

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Pathologie:

Molekularpathologie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. G. Sauter

Prävalenz und klinische Signifikanz von NRCAM Gen-Amplifikationen in humanen Ösophaguskarzinomen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Franziska Reining

aus Bremen

Hamburg

2012

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 04.07.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. O. Mann

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. J. Dierlamm

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....III

1 Einleitung 1

1.1 Das Ösophaguskarzinom..... 1

1.2 Genetik des Ösophaguskarzinoms 7

1.3 CAMs (Cell adhesion molecules)..... 9

1.4 NRCAM (Neuronal cell adhesion molecule)..... 11

1.5 Ziel der Arbeit..... 15

2 Material und Methoden..... 16

2.1 Untersuchungsmaterial 16

2.1.1 Multitumor-Array TMA (V4_Hamburg) Beschreibung..... 16

2.1.2 Ösophagus Prognose TMA 20

2.1.3 Zelllinien TMA..... 23

2.2 Methoden 30

2.2.1 Kultivierung von Bac E.-coli Klonen..... 30

2.2.2 pBac-DNA-Extraktion aus einer pBac-E.coli-Flüssigkultur 30

2.2.3 DIG-Nick-Translation zur FISH-Sondenmarkierung 32

2.2.4 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)..... 34

2.2.5 Auswertung..... 38

2.2.6 Immunhistochemie 40

2.3 Statistik..... 43

3 Ergebnisse 44

3.1 NRCAM Amplifikation in humanen Tumoren 44

3.2 NRCAM Amplifikation im Ösophaguskarzinom..... 46

3.2.1 Assoziation zum Tumorphänotyp 47

3.2.2 Bedeutung von Polysomien..... 49

3.2.3 Assoziation zur Patientenprognose 52

3.3 NRCAM Amplifikation in humanen Tumorzelllinien..... 53

3.4 NRCAM Expression 53

3.5 Vergleich der NRCAM Genkopiezahl mit der Proteinexpression 57

4 Diskussion..... 59

4.1 Identifizierung von amplifizierten Genen in humanen Tumoren..... 59

4.2 NRCAM Amplifikation in humanen Tumoren 60

4.3	NRCAM Amplifikation im Ösophaguskarzinom.....	61
5	Zusammenfassung	69
6	Literaturverzeichnis.....	70
7	Danksagung	83
8	Lebenslauf.....	84
9	Erklärung.....	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aCGH	Array-Komparative Genomische Hybridisierung
ADC	Adenokarzinom
AK	Antikörper
ALDH2	Alkoholdehydrogenase 2
Amp	Amplifikation
Anti-DIG-AK	Anti Digoxigenin-Antikörper
ATCC	American tissue culture collection
Big 1/2 (ARFGEF1/2)	ADP(Adenosindiphosphat) ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor 1/2
bp	Basenpaare (base pair)
CAM	Cell adhesion molecule (Zelladhäsions Molekül)
Cdkna2	cyclin dependent kinase 2a/p16
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEP	Centromeric probe
CHL1	Cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)
C-MYC (v-MYC)	myelocytomatosis viral oncogene homolog
COT-DNA	competitor DNA
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E. coli	Escherichia coli
EGFR	epidermal growth factor receptor gene
F11/F3 (CNTN1)	contactin 1
FISH	Fluoreszens in-situ Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Gain	Zugewinn an NRCAM-Genkopiezahl
HCL	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HER2 (v-erb-b2)	erythroblastic leucemia viral oncogen homolog
HPV	Humanes Papilloma Virus
Ig	Immunglobulin
kDa	kilo Dalton
K-RAS (v-Ki-ras)	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L1	calcium independent cell adhesion molecule L1
NaOH	Natriumhydroxid
NgCAM	neuron-glia cell adhesion molecule
NIH3T3	Mouse embryonic fibroblast cell line
NP40	Octylphenoloxypolyethoxyethanol
NRCAM	NgCAM related/ neuronal cell adhesion molecule gene
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Plattenepithelkarzinom

POL I	Polymerase 1
Poly	Polysomie
RB1 Gen	Retinoblastom 1 Gen
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RZPD	Das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
TAG 1/CNTN2)	Axonin 1/Contactin 2
TMA	tissue micro array
TOC	Tylosis Oesophageal Cancer
TP53 Gen	Tumor(suppressor Protein) 53 Gen
TWEEN	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UICC	International Union Against Cancer
WHO	World Health Organisation

1 EINLEITUNG

1.1 Das Ösophaguskarzinom

Ösophaguskarzinome sind maligne Tumore der Speiseröhre mit einer Häufigkeit von 4,5 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr in Europa (Boyle & Ferlay, 2005). Mit einer weltweiten Inzidenz von 462.117 im Jahre 2002 sind Ösophaguskarzinome die sechsthäufigste Tumorerkrankung weltweit (Kollarova *et al.*, 2007; Lambert & Hainaut, 2007). Ätiologisch und anhand ihrer Gewebedifferenzierung wird im Wesentlichen zwischen zwei Typen des Ösophaguskarzinoms unterschieden, dem Plattenepithel- und dem Adenokarzinom.

In etwa 70% der Fälle handelt es sich um **Plattenepithelkarzinome (PCA)**, welche in westlichen Ländern 2-5% aller Malignome ausmachen. Obwohl das PCA in Westeuropa und Nordamerika relativ selten ist, gehört es weltweit zu den häufigsten Tumoren (Borchard, 2001; Gore, 1997).

Rauchen und Alkoholkonsum sind die hauptsächlichen Risikofaktoren des PCA (Enzinger & Mayer 2003), wobei langjähriger leichter Konsum ein größeres Risiko birgt als kurzzeitiger, starker Konsum (Launoy *et al.*, 1997). Außerdem haben beide Noxen bei gleichzeitiger Exposition einen multiplizierenden Effekt (Castellsague *et al.*, 1999).

Die Prävalenz des Ösophaguskarzinoms ist bei Männern höher als bei Frauen (♂:♀ etwa 3:1), vermutlich aufgrund des höheren Nikotin- und Alkoholkonsums (Layke & Lopez, 2006).

Weitere Entstehungsgründe, vor allem im fernen Osten, wo die Inzidenz etwa 150 mal häufiger ist als in westlichen Ländern, sind chronische Schleimhautverletzungen durch heiße Getränke und Speisen, sowie mit Nahrungsmitteln aufgenommene Pilztoxine. Zusätzlich werden Mangelzustände an Vitamin A, Folsäure und Spurenelementen sowie schimmeliges Essen (enthält potentiell Nitrosamin) als Ursache fernöstlicher Ösophaguskarzinome diskutiert (Yu *et al.*, 1993). In Asien sind im Gegensatz zu Europa über 75% der Ösophagustumore PCA (Wu *et al.*, 2006). Über die Bedeutung von Infektionen, unter anderem mit

dem humanen Papillomavirus (HPV) gibt es widersprüchliche Berichte. In China sind 20-40% der PCA des Ösophagus HPV-positiv (He *et al.*, 1997), während das Virus in Karzinomen der westlichen Länder üblicherweise nicht nachweisbar ist (Kok *et al.*, 1997). Auch Infektionen mit *Helicobacter pylori* Bakterien werden häufig beim PCA nachgewiesen (Yao *et al.*, 2006).

