lymphsystem verlässt, muss sie das kapilläre Endothel durchdringen. Dabei spielt die Zelladhäsion der Tumorzelle am Endothel eine essentielle Rolle. Diese wird über am Gefäßendothel exprimierte Selektine vermittelt, welche spezifisch fucosylierte und sialylierte Glykane binden, die sich auf Glykoproteinen und Glykolipiden der Tumorzelle befinden ⁷⁸. Welche wichtige Rolle E-Selektine auf aktiviertem Gefäßendothel bei der Metastasierung kolorektaler Karzinome spielen, ist ausführlich dokumentiert ¹¹⁹. Auch die Bildung von Tumoremboli, durch die Verklebung von mit Thrombozyten Tumorzellen, auf exprimierten P-Selektinen, wurde als begünstigender Faktor bei der Entstehung von Metastasen diskutiert ¹²⁰. Die fucosylierten und sialylierten Liganden für E- und P-Selektine sind vor allem Sialyl-Lewis^x und Sialyl-Lewis^a, antigene Strukturen des Lewis Blutgruppensystems ^{77,121}. Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass die Ausbildung dieser Antigene auf Tumorzellen die Langzeitprognose für die betroffenen Patienten verschlechtert und mit der Bildung von Metastasen vergesellschaftet ist ^{30,31,80,122}. An der Synthese dieser Lewis Blutgruppenantigene sind mehrere Enzyme beteiligt, u.a. ST3GAL4 und FUT3.

ST3GAL4 gehört zur Gruppe der Sialyltransferasen und verbindet Neu5Ac über eine α 2,3-glykosidische Bindung mit galaktosetragenden Glykokonjugaten. Diese Verbindung findet man u.a. beim Blutgruppenantigen Sialyl-Lewis^x, an dessen Synthese ST3GAL4 nachweislich beteiligt ist ^{123,124}.

FUT3 gehört zur Enzymgruppe der Fucosyltransferasen. Im menschlichen Genom sind bis heute 13 Gene bekannt, die für spezifische Fucosyltransferasen codieren ¹²⁵. Von allen bekannten Fucosyltransferasen sind sechs (FUT3, -4, -5, -6, -7 und -9) in der Lage, über α 1,3 glycosidische Bindungen das Antigen Sialyl-Lewis^x zu fucosylieren ⁷⁸. Des weitern ist FUT3 durch die Bildung α 1,4 glykosidischer Bindungen an der Fucosylierung von Sialyl- Lewis^a beteiligt, sowie an der Synthese der Blugruppenanigene Lewis a, b, x und y ¹²⁴⁻¹²⁶.

In dieser Arbeit gibt es Hinweise darauf, dass die Expression von ST3GAL4 abhängig von der Lokalisation im Dickdarm sein könnte. So hat es den Anschein, als sei ST3GAL4 in aboral gelegener, gesunder Kolonschleimhaut (vom Transversum bis zum Sigmoid) stärker exprimiert als in oraler Kolonschleimhaut (vom Zökum bis zur rechten Flexur). Interessanterweise verzeichnen fast alle Tumore, die aus der oralen Schleimhaut hervorgehen einen Genexpressionsanstieg von ST3GAL4 verglichen zur gesunden Schleimhaut, wohingegen jene, die distal der rechten Flexur entstanden sind, einen Genexpressionsverlust aufweisen. Da die MA-Daten ein ähnliches Ergebnis zeigen und sowohl zwischen den einzelnen Messreihen, als auch zwischen den Fold Changes (N/T) beider Messverfahren hochsignifikante Korrelationen ermittelt werden konnten (r(N)=0,82, p<0,0001; r(T)=0,66, p=0,004; r(FC)=0,90, p<0,0001), liegt der Verdacht nahe. dass es innerhalb des Kolonkonvolutes eine ungleiche Expressionsverteilung von ST3GAL4 gibt. Birkenkamp et al. konnten bereits 2005 selbiges Ergebnis bestätigen. Sie konnten damals beweisen, dass es zwischen gesundem Zökumgewebe und Gewebe des Sigmoids gravierende Unterschiede in der Genexpression einer Vielzahl von Genen gibt und ermittelten für ST3GAL4 (Synonym: SIAT4C) eine 5,4-fach stärkere Expression im Sigmoid ¹²⁷. Weshalb in proximalen Tumoren die Expression zunimmt, in distalen wiederum abzunehmen scheint, bleibt unklar. Einfluß auf die Expression von ST3GAL4 scheinen inflammatorische Zytokine wie TNF (Tumornekrosefaktor) zu haben. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der

von TNF Lungengewebe Bronchialkarzinomzelllinien Anstieg in und zur Genexpressionszunahme von ST3GAL4 führt und mit einem erheblichen Anstieg von Sialyl-Lewis^x-Antigen auf den untersuchten Zellen korreliert ^{123,128}. Selbiges belegt eine Mitte der 90er Jahre durchgeführte Studie aus Finnland für Zelllinien des kolorektalen Karzinoms¹²⁹. Jedoch sind die Aussagen zur Expression von ST3GAL4 beim Karzinom widersprüchlich. Manche kolorektalen Autoren beschreiben einen Expressionsverlust ¹³⁰, andere eine Expressionssteigerung ¹³¹ und wiederum andere erhalten in ihrer Studie heterogene Aussagen zum Expressionsverhalten von ST3GAL4 ¹³², ähnlich wie es in den eigenen zuvor präsentierten Ergebnissen zum Ausdruck kommt. Ausschlaggebend für das Expressionsverhalten dieser Sialyltransferase ist wahrscheinlich letztendlich die Subpopulation von Tumorzellen, in welchem sie untersucht wurde. Um den genauen Sachverhalt zu klären, in welchen Tumorzelllinien bzw. Subpopulationen ST3GAL4 für die Synthese von Sialyl-Lewis^x zuständig ist und mit welchen Molekühlen es in Wechselwirkung steht, bedarf es weiterer Studien. Diese wären wichtig, um neue potentielle therapeutische Angriffspunkte zu finden, die die Synthese von Sialyl-Lewis^x verhindern, welches nachweislich die Bildung von Metastasen begünstigt.

Die dieser Arbeit aus der MA-Studie vorliegenden Genexpressionswerte zu FUT3 zeigen einen Expressionsverlust bei allen untersuchten Patienten (Fold Change (N/T) 1,96). Dieses Ergebnis konnte trotz gut korrelierender Messwerte nicht bestätigt werden. So wurde gemittelt eher eine Expressionszunahme (Fold Change (N/T) 0,64) von FUT3 beim Kolonkarzinom festgestellt. Möglicherweise kam es beim Microarray zu unspezifischer und/oder Kreuzhybridisierung der DNA-Sonde, welche cDNA von FUT3 binden sollte, sodass die ermittelten Genexpressionsdaten fehlerhaft sind ¹⁰³. Andererseits könnten Verunreinigungen der cDNA Proben zu falschen Messwerten bei der Polymerasekettenreaktion geführt haben. Viele Adenokarzinomzelllinien zeigen vermehrt fucosylierte Glykokonjugate auf ihren Zelloberflächen und weisen eine erhöhte Fucosyltransferaseaktivität auf. Speziell Kolonkarzinomzelllinien, wie beispielsweise HT29, sind für eine gesteigerte Transkriptionsrate von FUT3 sowie dessen erhöhte Enzymaktivität bekannt. Nachweislich korreliert die Aktivitätszunahme von FUT3 in diesen Zellen mit der Ausbildung von Sialy-Lewis^x- und Sialyl-Lewis^a-Antigenen ^{126,133}. Andere Studien hingegen widerlegen einen Expressionsanstieg von FUT3 beim kolorektalen Karzinom, speziell bei hochgradigen Tumoren, die bereits metastasiert sind ¹³², und äußern den Verdacht, dass sich der Anstieg von Sialyl-Lewis^x auf diesen Tumoren mit dem Expressionsverlust von FUT6 erklären lässt ¹³⁰. Weshalb es in Tumorzellen des Kolorektums zum Anstieg oder Abfall von FUT3 kommt, bleibt bislang unklar. Ähnlich wie für ST3GAL4 wird die gemessene Genexpression womöglich von der jeweiligen Subpopulation von Tumorzellen abhängen. Möglicherweise spielen auch hier Entzündungsmediatoren eine entscheidende Rolle. Beim Krankheitsbild der Cystischen Fibrose konnte beispielsweise bewiesen werden, dass der Anstieg von Interleukin 6 und 8 zu einem erheblichen Anstieg der Transkriptionsrate von FUT3 im Lungengewebe führt. In Folge exprimierten die untersuchten Zellen vermehrt Sialyl-Lewis^x Antigen ¹³⁴. Ähnliches konnte für FUT3 beim kolorektalen Karzinom noch nicht gezeigt werden. In naher Zukunft sollte geklärt werden, welche Subpopulationen durch die Expressionssteigerung von FUT3 vermehrt Sialyl-Lewis^x und Sialy-Lewis^a exprimieren. Dies könnte möglicherweise therapeutischen Nutzen haben. So konnten Weston et al. bereits am Mausmodel belegen, dass mittels Antisense Technologie die Translation von FUT3 in HT-29LMM Kolonkarzinomzelllinien geblockt werden kann und in Folge kein prometastatisches Verhalten dieser Zelllinie mehr zu beobachten war ¹²⁶.