Das Ösophaguskarzinom ist bekannt für seine starken geographischen, geschlechtlichen und ethnischen Unterschiede in seiner Häufigkeit. Gründe für Hochrisikogebiete wie Nordchina, dem Iran oder ethnische Risikogruppen, wie die schwarze Bevölkerung Amerikas, werden immer wieder untersucht, scheinen multifaktoriell bedingt zu sein und mit zahlreichen unterschiedlichen ätiologischen Faktoren zusammenzuhängen (Brown, 2000; Pickens & Orringer, 2003; Zhang *et al.*, 2004).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt unabhängig von Geschlecht und geographischen Unterschieden bei etwa 55-60 Jahren (Robert Koch-Institut (Hrsg), 2008). Die oft erwähnte mechanische oder entzündliche Reizung des Plattenepithels im Rahmen von Verätzungen, Strahlentherapien, Plummer-Vinson Syndrom (Schleimhautschädigung aufgrund von Eisenmangel) oder bei Achalasie ist als Präkanzerose vermutlich nur für einen kleinen Anteil der Ösophaguskarzinome verantwortlich.

Eine wiederum mindestens 90%-ige Wahrscheinlichkeit, ein PCA des Ösophagus im Laufe des Lebens zu entwickeln, besteht bei der autosomal dominant vererbaren Tylosis (Marger & Marger, 1993). Diese hereditäre Erkrankung führt unter anderem zur Hyperkeratose von Handflächen und Fußsohlen und Betroffene sollten frühzeitig auf Neoplasien des Ösophagus untersucht werden (Messmann, 2001).

Ein stark erhöhtes Risiko haben Patienten mit bereits bestehenden Kopf-Hals-Tumoren (Muto *et al.*, 2002) unabhängig vom Trinkverhalten, wobei nach Rossini Kopf-Hals-Tumoren auch gerade wegen des damit assoziierten vermehrten Zigaretten- und Alkoholkonsums in engem Zusammenhang mit dem Ösophaguskarzinom stehen (Rossini *et al.*, 2008). Auch andersherum gesehen sind bereits bestehende Primärtumore des Ösophagus wiederum ein Risikofaktor für einen zweiten Primärtumor des Kopf-Hals-Bereiches, der Lunge, des Magens

und der Schilddrüse. Grund für diese multiple Tumorentstehung sind wiederum die gemeinsamen Risikofaktoren (Chuang *et al.*, 2008).

Prädilektionsstellen für die Lokalisation des PCA sind die drei physiologischen Engen des Ösophagus (oberer Ösophagusmund, Höhe der Trachealbifurkation und Kardiabereich) (Rösch, 2001).

Bei etwa 30% der Ösophaguskarzinome handelt es sich um **Adenokarzinome (ADC)** mit drüsenartiger Differenzierung. Diese sind typischerweise im unteren Drittel des Ösophagus lokalisiert und kommen überwiegend bei der weißen, männlichen Bevölkerung der westlichen Industriestaaten vor (Cook *et al.*, 2005; Cummings & Cooper, 2008). Das Adenokarzinom zeigt in diesen Staaten eine bemerkenswerte Steigerung der Inzidenz bei Männern sowie Frauen (Brown *et al.*, 2008; Devesa *et al.*, 1998; Stein & Siewert, 1993), während die Inzidenz des PCA eine rückläufige Tendenz hat (Pera *et al.*, 2005; Raja *et al.*, 2001). In der industrialisierten Welt sind aktuell beide Tumorformen gleich häufig (Enzinger & Mayer, 2003). Der wichtigste ätiologische Faktor ist die Refluxösophagitis, die zu einer chronischen Zylinderepithelmetaplasie (Barrett-Syndrom), der häufigsten Vorläufererkrankung des ADC, führt (Rogers *et al.*, 1986). Hierbei ist die genetische Instabilität der Barrett-Schleimhaut, auf die später noch genauer eingegangen wird (S.7), von pathogenetischer Bedeutung.

Die Steigerung der Inzidenz in den Industriestaaten hängt wahrscheinlich mit den dort vorherrschenden Risikofaktoren für die Entwicklung eines gastroösophagealen Refluxes zusammen, der wiederum zur Ösophagitis mit konsekutiver Metaplasie (und Ausbildung eines Barrett-Ösophagus) und schließlich zum ADC führen kann.

Risikofaktoren für eine Refluxösophagitis und somit für die Entwicklung eines ADC sind zum Beispiel Übergewicht mit Erhöhung des abdominellen Drucks (El-Serag, 2008; Mercer *et al.*, 1987) sowie Hiatushernien, welche den Druck des unteren Ösophagussphinkters herabsetzen und damit zu vermehrtem Reflux von saurem Magensaft in den Ösophagus beitragen (Gordon *et al.*, 2004). Bei bestehender Barrett-Schleimhaut ist das Risiko, ein ADC zu entwickeln 100 bis 150-fach erhöht und das Risiko, dass sich die Metaplasie in eine Dysplasie umwandelt liegt bei etwa 0,5% pro Jahr (Schuchert & Luketich, 2007).

Symptome des Ösophaguskarzinoms treten meistens erst in fortgeschrittenen Tumorstadien auf. Aufgrund des fehlenden Serosaüberzugs des Ösophagus metastasiert der Tumor sehr schnell lymphogen und wird oft erst nach fortgeschrittener Metastasierung entdeckt. Daher sind Patienten, die mit typischen Schluckbeschwerden oder -schmerzen ärztliche Hilfe aufsuchen, oft nicht mehr kurativ zu behandeln. Es ist daher wichtig bei möglichen Anzeichen wie Schluckbeschwerden, Gewichtsabnahme, retrosternalen Schmerzen oder Regurgitation von Speisen sofort diagnostische Maßnahmen einzuleiten (H. Renz-Polster, 2004).

Die Diagnose wird infolge einer endoskopisch entnommenen Biopsie gestellt. Vorher kann durch Färbung mit Lugolscher Lösung, wobei entartetes Gewebe sich nicht anfärbt, oder mit Hilfe von Bürstenzytologien frühzeitig eine Dysplasie entdeckt werden (Nabeya *et al.*, 1990). Ausgesprochen wichtig bei der Diagnosestellung und der darauf folgenden Therapieplanung ist das „Staging“ des Tumors. Dies bedeutet, dass der Tumor nach festgelegten Kriterien der UICC (International Union Against Cancer) nach Tumorausdehnung und Nachweis von Metastasen in bestimmte Stadien eingeteilt wird. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht dieser Einteilung.

Tabelle 1.1.: TNM-Klassifikation

(WHO Classification of Tumours of the Digestive System, Pathology and Genetics, 2006)

<u>T = Primärtumor</u>	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein nachweisbarer Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ (Tumor wächst nicht über die Basalmembran hinaus)
T1	Tumor dringt in die Lamina propria und submukosa (Schleimhautschichten) ein
T2	Tumorausdehnung bis in die muscularis propria (Muskelschicht)
T3	Tumorausdehnung bis in die Adventitia
T4	Tumorausbreitung in angrenzende Strukturen
<u>N = Regionale Lymphknoten</u>	
NX	Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Kein Lymphknotenbefall
N1	regionärer Lymphknotenbefall
<u>M = Fernmetastasen</u>	
MX	Metastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Metastasen
M1	Nachweis von Metastasen
M1a	Lymphknotenmetastasen (Hals- oder abdominelle Lymphknoten)
M1b	andere Fernmetastasen

Durch diese Einteilung kann die Gruppe von Patienten identifiziert werden, welche potenziell von einer Therapie mit kurativem Ansatz profitiert. Hierbei würde als Therapiestandard eine vollständige operative Tumorentfernung vorgenommen werden (Ösophagektomie) (Low *et al.*, 2007). Diese Operation ist sehr komplikations- und risikoreich mit einer etwa 11-14%-igen Mortalität in den ersten 30 postoperativen Tagen (Ra *et al.*, 2008; Steyerberg *et al.*, 2006). Daher sollte diese Operation nur bei Aussicht auf Heilung eines nicht metastasierenden Tumors und individuell auf die Risikoparameter des Patienten abgestimmt vorgenommen werden. Patienten mit einem lokal begrenzten Tumor, deren körperliche Verfassung zu schlecht für eine solche Operation ist, profitieren

teilweise von einer endoskopischen Resektion (Greenstein *et al.*, 2008). Weitere multimodale Therapieansätze, wie die kombinierte Radio-Chemotherapie, scheinen Überlebensvorteile zu bringen, sind aber noch nicht ausreichend validiert und daher nicht als Therapiestandard anzusehen (Agranovich *et al.*, 2008). Beim Adenokarzinom soll eine präoperative Chemotherapie von Nutzen sein. Weiterhin ist bekannt, dass die kombinierte Radio-Chemotherapie der alleinigen Strahlentherapie überlegen ist (Stahl & Oliveira, 2008).

Der größere Anteil der Patienten mit schon metastasierten Karzinomen wird palliativ behandelt. Dabei steht die Wiederherstellung des meist eingeschränkten Schluckaktes (z.B durch Einlage von Stents) und die Behandlung von Komplikationen im Vordergrund. Da Bestrahlung oder Chemotherapie das Überleben in diesen Fällen nicht bewiesenermaßen verlängern, orientiert sich das Ziel der palliativen Therapie an der Verbesserung der Lebensqualität der Patienten (Bergquist *et al.*, 2008). In einigen Fällen kann eine präoperative Radiochemotherapie den Tumor erfolgreich verkleinern (Takeda *et al.*, 2007), so dass auch bei fortgeschrittenen Tumorstadien eine folgende operative Entfernung möglich ist. Es wird noch diskutiert, ob in diesem Fall die zwar schlechter ansprechende alleinige Chemotherapie komplikationsärmer ist als die kombinierte Radiochemotherapie, die insgesamt ein längeres Überleben bewirkt (Luu *et al.*, 2008).

Die Prognose des Ösophaguskarzinoms ist insgesamt ausgesprochen schlecht. Sie ist stark abhängig vom Ausmaß des Tumors (T-Stadium der TNM Klassifikation), dem Vorhandensein von Lymphknoten- oder Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnose, der durchgeführten Therapie sowie des Allgemeinzustandes des Patienten (Wilson *et al.*, 2008). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt nach Operation und Chemotherapie bei etwa 25-35% (Chao *et al.*, 2008; D'Journo *et al.*, 2008). Bei weniger fortgeschrittenen Karzinomen (pT1) liegt sie zwischen 60% (für das PCA) und 80% (für das ADC) (Holscher *et al.*, 1995). Die gesamte 5-Jahres Überlebensrate liegt bei etwa 14% (Gallo & Cha, 2006). Bei nicht operablen Tumoren, die palliativ (Besharat *et al.*, 2008) oder nur mit Chemotherapie (Chao *et al.*, 2008) behandelt wurden, liegt die mittlere Überlebenszeit zwischen 5 und 18 Monaten.

1.2 Genetik des Ösophaguskarzinoms

Das Ösophaguskarzinom, genauso wie andere Tumoren, entsteht sporadisch mit großer Wahrscheinlichkeit durch genetische Veränderungen. Es kann aus einer einzelnen maligne entarteten Zelle entstehen (klonales Wachstum), wobei die Malignität von der Mutter- zur Tochterzelle weitergegeben wird und somit genetisch fixiert ist (Wagener, 1999). Hierbei reicht nach dem Modell der „Mehrschritt-Karzinogenese“ eine einzige Mutation nicht aus. Diese kann dem Zellklon jedoch einen Überlebensvorteil bringen und es kann zu weiteren Mutationen kommen, die schließlich Schritt für Schritt (Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz) (Werner *et al.*, 1999; Atherfold *et al.*, 2006) zur vollen Ausprägung der Malignität führen. Dies erklärt auch das häufige Vorkommen vieler Tumoren mit zunehmendem Alter durch eine Anhäufung verschiedener Mutationen. Dieses trifft auch für das Ösophaguskarzinom zu.

Zu Veränderungen auf DNA-Ebene können auch bestimmte Umwelteinflüsse wie z. B. Strahlung, chemische Substanzen oder Viren führen, die somit für Tumorwachstum verantwortlich sein können. Teilweise können diese Veränderungen von DNA-Reparaturmechanismen korrigiert werden. Sind diese jedoch gestört, kommt es wiederum zu einer erhöhten Mutationsrate (Wagener, 1999). Ein weiterer Grund für das Vorliegen von DNA Veränderungen sind genetische Prädispositionen, die zum Auftreten von familiären (erblichen Tumoren) führen können. Im Falle des Ösophaguskarzinoms liegt eine Assoziation mit der autosomal dominant vererbten Tylosis vor. In drei betroffenen Familien wurde ein genetischer Defekt im sogenannten TOC Gen „Tylosis Oesophageal Cancer Gene“ auf Chromosom 17q23 gefunden (Kelsell *et al.*, 1996). Hierbei wird der Funktionsverlust des TOC Gens, das aus der Keratin Genfamilie stammt und wahrscheinlich zu Strukturveränderungen mit Integritätsminderung des Ösophagusplattenepithels führt, für die resultierende Tumorentstehungsanfälligkeit verantwortlich gemacht (Risk *et al.*, 1994). Abgesehen von der vergleichbar kleinen Gruppe der Tylosis Erkrankten konnte auch in der Allgemeinbevölkerung eine Assoziation zwischen der Region des TOC Gens und dem Ösophaguskarzinom nachgewiesen werden (von Brevern *et al.*, 1998).

Tumore können durch Aktivierung und Inaktivierung verschiedener Gene entstehen (Wagener, 1999) und sind im Allgemeinen durch genetische Instabilität auf chromosomaler oder Nukleotidebene gekennzeichnet (Lengauer *et al.*, 1998) auf welche im Folgenden noch genauer eingegangen wird.

Die Veränderungen der DNA werden in verschiedene Mutationsformen eingeteilt. Sind ganze Chromosomen oder Chromosomenabschnitte von Mutationen betroffen, spricht man von Chromosomenmutationen, wobei es häufiger zu Chromosomenbrüchen kommt als zu einer Veränderungen der Chromosomenzahl. Es kann auch zum Austausch von Chromosomenabschnitten kommen, Translokation genannt, wobei Gene verloren gehen (Deletion), mit anderen fusionieren oder in einer anderen Umgebung verstärkt oder vermindert exprimiert werden. Diese Chromosomenbruchstellen sind daher für die Krebsforschung von großem Interesse.

Der Austausch einer einzelnen Base gegen eine andere wird als Punktmutation bezeichnet. Unter einer Deletion versteht man den Verlust einer oder mehrerer Basen. Den zusätzlichen Einbau einer Base hingegen nennt man Insertion. Wird ein Gen oder eine kodierende Sequenz eines Gens verdoppelt, spricht man von einer Duplikation. Bei einer Amplifikation sind multiple Kopien eines Gens oder einer Chromosomensequenz hintereinandergeschaltet (Wagener, 1999).

Heute ist eine Vielzahl von Genen bekannt, die an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind. Diese können sowohl durch verstärkte Aktivierung (Onkogene) als auch durch Inaktivierung ihrer Funktion (Tumorsuppressorgene) im Rahmen von Mutationen zur Tumorgenese führen. Bekannte Tumorsuppressorgene sind das TP53 Gen oder das Retinoblastoma (RB 1 Gen).