4.2.5 UGT2B17

UGT2B17 gehört zur Gruppe der UGT-Glucuronosyltransferasen, welche als Phase 2 Enzyme der Biotransformation an der Metabolisierung einer Vielzahl von endogenen Substanzen, wie beispielsweise Bilirubin, Schilddrüsenhormonen oder Steroidhormonen, sowie exogener Stoffe, wie zum Beispiel Medikamenten, Karzinogenen oder Umweltschadstoffen, beteiligt sind ⁸⁴. In Geweben wie Prostata, Leber und Haut ist UGT2B17 für die Glucuronidierung von Dihydrotestosteron und dessen Metaboliten verantwortlich⁸³. Neben UGT2B15 ist UGT2B17 die einzige Glucuronosyltransferase, welche in der Lage ist Testosteron zu glucuronidieren ¹³⁵. Welche spezifische Aufgabe UGT2B17 in Kolorektaler Schleimhaut erfüllt, ist bisher nicht bekannt. Das sie in der gesunden Schleimhaut des Kolons stark exprimiert wird, wurde von Nakamura et al. bereits 2008 beschrieben⁸⁴.

Die in dieser Arbeit gewonnen Daten zeigen einen dramatischen Genexpressionsverlust von UGT2B17 beim Kolonkarzinom (Fold Change (N/T) 25,51). Bereits die vorliegenden MA-Analyseergebnisse konnten einen ähnlich starken Expressionsverlust von UGT2B17 ermitteln (Fold Change (N/T) 30,47). Da die Ergebnisse dieser zwei unabhängig voneinander durchgeführten Studien hochsignifikant miteinander korrelieren (r(N)=0,81, p<0,0001; r(T)=0,95, p<0,0001; r(FC)=0,94, p<0,0001), ist davon

auszugehen, dass die Expression von UGT2B17, aus bisher nicht geklärter Ursache, beim Kolonkarzinom sehr stark abfällt, bei einigen Tumoren regelrecht zu verschwinden scheint. Giuliani et al. konnten ähnliches für sämtliche UGT1A Isoformen in einer Studie 2005 zeigen ⁸⁵. Sie konnten nachweisen, dass die UGT1A Isoformen in normaler Kolonmukosa und Adenomen mit low grade Dysplasien gehäuft exprimiert werden, in Adenomen mit high grade Dysplasie und Karzinomen jedoch meist nicht mehr gefunden werden können. Sie schlussfolgerten daraus, dass UGT-Glucuronosyltransferasen in gesunder Kolonschleimhaut womöglich eine schützende Funktion gegenüber mit der Nahrung aufgenommenen Kanzerogenen besitzen. Allerdings scheint die Expression von UGT2B17 auch von der Subpopulation von Tumorzellen abhängig zu sein, an welchen die Untersuchungen vorgenommen werden. So zeigt die Zelllinie LS180, eine Kolonkarzinomzelllinie, eine ausgesprochen starke Expression fast aller UGT-Glucuronosyltransferasen, inklusive UGT2B17⁸⁴.

Die gemessenen Genexpressionswerte unterliegen, vor allem in der gesunden Schleimhaut, extremen Schwankungen. Bei zwei Patienten (11 und 12) scheint UGT2B17 sowohl in normaler als auch in erkrankter Kolonschleimhaut kaum exprimiert zu werden. Diese interindividuelle Variabilität bei der Ausprägung von UGT2B17 könnte mit einem genetischen Polymorphismus im Zusammenhang stehen, wie er von Wilson et al. beschrieben wird ¹³⁶. Dieser beschreibt einen Deletionspolymorphismus für UGT2B17, der unter der weißen Bevölkerung (Kaukasiern) häufiger auftritt als bei Afro-Amerikanern. Bekannt ist, dass genetische Polymorphismen von UGTs die Pharmakokinetik von Medikamenten beeinflussen können. So müssen Patienten, welche einen UGT1A1*28 Polymorphismus aufweisen und wegen eines metastasierten Kolonkarzinoms mit Irinotecan behandelt werden, mit einer erhöhten Toxizität dieses Medikamentes rechnen ^{137,138}. Da Androgene bei der Behandlung dieses Tumorleidens derzeit keine Anwendung finden, wird ein Polymorphismus von UGT2B17 beim Kolonkarzinom wahrscheinlich keine gravierende Rolle spielen.

Interessant ist jedoch die Tatsache, dass die Aktivierung von funktionalen membranständigen Androgenrezeptoren (mAR) bei Zelllinien des Kolonkarzinoms (Caco2) sowie am Mausmodel zur Induktion der Apoptose führten und die Migration dieser Tumorzellen verhindert werden konnte ^{139,140}. Die Aktivierung jener Androgenrezeptoren erfolgte durch Testosteron-Bilirubin Konjugate. Da Testosteron in einigen Subpopulationen des Kolonkarzinoms durch den Expressionsverlust von UGT2B17 nur sehr begrenzt metabolisiert würde und an mAR gebunden eine

proapoptotische Reaktion auszulösen scheint, könnte die Anwendung von Testosteronkonjugaten bei der Therapie des Kolonkarzinoms eine neue Therapieoption darstellen. In gesundem Kolongewebe konnten mAR nicht nachgewiesen werden, sodass unspezifische Reaktionen in gesunder Kolonschleimhaut eher unwahrscheinlich wären ¹³⁹.

Welche Rolle der Genexpressionsverlust von UGT2B17 beim Kolonkarzinom tatsächlich spielt, durch welche molekulargenetischen Einflüsse er ausgelöst wird und welche Folgen er für die Tumorzelle hat, bleibt bis heute ungeklärt. Um diese Zusammenhänge zu klären, müssen weitere Studien durchgeführt werden. Dabei könnte die Zelllinie LS180 ein geeignetes Forschungsobjekt sein, da in dieser Tumorzelllinie fast sämtliche UGT-Glucuronosyltransferasen exprimiert werden und ein gezielter knock-out einzelner Gene, Aufschlüsse über die molekulargenetischen Zusammenhänge liefern kann.

4.2.6 HS6ST2

HS6ST2 gehört zur Enzymgruppe der Sulfotransferasen. Die von HS6ST2 katalysierte 6-O-Sulfatierung von Heparansulfaten, einer speziellen Gruppe von Proteoglykanen, findet im Golgi-Netzwerk statt. Diese makromolekularen Polysaccharide bestehen aus repetitiven N-Acetylglucosamin-D-Glucuronat Copolymeren, die an ein Tetrasaccharid (Xyl-Gal-Gal-GlcUA) gebunden sind, welches wiederum an die Serylgruppe eines Proteins gekoppelt ist ⁴². Heparansulfate finden sich gehäuft auf Zelloberflächen und in der Extrazellulärmatrix ¹⁴¹. Ihre Hauptfunktion ist die Interaktion mit verschiedensten Liganden, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren oder Morphogenen und deren Rezeptoren, die etliche biologische und pathologische Prozesse beeinflussen ¹⁴².

Gut dokumentiert ist die Aufgabe von 6-O-sulfatierten Heparansulfaten in der Embryonalentwicklung verschiedener Lebewesen. So führt das Ausschalten von Heparansulfat-6-O-Sulfotransferase (HS6ST) bei Embryonen der Taufliege (Drosophila) zu deren frühzeitigem Absterben, begleitet von Fehlentwicklungen bei der Anlage der Trachea ¹⁴³. Bei Fadenwürmern (Caenorhabditis elegans) wird durch Mutation von HS6ST die axonale und zelluläre Leitung von Neuronen erheblich beeinträchtigt ¹⁴⁴. Auch bei Mausembryonen, die kein HS6ST exprimieren, verläuft die Embryogenese meist letal oder führt zu Wachstumsverminderung mit Skelettdeformitäten und Anlageanomalien der Augen ¹⁴⁵.

Über die biologische Funktion 6-O-sulfatierter Heparansulfate bei der Entwicklung von Karzinomen ist bisher nicht viel bekannt. Song et al. konnten 2011 zeigten, dass HS6ST2 in der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 stark exprimiert wird, HS6ST1 und 3 hingegen nicht. Der gezielte knock out des Gens HS6ST2 führte in dieser Zelllinie zur Hemmung des Notch-Signalweges, wodurch das Tumorwachstum verringert, sowie dessen invasives Verhalten eingeschränkt wurde ¹⁴⁶. Der Notch-Signalweg, benannt nach seinem membranständigen Rezeptor, spielt während der Embryonalentwicklung, aber auch im adulten Organismus, eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung, Proliferation, Apoptose und Cancerogenese. Song et al. demonstrierten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von HS6ST2 und dem Notch-Liganten Jagged1, sowie Notch2 und Snail. Durch gezielten knock out von HS6ST2 wurde die Jagged1, Notch2 und Snail Expression verringert, sodass der Notch-Signalweg keine Wirkung entfalten konnte. Über welchen genauen biomolekularen Mechanismus HS6ST2 letztendlich Einfluss auf die Aktivierung des Notch-Signalweges nimmt, konnte von Song et al. nicht geklärt werden und bleibt bis heute ungewiss. Das die Aktivierung von Notch über Jagged1 bei Mammakarzinomen mit forciertem Tumorwachstum und der Bildung von Metastasen vergesellschaftet ist, ist bekannt¹⁴⁷. Die Rolle von Notch als Stimulator für invasives Tumorwachstum über die Aktivierung von EMT (epithelial-mesenchymal-transition) wurde 2008 ausführlich von Sahlgren et al. untersucht ¹⁴⁸. Auch die Tumorangiogenese scheint über die Expression des Notch-Liganden D114 von dem an Notch gekoppelten Signalweg stark beeinflusst zu werden 149

Die in dieser Arbeit ermittelten Expressionswerte für HS6ST2 zeigen im Mittel eine mehr als 5-fache Expressionszunahme beim Kolonkarzinom (Fold Change (N/T) 0,18) verglichen zur gesunden Kolonschleimhaut. Auch die vorliegenden MA-Daten konnten ein ähnliches Ergebnis nachweisen (Fold Change (N/T) 0,21). Hatabe et al. zeigten Mitte 2013, dass HS6ST2 in kolorektalen Karzinomen verstärkt exprimiert wird und mit einer schlechten Langzeitprognose zu rechnen ist ⁸⁶. Da drei unabhängige Studien zu ähnlichem Ergebnis kommen, scheint es sehr wahrscheinlich, dass HS6ST2 bei kolorektalen Karzinomen verstärkt transkribiert wird. Ob HS6ST2 auch bei diesen Karzinomen Einfluss auf den Notch-Signalweg hat oder auf welche anderen Molekühle es regulierend wirkt, sollte in weiteren Studien überprüft werden. Gewiss ist, dass der Notch-Signalweg, ähnlich wie bei anderen Tumoren, auch beim kolorektalen Karzinom

Sollte HS6ST2, ähnlich wie beim Pankreaskarzinom, regulierend in den Notch-Signalweg eingreifen, könnte HS6ST2 eine neue Zielstruktur darstellen, um therapeutisch über die Hemmung des Notch-Signalweges in das Wachstumsverhalten kolorektaler Karzinome einzugreifen.

4.3 Diskussion zum Ergebnisvergleich zwischen MA und qRT-PCR

Wesentliche Aufgabe dieser Arbeit war die Validierung der vorliegenden MA-Daten. Bei der Bestimmung des Grades des Zusammenhanges zwischen den einzelnen Messreihen und den Fold Changes beider Messverfahren konnte vereinzelt keine Korrelation zwischen den zu untersuchenden Variablen gezeigt werden. Von signifikanter Korrelation wurde gesprochen, wenn die zu untersuchenden Variablen auf dem 5% Niveau miteinander korrelierten. Für die einzelnen Messreihen des Normalgewebes von NANP (r=0,27; Signifikanzniveau: 0,92) und HS6ST2 (r=0,46; Signifikanzniveau: 0,062) konnte keine Korrelation zwischen beiden Methoden festgestellt werden. Auch für die Fold Changes (N/T) der einzelnen Messwerte von NANP (r=0,28; Signifikanzniveau: 0,28) konnte keine Korrelation ermittelt werden. Eine Stichprobenzahl von n=17 (bzw. 14) ist zu klein, um eine sichere Aussage über den Grad des Zusammenhanges zwischen zwei unabhängigen Variablen treffen zu können. Es bedarf einer größeren Anzahl an Stichproben, um sicher zu sein, dass es sich bei den erhobenen Werten nicht um Zufallswerte handelt.

Die Methodik der quantitativen real time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) ist derzeit ein oft angewendetes Verfahren, um Microarraydaten zu validieren ⁹¹⁻⁹⁴. Bis heute existieren keine Standards um eine derartige Validierung vorzunehmen ⁹¹. Immer wieder wird darüber berichtet, dass es zu widersprüchlichen Ergebnissen zwischen beiden Methoden kommt. Entscheidend für die Aussagekraft der Ergebnisse beider Verfahren ist die Qualität der verwendeten RNA. Durch kontaminierende Faktoren, wie beispielsweise Schwebstoffe in der Luft oder ungleiches Gewebe, sowie durch Salze, Alkohole oder Phenole, welche die Reverse Transkriptase beeinflussen können, kann die gemessene Genexpression erheblich beeinflusst werden ¹⁵¹. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Sorgfalt bei der Ausübung der Methode und damit auch die Erfahrenheit des Laboranden eine maßgebliche Größe bei der Erhebung von exakten Genexpressionsdaten darstellen ¹⁵². Die Verwendung von frischem Gewebe oder direkt nach der Gewebegewinnung in flüssigem Stickstoff schockgefrorenem Gewebe, scheint
in Bezug auf die Qualität der RNA keinen Unterschied zu machen ⁹¹. Wichtig ist die nach RNA Extraktion durchzuführende Bioanalyse, welche Aufschluss über die Qualität der gewonnenen RNA gibt.

Das Erheben von Genexpressionsdaten mittels Microarraytechnologie ist heutzutage ein gängiges Verfahren. Jedoch ist diese Methodik einigen Störfaktoren ausgesetzt, sodass die gewonnen Ergebnisse immer mit einer weiteren Methode überprüft werden müssen. So kommt es bei vielen Microarraysystemen gelegentlich zu unspezifischen und/oder Kreuzhybridisierungen, was folglich zu Veränderungen und somit Verfälschungen der gemessenen Fluoreszenzsignale führt ¹⁰³. Demnach würde man bei der Validierung der Daten durch ein anderes Analyseverfahren widersprüchliche Ergebnisse der Genexpression erhalten.

Auch bei der qRT-PCR sind eine Reihe von potentiellen Fehlerquellen bekannt die zu Verzerrungen der gemessenen Ergebnisse führen können: 1) Amplifikationsfehler ^{103,151}; 2) fehlerhaftes Arbeiten der Primer ¹⁵² sowie 3) die veränderte Effizienz in den späten Zyklen der PCR ¹⁵¹.