Ein Beispiel für in humanen Tumoren amplifizierte Onkogene ist das ERBB2 (HER2) beim Mammakarzinom (Slamon *et al.*, 1989). Aktivierende K-RAS Mutationen sind beispielsweise die Ursache für eine Resistenz gegen Tyrosinkinase-Inhibitoren (Cappuzzo *et al.*, 2008; Lievre *et al.*, 2006). Gegen das amplifizierte ERBB2 Gen gibt es bereits therapeutische Interventionsmöglichkeiten mit dem monoklonalen anti-HER2 Antikörper Trastuzumab (Albanell & Baselga, 1999; Tokuda, 2003) welcher die tumorbiologische Bedeutung von Genamplifikationen in Tumoren unterstreicht.

Mutationen oder chromosomale Deletionen mit Verlust der Tumorsuppressoraktivität des TP53 Gens sind in einem hohen Prozentsatz der Ösophaguskarzinome nachweisbar und gelten als frühe molekulare Veränderungen (Bennett *et al.*, 1997; Montesano *et al.*, 1996b). Das heißt, dass auch das Ösophaguskarzinom erst durch die Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen entsteht (Werner *et al.*, 1999).

An der Entwicklung der Ösophagusschleimhaut zum Adenom und schließlich zum Karzinom sind beispielsweise Amplifikationen der Onkogene C-MYC und Cyclin D1 (CCND1), Deletionen der Tumorsuppressorgene RB, APC, DCC und PT53 sowie der Verlust eines Allels der Chromosomen 3p, 5q, 9p, 9q, 17p, 17q oder 18q beteiligt (Montesano *et al.*, 1996a; Raja *et al.*, 2001). Da chromosomale Abberationen (z.B. die Amplifikation der Gene C-MYC und EGFR) in niedriger Anzahl auch in gesunder Schleimhaut vorkommen und typischerweise bei einer Dysplasie zunehmen, könnten diese in Zukunft nicht nur als diagnostischer, sondern auch als prognostischer Marker von Nutzen sein (Rygiel *et al.*, 2008).

Weiterhin ist beim Ösophagus PCA (Ito *et al.*, 2007) sowie ADC (Koppert *et al.*, 2005) häufig das CDKNA2 (p16) Tumorsuppressorgen durch Hypermethylierung des p16 Promoters inaktiviert (Klump *et al.*, 1998). Der daraus resultierende Verlust der Cdkna2 Expression unterstützt das Tumorwachstum und ist beim Plattenepithelkarzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert (Fujiwara *et al.*, 2008).

Bei japanischen Alkoholabhängigen wird das Vorhandensein der heterozygot inaktiven Form der Alkoholdehydrogenase-2 (ALDH2) mit dem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus sowie mit vermehrten Tumoren des oberen Verdauungstraktes in Verbindung gebracht (Yokoyama *et al.*, 2008).

1.3 CAMs (Cell adhesion molecules)

NRCAM (NgCAM related cell adhesion molecule) kodiert für ein neuronales Zelladhäsionsprotein, welches zur Immunglobulin(Ig)-Superfamilie gehört. Neuronale Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie spielen eine wichtige Rolle

bei der Entwicklung des Nervensystems und dienen als Führungsschiene sowie als Rezeptoren für Neurone und ihre Axone (Wang *et al.*, 1998).

Man kann die Mitglieder der Ig-Superfamilie auf Grund ihrer Struktur und Sequenz in zwei Gruppen einteilen. NRCAM gehört zusammen mit L1, NgCAM (neuron-glia cell adhesion molecule), Chl1 (close homolog of L1), Neuroglian und Neurofascin zur L1 Familie. Die andere Gruppe wird durch F3/F11, TAG-1/Axonin-1, Big-1 und Big-2 gebildet. Diese Zelloberflächen-Glykoproteine bestehen aus Immunglobulin-ähnlichen Domänen sowie Fibronectin-Typ-III-homologen Domänen und sind in der Zellmembran entweder durch eine Transmembrandomäne (L1-Gruppe) oder einen Phosphatidylinositolanker (F11 Gruppe) verankert. Auf der zytoplasmatischen Seite besitzen sie eine in ihrer Sequenz hochkonservierte Domäne. (Brummendorf & Rathjen, 1996; Brummendorf & Rathjen, 1993).

An der Zelloberfläche können die Mitglieder der Ig-Superfamilie eine Reihe von homophilen als auch heterophilen Wechselwirkungen mit Mitgliedern der gleichen Familie, anderen CAMs oder Proteinen der extrazellulären Matrix eingehen (Morales *et al.*, 1993; Mauro *et al.*, 1992).

Zelladhäsionsmoleküle wie Cadherine und Integrine werden häufig in Zusammenhang mit maligner Progression diskutiert. Die Dysregulation von Zelladhäsionsmolekülen, beispielsweise in entdifferenziertem Tumorgewebe, kann dazu führen, dass geordnete Gewebsstrukturen verloren gehen und sich außerdem Tumorzellen aus dem Gewebsverband lösen (Stallmach *et al.*, 1992; Wagener, 1999).

Um daraufhin bindegewebige Strukturen zu infiltrieren, wird wiederum die Expression von Adhäsionsmolekülen benötigt, die an Bestandteile der extrazellulären Matrix binden. Weiterhin vermitteln sie die Bindung von Zellmembranrezeptoren lymphogen metastasierender Tumorzellen an Liganden der Lymphgefäße. Die Ausbildung von Fernmetastasen kann durch Bindung hämatogen metastasierender Tumorzellen über Adhäsionsmoleküle an Endothelzellen und die endotheliale Basalmembran ermöglicht werden (Wagener, 1999).

Inwiefern Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie unter den Adhäsionsmolekülen an maligner Progression beteiligt sind, wird noch diskutiert. Eine ursächliche Beteiligung an der Tumorprogression wurde bei den Adhäsionsmolekülen C-CAM (Cell-Cell Adhesion Molecule) und M-CAM (Melanoma Cell Adhesion Molecule) festgestellt (Johnson, 1991). Die Herabregulation der Expression von C-CAM um 10% der mRNA Konzentration konnte in der Hälfte der untersuchten humanen Kolonkarzinome im Vergleich zur angrenzenden Normalschleimhaut gefunden werden. In einem weiteren Drittel der Tumore betrug die C-CAM mRNA Konzentration weniger als die Hälfte (Kleinerman *et al.*, 1995; Neumaier *et al.*, 1993). Auch in der Mehrzahl der Prostatakarzinome ist die Expression von C-Cam vermindert und scheint somit als Tumorsuppressorgen zu wirken (Kleinerman *et al.*, 1995).

Ein Zusammenhang zwischen der Expression vom Adhäsionsmolekül M-Cam und der Eindringtiefe von malignen Melanomen in die Dermis wurde von (Natali *et al.*, 1997) beschrieben.

CAMs im Allgemeinen sind laut (Beckman, 2006) in beinahe jedem untersuchten Tumortyp exprimiert und führen dort auf verschiedenen Wegen zu Metastasierung. Seiner Ansicht nach besitzen sie also eine onkogene Wirkung. Glücklicherweise scheint eine antikörperbasierte Blockierung von CAMs eine vielversprechende Therapiestrategie zu sein, da z.B. in tumortragenden Mäusen (Ovarialkarzinome) eine Tumorreduktion durch L1-Antikörper bewirkt werden konnte. Vergleichbar konnte das Wachstum und die invasiven Fähigkeiten von Brustkrebszellkulturen durch eine Blockierung der EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) Proteinproduktion reduziert werden (Beckman, 2006).