Morey et al. beschäftigten sich 2006 intensiv mit Faktoren, welche die Korrelation zwischen MA- und qRT-PCR-Ergebnissen beeinflussen⁹¹. Sie kamen zu dem Schluss, ein Fold Change >1,4, unabhängig von der im Spot des MA gemessenen dass Intensität des Fluoreszenzsignals sowie dem Zeitpunkt des crossing points der gRT-PCR, zu signifikant hohen Korrelationen führt. Ein Fold Change <1,4 lies die Korrelationskoeffizienten für die einzelnen Messreihen drastisch sinken, was in einer Studie von Dallas et al. bereits 2005 zum Ausdruck kam ¹⁵³. Der von Morey und Dallas beschriebene Fold Change ist anders als in dieser Studie immer >1, da seine Ausgangsgröße immer der niedriger gemessene Expressionswert (X) ist, der ins Verhältnis zum größeren Expressionswert (Y) gesetzt wird, sprich Y/X. Der mittels gRT-PCR in dieser Studie ermittelte Fold Change (N/T) für NANP beträgt 0,29 und würde bei Morey und Dallas einen Wert von 3,43 (T/N) haben. Generell kann man somit sagen, dass die Korrelation zwischen den Ergebnissen beider Methoden zunimmt, je größer der Unterschied der Genexpression in den zu untersuchenden Geweben ist. Morey et al. konnten außerdem zeigen, dass die Messwerte hochregulierter Gene stärker miteinander korrelierten als diejenigen herunterregulierter Gene. Außerdem war die Korrelation der Messwerte jener Gene signifikanter, welche im qRT-PCR Lauf einen crossing ponit >17 und ≤31 aufwiesen. Für Gene, deren crossing points <17 oder >31 lagen, war die Korrelation hingegen eher schlecht.

Für die schlechte Korrelation der Fold Changes von NANP, als auch der Messreihen im Normalgewebe für NANP und HS6ST2 sind die von Morey beschriebenen Faktoren jedoch nicht wegweisend, zumal für beide Gene ein Fold Change deutlich >1,4 vorliegt und sie die einzigen untersuchten Gene dieser Studie sind, bei denen bei beiden Methoden eine Expressionszunahme im Tumorgewebe zu verzeichnen ist. Alle Gene dieser Studie, für die in beiden Methoden ein Expressionsverlust im Tumorgewebe ermittelt werden konnte, haben hingegen hohe Korrelationskoeffizienten. Auch die crossing points der qRT-PCR Läufe für NANP und HS6ST2 befinden sich innerhalb der von Morey beschriebenen Zyklen, um für die Messwerte signifikante Korrelationen zu bekommen. Der genaue Grund für die schlechte Korrelation der Ergebnisse für NANP und HS6ST2 bleibt daher unklar. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die Stichprobenzahl von n=17 zu gering ist, um eine signifikante Aussage über den Grad des Zusammenhangs der Messreihen beider Methoden treffen zu können.

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: '	TUMORPROGRESSIONSMODEL NACH VOGELSTEIN UND FEARON (1988)	.4
ABBILDUNG 2: 1	Legende über die wichtigsten Monosaccharidbausteine in	
(GLYCOPROTEINEN EUKARYOTER ZELLEN	11
ABBILDUNG 3: S	STRUKTURBEISPIELE VON N- UND O-GLYKANEN AUF PROTEINEN	12
ABBILDUNG 4:]	N-ACETYLNEURAMINSÄURE (FISCHER PROJEKTION)	13
ABBILDUNG 5: S	SIALINSÄUREBIOSYNTHESE IN SÄUGETIERZELLEN ³⁹	14
ABBILDUNG 6: S	SCHMELZKURVENANALYSE	31
ABBILDUNG 7: S	STANDARTKURVE AM BEISPIEL DES TARGET GENS NANP	34
ABBILDUNG 8:]	BEISPIEL EINES QRT-PCR LAUFES MIT 30 PROBEN	34
Abbildung 9: 1	DIE ABC- (LSAB) METHODE	39
ABBILDUNG 10:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS GNE IM NORMAL- UND	
	TUMORGEWEBE BEIM KOLONKARZINOM	46
ABBILDUNG 11:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS NANP IM NORMAL- UND	
	TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	47
ABBILDUNG 12:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS ST6GALNAC1 IM NORMAL	-
	UND TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	48
ABBILDUNG 13:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS ST3GAL4 IM NORMAL- UND)
	TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	49
ABBILDUNG 14:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS FUT3 IM NORMAL- UND	
	TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	50
ABBILDUNG 15:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS UGT2B17 IM NORMAL- UND)
	TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	51
ABBILDUNG 16:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS HS6ST2 IM NORMAL- UND	
	TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	52
ABBILDUNG 17:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS GNE IM NORMAL- UND	
	TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	54
ABBILDUNG 18:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS NANP IM NORMAL- UND	
	TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	55
Abbildung 19:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS ST6GALNAC1 IM NORMAL-	-
	UND TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	56
ABBILDUNG 20:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS ST3GAL4 IM NORMAL- UND)
	TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	57
ABBILDUNG 21:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS FUT3 IM NORMAL- UND	
	TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	58
ABBILDUNG 22:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS UGT2B17 IM NORMAL- UND)
	TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	59
ABBILDUNG 23:	RELATIVE EXPRESSIONSWERTE DES TARGET GENS HS6ST2 IM NORMAL- UND	
	TUMORGEWEBE DES KOLONKARZINOMS	60
ABBILDUNG 24:	ART DES ZUSAMMENHANGES DER MESSWERTE VON MA UND QRT-PCR AM	
	BEISPIEL UGT2B17 (NORMALGEWEBE). DIE LOGARITHMISCHE FUNKTION (GRÜ	NE
	Kurve) mit dem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,97 verdeutlicht, dass ehen	R
	EIN LOGARITHMISCHER ZUSAMMENHANG FÜR DIE MESSREIHEN BEIDER	
	MESSVERFAHREN BESTEHT ALS EIN LINEARER.	62
ABBILDUNG 25:	: GENEXPRESSION VON ST3GAL4 IN GESUNDER KOLONMUKOSA BEZOGEN AUF DE	IE
	LOKALISATION IM DICKDARM. PUNKTWOLKE 1 BESCHREIBT DIE IM PROXIMALEN	[
	KOLON DURCH BEIDE METHODEN NACHGEWIESENE DEUTLICH SCHWÄCHERE	
	EXPRESSION VON ST3GAL4, PUNKTWOLKE 2 HINGEGEN DIE IM DISTALEN KOLO	N
	VERSTÄRKTE EXPRESSION.	63

ABBILDUNG 26: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG FÜR DEN GRAD DES ZUSAMMENHANGS DER I	Fold
Changes (N/T) der einzelnen Messwerte beider Methoden für	
ST6GALNAC1. DAS BESTIMMTHEITSMAß R ² GIBT DEN LINEAREN	
ZUSAMMENHANG FÜR DIE EINZELNEN VARIABLEN AN.	68
ABBILDUNG 27: BOXPLOTDARSTELLUNGEN DER RELATIVEN GENEXPRESSION DES TARGET GE	NS
GNE IM NORMAL- UND TUMORGEWEBE BEIDER METHODEN	69
ABBILDUNG 28: BOXPLOTDARSTELLUNG DER RELATIVEN GENEXPRESSION DES TARGET GENS	
NANP IM NORMAL- UND TUMORGEWEBE BEIDER METHODEN	70
ABBILDUNG 29: BOXPLOTDARSTELLUNG DER RELATIVEN GENEXPRESSION DES TARGET GENS	
ST6GALNAC1 IM NORMAL- UND TUMORGEWEBE BEIDER METHODEN	71
ABBILDUNG 30: BOXPLOTDARSTELLUNG DER RELATIVEN GENEXPRESSION DES TARGET GENS	
ST3GAL4 IM NORMAL- UND TUMORGEWEBE BEIDER METHODEN	72
ABBILDUNG 31: BOXPLOTDARSTELLUNG DER RELATIVEN GENEXPRESSION DES TARGET GENS	
FUT3 IM NORMAL- UND TUMORGEWEBE BEIDER METHODEN	73
ABBILDUNG 32: BOXPLOTDARSTELLUNG DER RELATIVEN GENEXPRESSION DES TARGET GENS	
UGT2B17 IM NORMAL- UND TUMORGEWEBE BEIDER METHODEN	74
ABBILDUNG 33: BOXPLOTDARSTELLUNGEN DER RELATIVEN GENEXPRESSION FÜR DAS TARGET	Г
HS6ST2 IM NORMAL- UND TUMORGEWEBE BEIDER METHODEN	75
ABBILDUNG 34: NEGATIVKONTROLLE, GESUNDE KOLONMUKOSA 100X VERGRÖßERT	78
ABBILDUNG 35: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT ST6GALNAC1, 200x vergrößert,	
Normal- (unten/durchgezogener Pfeil) vs. Tumorgewebe	
(OBEN/GEPUNKTELTER PFEIL)	78
ABBILDUNG 36: IMMUNHISTOCHEMISCHE (ZYTOPLASMATISCHE/MIT PFEIL GEKENNZEICHNETE)
Färbung mit ST6GALNAC1, 400x vergrößert, Bsp.: Patient 11	
NORMALGEWEBE (RECHTS OBEN TUMOR).	79
ABBILDUNG 37: IMMUNHISTOCHEMISCHEN (ZYTOPLASMATISCHE/PFEIL) FÄRBUNG MIT	
ST6GALNAC1, 400x vergrößert, Tumorgewebe Patient 12	79
ABBILDUNG 38: NEGATIVKONTROLLE, GESUNDE KOLONMUKOSA 100X VERGRÖßERT	81
ABBILDUNG 39: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT NANP, 200x VERGRÖBERT, NORMAL	-
(UNTEN/DURCHGEZOGENER PFEIL) VS. TUMORGEWEBE (OBEN/GEPUNKTELTER	Ł
PFEIL).	81
ABBILDUNG 40: IMMUNHISTOCHEMISCHE (ZYTOPLASMATISCHE) FÄRBUNG (PFEILE) MIT NAN	P,
200x vergrößert, Tumorgewebe Patient 6	82
ABBILDUNG 41: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MIT NANP, 400x vergrößert, starke	
Rotfärbung neuronaler Ganglienzellen	82

Tabellenverzeichnis

TAB.	1: STADIENEINTEILUNG NACH UICC (2009) UND DUKES
TAB.	2: PATHOLOGISCHE KLASSIFIKATION NACH DEM TNM-SYSTEM (2009) DER UICC
TAB.	3: TABELLARISCHER ÜBERBLICK ÜBER DIE PATIENTENDATEN
TAB.	4: SEQUENZEN DER VERWENDETEN PRIMER
TAB.	5: Versuchsprotokoll mit den PCR-Bedingungen wärend aller Läufe im
	LIGHTCYCLER (ROCHE)
TAB.	6: VERGLEICHENDE BETRACHTUNG DER MITTELS QRT-PCR ERMITTELTEN FOLD CHANGES
	(N/T) für die untersuchten Gene mit den vorliegenden Fold Changes (N/T) der
	MA-ANALYSE61
TAB.	7: DARSTELLUNG DER KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN (R), SOWIE DES SIGNIFIKANZNIVEAUS
	(p-Wert) der Messwerte beider Methoden für die untersuchten Gene. Eine
	STATISTISCHE SIGNIFIKAMZ WIRD BEI EINEM P $<0,05$ ANGENOMMEN
TAB.	8: DARSTELLUNG DER KORRELATIONSKOEFFIZIENTEN (R), SOWIE DES SIGNIFIKANZNIVEAUS
	(P-WERT) AUS DEN FOLD CHANGES BEIDER METHODEN FÜR DIE JEWEILIGEN GENE. EINE
	STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WIRD BEI EINEM P $<0,05$ ANGENOMMEN67
TAB.	9: Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe
	für die jeweiligen Target Gene durch den Wilcoxon Test für die Messreihen
	BEIDER METHODEN. EINE STATISTISCHE SIGIFIKANZ WIRD BEI EINEM P $<0,05$
	ANGENOMMEN
TAB.	10: ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN MIT DEM PRIMÄR ANTIKÖRPER
	ST6GALNAC1. NB= NICHT BEURTEILBAR77
TAB.	11: ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN MIT DEM PRIMÄR ANTIKÖRPER
	NANP. NB = NICHT BEURTEILBAR

Literaturverzeichnis

- 1. Hirner A, Weise K. Chirurgie 2.Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 2008:614-7.
- 2. Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J. Basislehrbuch Innere Medizin 3.Auflage. München: Urban und Fischer Verlag. 2006:590-4.
- 3. Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. Am J Clin Nutr. 2003 Sep;78(3 Suppl):559S-69S.
- 4. Le Marchand L, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN, Englyst HN, Lyu LC. Dietary fiber and colorectal cancer risk. Epidemiology. 1997 Nov;8(6):658-65.
- 5. Wakai K, Date C, Fukui M, et al. Dietary fiber and risk of colorectal cancer in the Japan collaborative cohort study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007 Apr;16(4):668-75.
- 6. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. Hum Mol Genet. 2001 Apr;10(7):721-33.
- 7. al-Taie O, Mork H, Seufert J, Treis H, Jakob F, Scheurlen M. [Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC). Current review of etiology, clinical aspects, diagnosis and therapy]. Med Klin (Munich). 2001 Sep 15;96(9):529-38.
- 8. Pohl C, Hombach A, Kruis W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. Hepatogastroenterology. 2000 Jan-Feb;47(31):57-70.
- 9. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. Gastroenterology. 2008 Oct;135(4):1079-99.
- 10. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science. 2006 Oct 13;314(5797):268-74.
- 11. Bokemeyer C. Das kolorektale Karzinom Grundlagen, Prävention und moderne Therapiekonzepte. Wessobrunn: Socio-medico Verlag GmbH. 2007:14.
- 12. Limsui D, Vierkant RA, Tillmans LS, et al. Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes. J Natl Cancer Inst. Jul 21;102(14):1012-22.
- 13. Sinha R, Kulldorff M, Chow WH, Denobile J, Rothman N. Dietary intake of heterocyclic amines, meat-derived mutagenic activity, and risk of colorectal adenomas. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2001 May;10(5):559-62.
- 14. Butler LM, Sinha R, Millikan RC, et al. Heterocyclic amines, meat intake, and association with colon cancer in a population-based study. Am J Epidemiol. 2003 Mar 1;157(5):434-45.
- 15. van Engeland M, Weijenberg MP, Roemen GM, et al. Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands cohort study on diet and cancer. Cancer Res. 2003 Jun 15;63(12):3133-7.
- 16. Zhao J, Zhu Y, Wang PP, et al. Interaction between alcohol drinking and obesity in relation to colorectal cancer risk: a case-control study in Newfoundland and Labrador, Canada. BMC Public Health.12:94.
- 17. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med. 1988 Sep 1;319(9):525-32.
- 18. Herold Gea. Innere Medizin eine vorlesugsorientierte Darstellung. Köln: Gerd Herold. 2007:441-7.
- 19. Towler B, Irwig L, Glasziou P, Kewenter J, Weller D, Silagy C. A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. BMJ. 1998 Aug 29;317(7158):559-65.