1.4 **NRCAM**

NRCAM wurde 1990 zuerst in den optischen Fasern der Retina des Huhns beschrieben und Bravo genannt (de la Rosa *et al.*, 1990). 1991 wurde es bei der Klonierung von Huhn-NgCAM auf Grund seiner fast identischen Aminosäuresequenz entdeckt. Seitdem wird von seiner cDNA Struktur unter dem Namen NRCAM berichtet (Grumet *et al.*, 1991).

Das etwa 220kDa schwere Transmembranprotein NRCAM enthält sechs Ig-ähnliche und fünf Fibronectin-III extrazelluläre Domänen sowie eine transmembranöse Domäne verbunden mit einer hochkonservierten zytoplasmatischen Sequenz (Gorka *et al.*, 2007; Kayyem *et al.*, 1992). Alternatives Spleißen ergab viele Transkriptionsvarianten, die für verschiedene Isoformen kodieren, deren Funktion noch weiter geklärt werden soll (Davis *et al.*, 1996).

Es wurden hochkonservierte Homologe des Huhn-NRCAM bei Mensch (Lane *et al.*, 1996) und Ratte (Davis *et al.*, 1996) erstellt, deren Aminosäuresequenz besonders in der zytoplasmatischen Region bis zu 80% identisch mit der des Huhns waren.

Nachdem Grumet 1991 sowie Lane 1996 zuerst vermuteten, dass NRCAM ausschließlich im Nervensystem exprimiert wird, fanden (Wang *et al.*, 1998) heraus, dass es auch von vielen nicht neuronalen Geweben wie Plazenta, Pankreas und Nebennieren exprimiert wird. Der größte Anteil der NRCAM Expression betrifft jedoch das Nervensystem und variiert während dessen Entwicklung, wobei sie in den ersten Embryonaltagen am stärksten ist (Denburg *et al.*, 1995; Grumet *et al.*, 1991).

Studien über Endothelzellgene, deren Differenzierung und Beteiligung an der Angiogenese ergaben, dass NRCAM wesentlich an der directionalen Migration der Sprouting Phase des Gefäßwachstums beteiligt ist (Glienke *et al.*, 2000). Da die Angiogenese eine große Rolle in der Wundheilung, im Tumorwachstum und vor allem in der Embryonalentwicklung spielt, erklärt dies die Hochregulierung der NRCAM Expression während dieser Entwicklungsphase (Aitkenhead *et al.*, 2002).

(Davis *et al.*, 1996) untersuchten genauso wie (Lambert *et al.*, 1997) die Funktion von NRCAM in Ranvierschen Schnürringen, da es dort vermehrt exprimiert wird. Ranviersche Schnürringe sind Unterbrechungen der Myelinschicht aus Gliazellen in axonalen Membranen, die zur schnelleren Weiterleitung von Aktionspotenzialen dienen. In diesen Unterbrechungen der Myelinschicht befinden sich Multiproteinkomplexe, zusammengesetzt aus spannungsabhängigen Natrium Kanälen, Adhäsionsmolekülen wie NRCAM und Neurofascin, Zytoskelet assoziierten Proteinen wie Ankyrin G und B, beta Spectrin und Weiteren (Martin *et al.*, 2008). Hierbei interagiert die beta 1 Untereinheit der Natriumkanäle

näle mit Contactin, Neurofascin und NRCAM, wodurch der gesamte Komplex stabilisiert wird (McEwen & Isom, 2004). NRCAM sowie Ankyrin B (Dzhashvili *et al.*, 2007) und vor allem Neurofascin (Hedstrom *et al.*, 2007) sind für den Zusammenbau der Multiproteinkomplexe nötig. NRCAM scheint diesen Vorgang zu beschleunigen, da im Falle einer NRCAM Deletion der Zusammenbau verlangsamt abläuft (Custer *et al.*, 2003). Ein wichtiger Ligand, der zwischen Schwannzellen, NRCAM und Neurofascin vermittelt, ist Gliomedin, das von den Mikrovilli in der Schwannzellspitze exprimiert wird (Maertens *et al.*, 2007). Lösliches Gliomedin bindet mit seinem N-terminalen Ende NRCAM und Neurofascin und erleichtert damit die für den Aufbau der Komplexe nötige Anreicherung von Natriumkanälen und CAMs in den Schnürrigen (Eshed *et al.*, 2007) (Eshed *et al.*, 2005).

Der Zusammenhang zwischen NRCAM und Autismus, einer unheilbaren frühkindlichen Entwicklungsstörung des Gehirns verbunden mit Wahrnehmungs- und Informationsverarbeitungsstörungen, ist sehr strittig. Genetische Veränderungen spielen bei der Entstehung von Autismus bekanntlich eine große Rolle (Hutcheson *et al.*, 2004). Auf Chromosom 7q31 wurde ein verdächtiger Genlocus gefunden und da NRCAM im Gehirn exprimiert wird und an der Nervensystementwicklung beteiligt ist, könnte es an der Krankheitsentstehung beteiligt sein. (Hutcheson *et al.*, 2004) jedoch konnten bei Untersuchungen der Expression der 4 Genkandidaten NRCAM, LAMB1, LRRN3 und KIA0716 auf 7q31 keinen signifikanten Zusammenhang zum Autismus finden. Lediglich bei Varianten von LAMB1 konnte eine jedoch statistisch nicht signifikante Assoziation hergestellt werden. (Bonora *et al.*, 2005) wiederum stellten bei einer Mutationsanalyse von 6 Genen auf 7q31 eine Verbindung zwischen Autismus und einer veränderten Expression von NRCAM und Lamb1 her.

(Sakurai *et al.*, 2006) wollten die vorherigen Assoziationen von NRCAM Polymorphismen mit Autismus in einer größeren Kohorte nachprüfen. Die Untersuchungen konnten den vermuteten Zusammenhang nicht bestätigen. Eine spätere Studie von (Marui *et al.*, 2008) ergab wiederum, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen einzelnen Nukleotid Polymorphismen (SNPs) von NRCAM und Autismus besteht.

Eine Verbindung zwischen einer Prädisposition für Drogenmissbrauch und verschiedenen NRCAM Varianten sowie dessen Expression beobachteten (Ishiguro *et al.*, 2006) zuerst an einem Tiermodell. NRCAM wird laut dieser Studie in Neuronen exprimiert, die eine Rolle bei Belohnung und Erinnerung spielen. NRCAM-Knockout Mäuse zeigten eine reduzierte Opiat- und Aufputschmittel-konditionierte Ortsbevorzugung.

Auch (Uhl, 2006) ist überzeugt, dass genetische Veränderungen in Gehirnregionen, verantwortlich für Gedächtnisfunktion und Kognition, einen großen Beitrag zur Abhängigkeitsvulnerabilität leisten. Da NRCAM gemäß dem Autor diese Gehirnfunktionen beeinflusst, könnte dessen genetische Veränderung eine Auswirkung auf Abhängigkeitserkrankungen haben.

2008 greift Ishiguro die Belohnungseffektveränderungen am Tiermodell von NRCAM-veränderten Mäusen wieder auf und bestätigt den Effekt von NRCAM auf die Abhängigkeitsanfälligkeit. Ein Zusammenhang zum Alkoholabusus in einer Gruppe von 1.599 Japanern konnte in dieser Studie jedoch nicht hergestellt werden (Ishiguro *et al.*, 2008).