- 20. Li R, Liu J, Xue H, Huang G. Diagnostic value of fecal tumor M2-pyruvate kinase for CRC screening: A systematic review and meta-analysis. Int J Cancer. 2012 Jan 19.
- 21. Li Y, Wang JJ. [Clinical significance of blood and fecal tumor M2-pyruvate kinase expression in patients with colorectal cancer]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2011 Dec;31(12):2087-9.
- 22. Kristinsson J, Nygaard K, Aadland E, et al. Screening of first degree relatives of patients operated for colorectal cancer: evaluation of fecal calprotectin vs. hemoccult II. Digestion. 2001;64(2):104-10.
- 23. Schmiegel W, Adler G, Fruhmorgen P, et al. [Colorectal carcinoma: prevention and early detection in an asymptomatic population--prevention in patients at risk--endoscopic diagnosis, therapy and after-care of polyps and carcinomas. German Society of Digestive and Metabolic Diseases/Study Group for Gastrointestinal Oncology]. Z Gastroenterol. 2000 Jan;38(1):49-75.
- 24. Muller AD, Sonnenberg A. Protection by endoscopy against death from colorectal cancer. A case-control study among veterans. Arch Intern Med. 1995 Sep 11;155(16):1741-8.
- 25. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. N Engl J Med. 1993 Dec 30;329(27):1977-81.
- 26. Froehlich F, Gonvers JJ, Vader JP, Dubois RW, Burnand B. Appropriateness of gastrointestinal endoscopy: risk of complications. Endoscopy. 1999 Oct;31(8):684-6.
- 27. Sieg A, Hachmoeller-Eisenbach U, Eisenbach T. Prospective evaluation of complications in outpatient GI endoscopy: a survey among German gastroenterologists. Gastrointest Endosc. 2001 May;53(6):620-7.
- 28. Jessup JM, Stewart A, Greene FL, Minsky BD. Adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer: implications of race/ethnicity, age, and differentiation. JAMA. 2005 Dec 7;294(21):2703-11.
- 29. Itzkowitz SH, Bloom EJ, Kokal WA, Modin G, Hakomori S, Kim YS. Sialosyl-Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. Cancer. 1990 Nov 1;66(9):1960-6.
- 30. Akamine S, Nakagoe T, Sawai T, et al. Differences in prognosis of colorectal cancer patients based on the expression of sialyl Lewisa, sialyl Lewisx and sialyl Tn antigens in serum and tumor tissue. Anticancer Res. 2004 Jul-Aug;24(4):2541-6.
- 31. Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, et al. Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis(x) in colorectal cancer metastasis. Dis Colon Rectum. 1997 Apr;40(4):420-31.
- 32. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. J Natl Cancer Inst. 2004 Oct 6;96(19):1420-5.
- Schiffmann L, Schwarz F, Linnebacher M, et al. A novel sialyl LeX expression score as a potential prognostic tool in colorectal cancer. World J Surg Oncol. 2012 May 23;10(1):95.
- 34. Grabowski P, Mann B, Mansmann U, et al. Expression of SIALYL-Le(x) antigen defined by MAb AM-3 is an independent prognostic marker in colorectal carcinoma patients. Int J Cancer. 2000 Oct 15;88(2):281-6.

- 35. Nakagoe T, Fukushima K, Nanashima A, et al. Expression of Lewis(a), sialyl Lewis(a), Lewis(x) and sialyl Lewis(x) antigens as prognostic factors in patients with colorectal cancer. Can J Gastroenterol. 2000 Oct;14(9):753-60.
- 36. Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, et al. Difference in prognostic value between sialyl Lewis(a) and sialyl lewis(x) antigens in blood samples obtained from the drainage veins of the colorectal tumors. Cancer Lett. 2000 Oct 31;159(2):159-68.
- 37. Lundin M, Nordling S, Roberts PJ, et al. Sialyl Tn is a frequently expressed antigen in colorectal cancer: No correlation with patient prognosis. Oncology. 1999 Jul;57(1):70-6.
- 38. Zhao YY, Takahashi M, Gu JG, et al. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. Cancer Sci. 2008 Jul;99(7):1304-10.
- 39. Gröbe D. Biochemische Modifikation von Glykan-Strukturen durch nicht natürliche Monosaccharide und ihr Einfluss auf die Sialidase-Resistenz Dissertation. 2008:15.
- 40. Arnold JN, Saldova R, Hamid UM, Rudd PM. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. Proteomics. 2008 Aug;8(16):3284-93.
- 41. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. Biochim Biophys Acta. 1999 Dec 6;1473(1):4-8.
- 42. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Biochemie & Pathobiochemie 8.Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg. 2007:28, 546.
- 43. Butters TD. Control in the N-linked glycoprotein biosynthesis pathway. Chem Biol. 2002 Dec;9(12):1266-8.
- 44. Cullen PJ. Post-translational regulation of signaling mucins. Curr Opin Struct Biol. 2011 Oct;21(5):590-6.
- 45. Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. Chem Rev. 2002 Feb;102(2):439-69.
- 46. Hinderlich S. Biosynthese von Sialinsäuren und anderen Aminozuckern in Säugetieren. 2003(Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Biochemie):24-9.
- 47. Maliekal P, Vertommen D, Delpierre G, Van Schaftingen E. Identification of the sequence encoding N-acetylneuraminate-9-phosphate phosphatase. Glycobiology. 2006 Feb;16(2):165-72.
- 48. Harduin-Lepers A, Recchi MA, Delannoy P. 1994, the year of sialyltransferases. Glycobiology. 1995 Dec;5(8):741-58.
- 49. Saxon E, Bertozzi CR. Chemical and biological strategies for engineering cell surface glycosylation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:1-23.
- 50. Haltiwanger RS, Lowe JB. Role of glycosylation in development. Annu Rev Biochem. 2004;73:491-537.
- 51. Shimamura M, Shibuya N, Ito M, Yamagata T. Repulsive contribution of surface sialic acid residues to cell adhesion to substratum. Biochem Mol Biol Int. 1994 Aug;33(5):871-8.
- 52. Rainer TH. L-selectin in health and disease. Resuscitation. 2002 Feb;52(2):127-41.
- 53. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. Trends Mol Med. 2003 Jun;9(6):263-8.
- 54. Liu FR, Jiang CG, Li YS, Li JB, Li F. Cimetidine inhibits the adhesion of gastric cancer cells expressing high levels of sialyl Lewis x in human vascular

endothelial cells by blocking E-selectin expression. Int J Mol Med. 2011 Apr;27(4):537-44.

- 55. Takada A, Ohmori K, Yoneda T, et al. Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. Cancer Res. 1993 Jan 15;53(2):354-61.
- 56. Alon R, Rosen S. Rolling on N-linked glycans: a new way to present L-selectin binding sites. Nat Immunol. 2007 Apr;8(4):339-41.
- 57. Varki A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. Nature. 2007 Apr 26;446(7139):1023-9.
- 58. Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, et al. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. Nat Biotechnol. 2008 Jan;26(1):107-13.
- 59. Russell CJ, Webster RG. The genesis of a pandemic influenza virus. Cell. 2005 Nov 4;123(3):368-71.
- 60. Colli W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan Trypanosoma cruzi. FASEB J. 1993 Oct;7(13):1257-64.
- 61. Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. J Biol Chem. 1971 Mar 10;246(5):1461-7.
- 62. Keck R, Nayak N, Lerner L, et al. Characterization of a complex glycoprotein whose variable metabolic clearance in humans is dependent on terminal N-acetylglucosamine content. Biologicals. 2008 Jan;36(1):49-60.
- 63. Leivonen M, Nordling S, Lundin J, von Boguslawski K, Haglund C. STn and prognosis in breast cancer. Oncology. 2001;61(4):299-305.
- 64. Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev. 2004 Jan-Jun;23(1-2):77-99.
- 65. Nannini M, Pantaleo MA, Maleddu A, Astolfi A, Formica S, Biasco G. Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: results and perspectives. Cancer Treat Rev. 2009 May;35(3):201-9.
- 66. Maughan NJ, Lewis FA, Smith V. An introduction to arrays. J Pathol. 2001 Sep;195(1):3-6.
- 67. Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. High density synthetic oligonucleotide arrays. Nat Genet. 1999 Jan;21(1 Suppl):20-4.
- 68. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. Nat Genet. 1999 Jan;21(1 Suppl):10-4.
- 69. Gershon D. Microarray technology: an array of opportunities. Nature. 2002 Apr 25;416(6883):885-91.
- 70. Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, Levine AJ. Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. Cancer Res. 2001 Apr 1;61(7):3124-30.
- 71. Frederiksen CM, Knudsen S, Laurberg S, Orntoft TF. Classification of Dukes' B and C colorectal cancers using expression arrays. J Cancer Res Clin Oncol. 2003 May;129(5):263-71.
- 72. Groene J, Mansmann U, Meister R, et al. Transcriptional census of 36 microdissected colorectal cancers yields a gene signature to distinguish UICC II and III. Int J Cancer. 2006 Oct 15;119(8):1829-36.
- 73. Horstkorte R, Nohring S, Danker K, Effertz K, Reutter W, Lucka L. Protein kinase C phosphorylates and regulates UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. FEBS Lett. 2000 Mar 31;470(3):315-8.

- 74. Van Rinsum J, Van Dijk W, Hooghwinkel GJ, Ferwerda W. Subcellular localization and tissue distribution of sialic acid-forming enzymes. N-acetylneuraminate-9-phosphate synthase and N-acetylneuraminate 9-phosphatase. Biochem J. 1984 Oct 15;223(2):323-8.
- 75. Takahashi I, Maehara Y, Kusumoto T, et al. Combined evaluation of preoperative serum sialyl-Tn antigen and carcinoembryonic antigen levels is prognostic for gastric cancer patients. Br J Cancer. 1994 Jan;69(1):163-6.
- 76. Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, et al. Pre-operative serum levels of sialyl Tn antigen predict liver metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. Eur J Surg Oncol. 2001 Dec;27(8):731-9.
- 77. Paganuzzi M, Bobbio B, Marroni P, Filiberti R, Secco GB, Grossi CE. Prognostic role of serum sialyl Lewisx (CD15s) in colorectal cancer. Oncology. 2003;65(1):52-9.
- 78. Yin X, Rana K, Ponmudi V, King MR. Knockdown of fucosyltransferase III disrupts the adhesion of circulating cancer cells to E-selectin without affecting hematopoietic cell adhesion. Carbohydr Res. 2010 Nov 2;345(16):2334-42.
- 79. Koch A. Genexpression von a(1,3)-Fucosyltransferasen, Präsentation fucosylierter Zelloberflächen-Glykane und Bindung an E-Selektin durch diverse Magenkarzinom-Zelllinien. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften an der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilianus-Universität München. 2004:14.
- 80. St Hill CA. Interactions between endothelial selectins and cancer cells regulate metastasis. Front Biosci. 2011;17:3233-51.
- 81. St Hill CA, Krieser K, Farooqui M. Neutrophil interactions with sialyl Lewis X on human nonsmall cell lung carcinoma cells regulate invasive behavior. Cancer. 2011 Oct 1;117(19):4493-505.
- 82. Barbier O, Belanger A. Inactivation of androgens by UDPglucuronosyltransferases in the human prostate. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2008 Apr;22(2):259-70.
- 83. Chouinard S, Yueh MF, Tukey RH, et al. Inactivation by UDPglucuronosyltransferase enzymes: the end of androgen signaling. J Steroid Biochem Mol Biol. 2008 Apr;109(3-5):247-53.
- 84. Nakamura A, Nakajima M, Yamanaka H, Fujiwara R, Yokoi T. Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in human normal tissues and various cell lines. Drug Metab Dispos. 2008 Aug;36(8):1461-4.
- 85. Giuliani L, Ciotti M, Stoppacciaro A, et al. UDP-glucuronosyltransferases 1A expression in human urinary bladder and colon cancer by immunohistochemistry. Oncol Rep. 2005 Feb;13(2):185-91.
- 86. Hatabe S, Kimura H, Arao T, et al. Overexpression of heparan sulfate 6-sulfotransferase-2 in colorectal cancer. Mol Clin Oncol. 2013 Sep;1(5):845-50.
- 87. Dwek RA. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. Chem Rev. 1996 Mar 28;96(2):683-720.
- 88. Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. Science. 2001 Mar 23;291(5512):2364-9.
- 89. Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Protein glycosylation in development and disease. Bioessays. 1999 May;21(5):412-21.
- 90. Lowe JB, Marth JD. A genetic approach to Mammalian glycan function. Annu Rev Biochem. 2003;72:643-91.

- 91. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. Biol Proced Online. 2006;8:175-93.
- 92. Arikawa E, Sun Y, Wang J, et al. Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. BMC Genomics. 2008;9:328.
- 93. Brazeau DA. Combining genome-wide and targeted gene expression profiling in drug discovery: microarrays and real-time PCR. Drug Discov Today. 2004 Oct 1;9(19):838-45.
- 94. Wang Y, Barbacioru C, Hyland F, et al. Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. BMC Genomics. 2006;7:59.
- 95. Kornfeld S, Kornfeld R, Neufeld EF, O'Brien PJ. The Feedback Control of Sugar Nucleotide Biosynthesis in Liver. Proc Natl Acad Sci U S A. 1964 Aug;52:371-9.
- 96. Enns GM, Seppala R, Musci TJ, et al. Clinical course and biochemistry of sialuria. J Inherit Metab Dis. 2001 Jun;24(3):328-36.
- 97. Keppler OT, Hinderlich S, Langner J, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M. UDP-GlcNAc 2-epimerase: a regulator of cell surface sialylation. Science. 1999 May 21;284(5418):1372-6.
- 98. Schwarzkopf M, Knobeloch KP, Rohde E, et al. Sialylation is essential for early development in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Apr 16;99(8):5267-70.
- 99. Kemmer W, Kessel P, Sanchez-Ruderisch H, et al. Loss of UDP-Nacetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) induces apoptotic processes in pancreatic carcinoma cells. FASEB J. 2012 Feb;26(2):938-46.
- 100. Liggett WH, Jr., Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. J Clin Oncol. 1998 Mar;16(3):1197-206.
- 101. Veganzones-de-Castro S, Rafael-Fernandez S, Vidaurreta-Lazaro M, et al. p16 gene methylation in colorectal cancer patients with long-term follow-up. Rev Esp Enferm Dig. 2012 Mar;104(3):111-7.
- 102. Chen YZ, Liu D, Zhao YX, Wang HT, Gao Y, Chen Y. Relationships between p16 gene promoter methylation and clinicopathologic features of colorectal cancer: a meta-analysis of 27 cohort studies. DNA Cell Biol. 2014 Oct;33(10):729-38.
- 103. Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ, et al. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. Nat Genet. 2002 Dec;32 Suppl:509-14.
- 104. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet. 2004 Jul;5(7):522-31.
- 105. Chekulaeva M, Filipowicz W. Mechanisms of miRNA-mediated posttranscriptional regulation in animal cells. Curr Opin Cell Biol. 2009 Jun;21(3):452-60.
- 106. Rutishauser U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. Nat Rev Neurosci. 2008 Jan;9(1):26-35.
- 107. Gluer S, Schelp C, Gerardy-Schahn R, von Schweinitz D. Polysialylated neural cell adhesion molecule as a marker for differential diagnosis in pediatric tumors. J Pediatr Surg. 1998 Oct;33(10):1516-20.
- 108. Mühlenhoff M, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R. Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function. Curr Opin Struct Biol. 1998 Oct;8(5):558-64.