Auch zur Beteiligung von NRCAM an maligner Progression verschiedenster Tumoren gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen. Dazu zählen unter anderem Studien zu Pankreas-Karzinomen (Dhodapkar *et al.*, 2001), kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Taniwaki *et al.*, 2006), Rhabdomyosarkomen (Lae *et al.*, 2007), Ependymomen (Lukashova-v Zangen *et al.*, 2007), Schilddrüsenkarzinomen (Gorka *et al.*, 2007), Glioblastomen und Astrozytomen (Sehgal *et al.*, 1998; Sehgal *et al.*, 1999). Zum Beispiel in einer Studie am Ependymom wurde die Überexpression von NRCAM mit einer schlechteren Prognose und erhöhten Tumorproliferationsrate assoziiert (Lukashova-v Zangen *et al.*, 2007).

1.5 Ziel der Arbeit

Am Institut für Pathologie wurden Zelllinien und Primärtumoren verschiedener humaner Tumortypen aCGH (*array comparative genomic hybridization*) auf DNA-Kopiezahlveränderungen untersucht. Im Zuge dieser Analysen wurde bei einem Ösophaguskarzinom ein Amplikon auf Chromosom 7q31 detektiert, welches unter anderem das Gen für das Adhäsionsmolekül NRCAM enthielt. Dieser Befund eröffnet die Möglichkeit, dass eine Therapie gegen NRCAM auch im Ösophagus-Karzinom erfolgreich sein könnte, sofern NRCAM in diesem Tumortyp eine tumorbiologisch relevante Rolle spielt.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Häufigkeit von NRCAM Amplifikationen im Ösophaguskarzinom und auch anderen häufigen humanen Tumortypen zu vergleichen und speziell die klinische Relevanz von NRCAM im Ösophaguskarzinom zu untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsmaterial

2.1.1 Multitumor-Array TMA (V4_Hamburg) Beschreibung

Dieser TMA besteht aus 3.981 Tumor- und 600 Kontrollgeweben, die auf 8 TMA Objektträger (Slide A-H) verteilt gestanzt wurden.

Das Tumorgewebe wurde in 4%-iger Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Außer des histologischen Tumorstadiums wurden keine weiteren klinisch-pathologischen Daten erhoben. Die Zusammenstellung des Multitumor-Arrays ist in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1:

Multitumor (TMA), Zusammenstellung an Tumoren

Tumortyp	N (Slide A)
Seminom	45
Nierenzellkarzinom, chromophob	56
Nierenzellkarzinom, klarzellig	68
Nierenzellkarzinom, papillär	31
Nierenzellkarzinom, andere	9
Onkozytom	62
Penis-Karzinom	46
Prostata-Karzinom	63
Seminom	92
Teratom	60

Tumortyp	N (Slide B)
Analkarzinom	18
Colon-Adenom, hochgradige Dysplasie	40
Colon-Adenom, geringgradige Dysplasie	56
Colon-Adenokarzinom	60
Dünndarmkarzinom	22
Hepatozelluläres Karzinom	55
Karzinoid	40
Magen, diffuses Adenokarzinom	56
Magen, intestinales Adenokarzinom	62

Oesophagus, Adenokarzinom	60
Oesophagus, Plattenepithelkarzinom	60

Tumortyp	N (Slide C)
Astrozytom	48
Ependymom	10
Larynx, Plattenepithelkarzinom	57
Medulloblastom	4
Mundhöhle, Plattenepithelkarzinom	54
Neuroblastom	51
Oligodendrogliom	28
Schilddrüse, Adenom	65
Schilddrüse, anaplastisches Karzinom	3
Schilddrüse, follikuläres Karzinom	47
Schilddrüse, medulläres Karzinom	28
Schilddrüsenkarzinom, papillär	54
Thymom	57
Lymphoepitheliales Karzinom	5

Tumortyp	N (Slide D)
Basaliom	67
Benigner Naevus	59
Haut, Plattenepithelkarzinom	51
Malignes Melanom	37
Merkelzellkarzinom	6
Nebenniere, Adenom	21
Nebenniere, Karzinom	8
Paragangliom	36
Phäochromozytom	64
Pilomatrixom	48
Urothel, Karzinom, (Ta)	62
Urothel, Karzinom, (T2-4)	60
Urothel, Karzinom, andere	10

Tumortyp	N (Slide E)
Gallenblase, Adenokarzinom	30
Großzelliges Bronchialkarzinom	48
Kleinzelliges Bronchialkarzinom	15
Lunge, Adenokarzinom	71
Lunge, Plattenepithelkarzinom	59
Bronchoalveoläres Karzinom	15
Mesotheliom	28
Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	14
Pankreas, papilläres Adenokarzinom	29
Pankreas, duktales Adenokarzinom	56

Pankreas, neuroendokrines Karzinom	20
Riesenzell-Sehnenscheiden-Karzinom	40
Hodgkin Lymphom	43
Non-Hodkin Lymphom	9

Tumortyp	N (Slide F)
Angiosarkom	7
Basalzelladenom der Speicheldrüse	37
Chondrosarkom	5
Dermatofibrosarkom protuberans	5
Desmoid Tumor	9
Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	46
Granularzelltumor	8
Hämangioperizytom	7
Leiomyom	27
Leiomyosarkom	28
Liposarkom	16
Malignes fibröses Histiocytom	25
Mukoepidermoid-Karzinom	46
Neurofibrom	60
Pleomorphes Adenom der Ohrspeicheldrüse	61
Warthin Tumor	57
Malignes Schwannom	14

Tumortyp	N (Slide G)
Endometrium, endometrioides Karzinom	60
Endometrium, seröses Karzinom	58
Ovar, Brenner Tumor	45
Ovar, endometrioides Karzinom	22
Ovar, muzinöses Karzinom	46
Ovar, seröses Karzinom	63
Vagina, Plattenepithelkarzinom	22
Vulva, Plattenepithelkarzinom	61
Zervix, Adenokarzinom	48
Zervix, Plattenepithelkarzinom	63
Zervix, adenosquamöses Mischkarzinom	3

Tumortyp	N (Slide H)
Karziносarkom	38
Mamma, apokrines Karzinom	17
Mamma, duktales Karzinom	62
Mamma, kribriiformes Karzinom	26
Mamma, lobuläres Karzinom	65
Mamma, medulläres Karzinom	64
Mamma, muzinöses Karzinom	61

Mamma, phylloides Karzinom	48
Mamma, tubuläres Karzinom	60
Uterus, Stromasarkom	13

2.1.2 Ösophagus Prognose TMA

Der Ösophagusarray besteht aus einem Paraffinblock in den 560 Gewebeproben in Form von 0,6mm durchmessenden Gewebezylindern eingebracht wurden.

Diese Gewebeproben setzen sich aus 298 primären Ösophagustumoren, 146 dazugehörigen Lymphknoten-, 47 Fernmetastasen und einem Kontrollbereich bestehend aus 68 Gewebeproben zusammen. Der Kontrollbereich enthält 40 Tumore anderer Organe, 10 gesunde Ösophagusgewebe und 18 verschiedene andere gesunde Gewebe und wird für immunhistochemische Färbungen zur Qualitätskontrolle genutzt.

Alle Proben der für diesen Array verwendeten Primärtumoren und zugehörigen Metastasen wurden 298 Patienten, die sich einer Ösophagektomie in der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unterzogen, in einem Zeitraum zwischen 1992 und 2004 entnommen. (Bei einem Patienten wurde eine alleinige Mukosektomie vorgenommen). Die Patienten hatten zum Zeitpunkt der Resektion ein mittleres Alter von 62 Jahren (mit einer Spannweite zwischen 34 und 92 Jahren).