- 109. Jungnickel J, Bramer C, Bronzlik P, et al. Level and localization of polysialic acid is critical for early peripheral nerve regeneration. Mol Cell Neurosci. 2009 Mar;40(3):374-81.
- 110. Marcos NT, Pinho S, Grandela C, et al. Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen. Cancer Res. 2004 Oct 1;64(19):7050-7.
- 111. Sewell R, Backstrom M, Dalziel M, et al. The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. J Biol Chem. 2006 Feb 10;281(6):3586-94.
- 112. Kjeldsen T, Clausen H, Hirohashi S, Ogawa T, Iijima H, Hakomori S. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl-2----6 alpha-N-acetylgalactosaminyl (sialosyl-Tn) epitope. Cancer Res. 1988 Apr 15;48(8):2214-20.
- 113. Miles DW, Happerfield LC, Smith P, et al. Expression of sialyl-Tn predicts the effect of adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. Br J Cancer. 1994 Dec;70(6):1272-5.
- 114. Yonezawa S, Tachikawa T, Shin S, Sato E. Sialosyl-Tn antigen. Its distribution in normal human tissues and expression in adenocarcinomas. Am J Clin Pathol. 1992 Aug;98(2):167-74.
- 115. Nakagoe T, Sawai T, Tsuji T, et al. Circulating sialyl Lewis(x), sialyl Lewis(a), and sialyl Tn antigens in colorectal cancer patients: multivariate analysis of predictive factors for serum antigen levels. J Gastroenterol. 2001 Mar;36(3):166-72.
- 116. Vazquez-Martin C, Cuevas E, Gil-Martin E, Fernandez-Briera A. Correlation analysis between tumor-associated antigen sialyl-Tn expression and ST6GalNAc I activity in human colon adenocarcinoma. Oncology. 2004;67(2):159-65.
- 117. Chik JH, Zhou J, Moh ES, et al. Comprehensive glycomics comparison between colon cancer cell cultures and tumours: implications for biomarker studies. J Proteomics. 2014 Aug 28;108:146-62.
- 118. Sawada M, Moriya S, Saito S, et al. Reduced sialidase expression in highly metastatic variants of mouse colon adenocarcinoma 26 and retardation of their metastatic ability by sialidase overexpression. Int J Cancer. 2002 Jan 10;97(2):180-5.
- 119. Khatib AM, Fallavollita L, Wancewicz EV, Monia BP, Brodt P. Inhibition of hepatic endothelial E-selectin expression by C-raf antisense oligonucleotides blocks colorectal carcinoma liver metastasis. Cancer Res. 2002 Oct 1;62(19):5393-8.
- 120. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Aug 4;95(16):9325-30.
- 121. Ugorski M, Laskowska A. Sialyl Lewis(a): a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells. Acta Biochim Pol. 2002;49(2):303-11.
- 122. Sawada R, Tsuboi S, Fukuda M. Differential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. J Biol Chem. 1994 Jan 14;269(2):1425-31.
- 123. Colomb F, Krzewinski-Recchi MA, El Machhour F, et al. TNF regulates sialyl-Lewis(x) and 6-sulfo-sialyl-Lewis(x) expression in human lung through upregulation of ST3GAL4 transcript isoform BX. Biochimie. 2012 Sep;94(9):2045-53.
- 124. Carvalho AS, Harduin-Lepers A, Magalhaes A, et al. Differential expression of alpha-2,3-sialyltransferases and alpha-1,3/4-fucosyltransferases regulates the

levels of sialyl Lewis a and sialyl Lewis x in gastrointestinal carcinoma cells. Int J Biochem Cell Biol. 2009 Jan;42(1):80-9.

- 125. Becker DJ, Lowe JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. Glycobiology. 2003 Jul;13(7):41R-53R.
- 126. Weston BW, Hiller KM, Mayben JP, et al. Expression of human alpha(1,3)fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells. Cancer Res. 1999 May 1;59(9):2127-35.
- 127. Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sorensen FB, et al. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. Gut. 2005 Mar;54(3):374-84.
- 128. Colomb F, Vidal O, Bobowski M, et al. TNF induces the expression of the sialyltransferase ST3Gal IV in human bronchial mucosa via MSK1/2 protein kinases and increases FliD/sialyl-Lewis(x)-mediated adhesion of Pseudomonas aeruginosa. Biochem J. 2014 Jan 1;457(1):79-87.
- 129. Majuri ML, Niemela R, Tiisala S, Renkonen O, Renkonen R. Expression and function of alpha 2,3-sialyl- and alpha 1,3/1,4-fucosyltransferases in colon adenocarcinoma cell lines: role in synthesis of E-selectin counter-receptors. Int J Cancer. 1995 Nov 15;63(4):551-9.
- 130. Kemmner W, Roefzaad C, Haensch W, Schlag PM. Glycosyltransferase expression in human colonic tissue examined by oligonucleotide arrays. Biochim Biophys Acta. 2003 Jun 11;1621(3):272-9.
- 131. Kudo T, Ikehara Y, Togayachi A, et al. Up-regulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer. Lab Invest. 1998 Jul;78(7):797-811.
- 132. Petretti T, Kemmner W, Schulze B, Schlag PM. Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human colorectal carcinomas and liver metastases. Gut. 2000 Mar;46(3):359-66.
- 133. Yago K, Zenita K, Ginya H, et al. Expression of alpha-(1,3)-fucosyltransferases which synthesize sialyl Le(x) and sialyl Le(a), the carbohydrate ligands for E- and P-selectins,in human malignant cell lines. Cancer Res. 1993 Nov 15;53(22):5559-65.
- 134. Groux-Degroote S, Krzewinski-Recchi MA, Cazet A, et al. IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewisx epitopes in the human bronchial mucosa. Biochem J. 2008 Feb 15;410(1):213-23.
- 135. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2000;40:581-616.
- 136. Wilson W, 3rd, Pardo-Manuel de Villena F, Lyn-Cook BD, et al. Characterization of a common deletion polymorphism of the UGT2B17 gene linked to UGT2B15. Genomics. 2004 Oct;84(4):707-14.
- Liu CY, Chen PM, Chiou TJ, et al. UGT1A1*28 polymorphism predicts irinotecaninduced severe toxicities without affecting treatment outcome and survival in patients with metastatic colorectal carcinoma. Cancer. 2008 May 1;112(9):1932-40.
- 138. Aiello M, Vella N, Cannavo C, et al. Role of genetic polymorphisms and mutations in colorectal cancer therapy (Review). Mol Med Report. 2011 Mar-Apr;4(2):203-8.

- 139. Gu S, Papadopoulou N, Gehring EM, et al. Functional membrane androgen receptors in colon tumors trigger pro-apoptotic responses in vitro and reduce drastically tumor incidence in vivo. Mol Cancer. 2009;8:114.
- 140. Gu S, Papadopoulou N, Nasir O, et al. Activation of membrane androgen receptors in colon cancer inhibits the prosurvival signals Akt/bad in vitro and in vivo and blocks migration via vinculin/actin signaling. Mol Med. 2011 Jan-Feb;17(1-2):48-58.
- 141. Bernfield M, Gotte M, Park PW, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. Annu Rev Biochem. 1999;68:729-77.
- 142. Esko JD, Lindahl U. Molecular diversity of heparan sulfate. J Clin Invest. 2001 Jul;108(2):169-73.
- 143. Kamimura K, Fujise M, Villa F, et al. Drosophila heparan sulfate 6-Osulfotransferase (dHS6ST) gene. Structure, expression, and function in the formation of the tracheal system. J Biol Chem. 2001 May 18;276(20):17014-21.
- 144. Bulow HE, Hobert O. Differential sulfations and epimerization define heparan sulfate specificity in nervous system development. Neuron. 2004 Mar 4;41(5):723-36.
- 145. Habuchi H, Nagai N, Sugaya N, Atsumi F, Stevens RL, Kimata K. Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 exhibit defective heparan sulfate biosynthesis, abnormal placentation, and late embryonic lethality. J Biol Chem. 2007 May 25;282(21):15578-88.
- 146. Song K, Li Q, Peng YB, et al. Silencing of hHS6ST2 inhibits progression of pancreatic cancer through inhibition of Notch signalling. Biochem J. 2011 Jun 1;436(2):271-82.
- 147. Leong KG, Niessen K, Kulic I, et al. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. J Exp Med. 2007 Nov 26;204(12):2935-48.
- 148. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr 29;105(17):6392-7.
- 149. Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. Development. 2007 Aug;134(15):2709-18.
- 150. Qiao L, Wong BC. Role of Notch signaling in colorectal cancer. Carcinogenesis. 2009 Dec;30(12):1979-86.
- 151. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques. 1999 Jan;26(1):112-22, 24-5.
- 152. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol. 2002 Aug;29(1):23-39.
- 153. Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, et al. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? BMC Genomics. 2005;6:59.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei den Herren PD Dr. med. Johannes Lauscher, PD Dr. med. Jörn Gröne und Dr. rer. nat. Markus Berger für die Initiierung und die Möglichkeit zur Durchführung dieser Studie bedanken. Ich möchte mich bedanken für die jahrelange gute Betreuung, die konstuktive Kritik und die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Dem gesamten Team des Forschungslabors danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Sonja Sitali und Herrn Marco Arndt für die Einweisung in die Laborarbeit, die zielführende Einarbeitung in die Methodiken und für das freundliche Arbeitsklima.

Ein großes Dankeschön an meine ganze Familie, besonders meinen Eltern, die mich stets unterstüzten. Besonderer Dank kommt dabei meinem Vater zu, der in nächtelangen Diskussionen immer wieder zu einem positiven Input beisteuerte.

Eidesstattliche Versicherung

"Ich, Stefan Wonka, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Charackterisierung glykosylierungspezifischer Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe beim Kolonkarzinom" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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