Die Überlebensdaten der Patienten wurden von der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Klinikums Hamburg-Eppendorf durch regelmäßig dokumentierte Nachuntersuchungen generiert. Die Patienten wurden in einem mittleren Zeitraum von 23,15 Monaten nachuntersucht (zwischen 1 und 142 Monaten).

Das für den Array verwendete Material wurde in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte aller Tumoren wurden von zwei Pathologen nach einheitlichen Kriterien beurteilt und entsprechend ihres histologischen Typs sowie Differenzierungsgrades eingeteilt. Das Tumorstadium sowie der Nodal- und Metastasenstatus entsprechend der UICC- und WHO Klassifikationen wurde den Befunden des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf entnommen.

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die Zusammensetzung des TMA.

Tabelle 2.2:

Ösophagus-TMA; Zusammensetzung der Gewebeproben des Arrays

Alle Gewebeproben		n=560
Histologie	Adenokarzinom	129
	Plattenepithelkarzinom	163
	Adenosquamöses Karzinom	6
Tumorstadium	pT1	48
	pT2	85
	pT3	150
	pT4	15
Nodalstatus	pN0	103
	pN1	193
Metastasenstatus	pM0	244
	pM1	54
Histologischer Differenzierungsgrad	G1	5
	G2	166
	G3	126
Verfügbare Überlebensdaten		294
Kontrollen		68

Ösophaguskarzinom

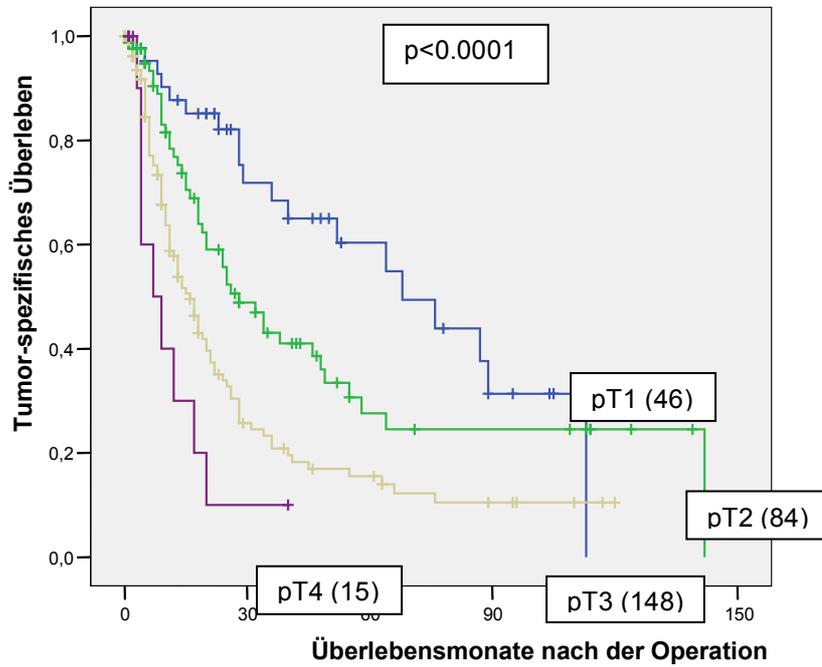


Abbildung 2.1:

Einfluss des Tumorstadiums auf die Prognose des Ösophaguskarzinoms.

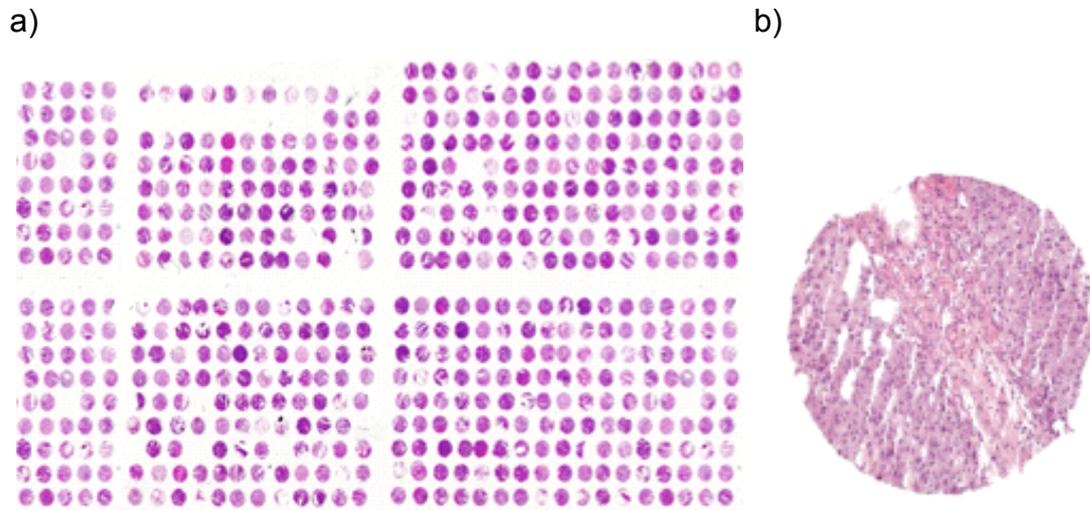


Abbildung 2.2:

Übersicht über einen Ösophaguskarzinom-Array (HE-Übersicht).

- a) Der Array besteht aus 6 Blöcken und enthält insgesamt 560 Gewebespots mit einem Durchmesser von 0,6mm.
- b) Einzelner Gewebespot vergrößert.

2.1.3 Zelllinien TMA

Die auf dem Array vorliegenden 143 Zelllinien stammen aus LGC-Promochem (ATCC), DSMZ, ECACC, ICLC, LGC, NCI-60, Novartis sowie dem Biochemischen Institut der Universität Regensburg. Es handelt sich überwiegend um humane Zelllinien. Daneben wurden ebenso solche vom Rind (bos taurus), Affen (african green; cercopithecus aethiops) und von der Ratte (rattus norvegicus) verwendet.

Bei den Zelllinien handelt es sich um Tumor- sowie um Nicht-Tumor Zellen. Diese entstammen verschiedenen Organen wie Knochenmark, Gehirn, Zervix, Kolon, Niere, Lunge, Brustdrüse, Muskel, Eierstock, Pankreas, Blut, Haut, Schilddrüse und Harnblase. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Zelllinien sind nachfolgend tabellarisch aufgelistet.

Tabelle 2.3:

Zusammenstellung des Zelllinienarrays

Array Koordinate	Zelllinie	ATCC-Nr.*	DSMZ-Nr.**	Herkunfts-Gewebe
1a	HCT 116	CCL-247	ACC 581	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
1b	HCT-15	CCL-225	ACC 357	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom, Duke's Typ C
1c	Hep G2	HB-8065	ACC 180	Leber; hepatozelluläres Karzinom
1e	HT-29	HTB 38	ACC 299	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
1h	IGROV1			Eierstock; Zystadenokarzinom
1i	K-562	CCL-243	ACC 10	Knochenmark; chronische myeloische Leukämie (stammend aus Pleuraerguss)
1k	LOX IMVI			Haut; malignes amelanotisches Melanom (stammend aus Lymphknoten)
1l	MCF7	HTB-22	ACC 115	Brustdrüse, epithelial; Adenokarzinom (stammend aus Pleuraerguss)
1m	MDA-MB-231	HTB-26		Brustdrüse, epithelial; Adenokarzinom (stammend aus Pleuraerguss)
1n	NCI-H226 (H226)	CRL-5826		Lunge; squamöses Karzinom, Mesotheliom (stammend aus Pleuraerguss)
1°	NCI-H460 (H460)	HTB-177		Lunge; großzelliges Karzinom (stammend aus Pleuraerguss)
1p	PC-3	CRL-1435	ACC 465	Vorstehdrüse; Adenokarzinom, Grad IV (stammend aus Knochenmark)
1r	RPMI 8226	CCL-155	ACC 402	Peripheres Blut, B-Lymphozyt; Plasmozytom, multiples Myelom
2a	RXF-393	HTB-46		Niere; Hypernephrom
2b	SF-268			Gehirn; anaplastisches Astrozytom
2e	SK-MEL-2	HTB-68		Haut; malignes Melanom

MATERIAL UND METHODEN

Array Koordinate	Zelllinie	ATCC-Nr.*	DSMZ-Nr.**	Herkunfts-Gewebe
				(stammend aus Haut vom Oberschenkel)
2f	SK-MEL-28	HTB-72		Haut; malignes Melanom
2g	SK-MEL-5	HTB-70		Haut; malignes Melanom (stammend aus axillärem Lymphknoten)
2h	SK-OV-3 (SKOV-3)	HTB-77		Eierstock; Adenokarzinom (stammend aus Aszites)
2i	SN-12C			Niere; Karzinom
2k	SNB-19		ACC 325	Gehirn, links parietookzipital; Glioblastom
2l	SW620 (SW-620)	CCL-227		Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom, Duke's Typ C (stammend aus Lymphknoten)
2m	T-47D	HTB-133		Brustdrüse; duktales Karzinom (stammend aus Pleuraerguss)
2n	TK-10			Niere; Karzinom
2o	U-251			Gehirn; Glioblastom
2p	UACC-257			Haut; malignes Melanom
2q	UACC-62			Haut; malignes Melanom
2r	A549	CCL-185	ACC 107	Lunge; Adenokarzinom
3a	MDA-MB-435S	HTB-129		Brustdrüse; duktales Adenokarzinom (stammend aus Pleuraerguss)
3b	MOLT-4	CRL-1582	ACC 362	Peripheres Blut, T-Lymphoblast; akute lymphoblastische Leukämie
3c	NCI-H23 (H23)	CRL-5800		Lunge; Nicht-kleinzelliges Adenokarzinom
3d	NCI-H322M	CRL-5806		Lunge; Nicht-kleinzelliges Karzinom
3e	NCI-H522 (H522)	CRL-5810		Lunge; Nicht-kleinzelliges Adenokarzinom
3f	OVCAR-3	HTB-161		Eierstock; Adenokarzinom (stammend aus Aszites)
3g	OVCAR-4			Eierstock; Adenokarzinom
3h	OVCAR-5			Eierstock; Adenokarzinom
3i	OVCAR-8			Eierstock; Adenokarzinom
3k	SF-295			Gehirn; multiformes Glioblastom
3l	SF-539			Gehirn; Gliosarkom
3m	SNB-75			Gehirn; Astrozytom
3n	SR	CRL-2262		Lymphoblast; großzelliges immunoblastisches Lymphom (stammend aus Pleuraerguss)
3o	UO-31			Niere; Karzinom
3p	786-O (786-0)	CRL-1932		Niere; Adenokarzinom
3q	A-498	HTB-44	ACC 55	Niere; Karzinom
3r	ACHN	CRL-1611		Niere; Adenokarzinom (stammend aus Pleuraerguss)
4a	BT-549	HTB-122		Brustdrüse; duktales Karzinom (stammend aus Lymphknoten)
4b	Caki-1	HTB-46	ACC 142	Niere; Klarzellkarzinom (stammend aus Haut)
4c	CCRF-CEM (CCRF CEM)	CCL-119	ACC 240	Peripheres Blut, T-Lymphoblast; akute lymphoblastische Leukämie
4d	COLO 205	CCL-222		Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom, Duke's Typ D (stammend aus Aszites)
4e	EKVX			Lunge; Nicht-kleinzelliges Karzinom
4f	HCC-2998			Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
4g	HOP-62			Lunge; Nicht-kleinzelliges Karzinom
4h	HOP-92			Lunge; Nicht-kleinzelliges Karzinom
4i	Hs 578T	HTB-126		Brustdrüse; duktales Karzinom
4k	KM-12			Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
4l	M-14			Haut; amelanotisches Melanom

MATERIAL UND METHODEN

Array Koordinate	Zelllinie	ATCC-Nr.*	DSMZ-Nr.**	Herkunfts-Gewebe
4m	Malme-3M	HTB-64		Haut; malignes Melanom (stammend aus Lunge)
4n	KRIB			Osteosarkom
4o	T98G (T98-G)	CRL-1690		Gehirn; multiformes Glioblastom
4p	U-343-MG			Glioblastom
4q	LN-401			Glioblastom
4r	LN-229	CRL-2611		Gehirn, rechts frontaler parietookzipitaler Kortex; Glioblastom
5a	BS 149			
5b	MEL-HO		ACC 62	Haut; Melanom
5c	COLO-849		ACC 216	Malignes Melanom (stammend aus axillärem Lymphknoten rechts)
5d	ECV-304		ACC 310	Harnblase; Karzinom
5e	Caki-2	HTB-47	ACC 54	Niere; Klarzellkarzinom
5f	RT-112	RT-112 D21	ACC 418	Harnblase; Transitionalzellkarzinom, Grad II
5g	293 (HEK-293)	CRL-1573	ACC 305	Niere; transformiert durch Adenovirus 5 DNS
5h	A-375 (A375)	CRL-1619		Haut; malignes Melanom
5i	MBC-5/MRC-5	CCL-171		Lunge, Fibroblast; normal
5k	SM			Melanom
5l	BT-474	HTB-20	ACC 64	Brustdrüse; duktales Karzinom
5m	EAL-29			
5n	SJCRH30 (RC13; RMS 13; SJRH30)	CRL-2061		Muskel; Rhabdomyosarkom (stammend aus Knochenmark)
5o	IM-9	CCL-159	ACC 117	Peripheres Blut, B-Lymphoblast; transformiert durch Epstein-Barr-Virus (EBV)
5p	VM-CUB 1		ACC 400	Harnblase; Transitionalzellkarzinom
5q	HeLa	CCL-2	ACC 57	Gebärmutterhals, epithelial; Adenokarzinom
5r	HACAT			Haut
6a	KU-19-19		ACC 395	Harnblase; Transitionalzellkarzinom
6b	GAMG		ACC 242	Gehirn; Glioblastom
6c	IGR-1		ACC 236	malignes Melanom (stammend aus inguinalen Lymphknoten)
6d	CRL-7930	CRL-7930		Harnblase; Karzinom
6e	172			Glioblastom
6f	COS-1	CRL-1650	ACC 63	Niere; Fibroblast, transformiert durch eine origin-fehlerhafte Mutante von SV-40
6g	Hs 766T	HTB-134		Bauchspeicheldrüse; Karzinom (stammend aus Lymphknoten)
6h	HUT 12			Fibrosarkom
6i	HUVEC			endothelial (Nabelschnurvene)
6k	IMR-90	CCL-186		Lunge, Fibroblast; normal
6l	U-138 MG	HTB-16	ACC 291	Gehirn; Glioblastom
6m	U-87 MG	HTB-14		Gehirn; Glioblastom, Astrozytom, Grad III
6n	WSS-1 (WS-1)	CRL-2029		Niere; transformiert durch Adenovirus 5 DNS
6o	Hs68	CRL-1635		Haut, Vorhaut, Fibroblast; Aspartoacylase-Mangel, mögliche Canavan Erkrankung
6p	MCF 10A	CRL-10317		Brustdrüse, epithelial; fibrozystische Krankheit
6q	RT-112	RT-112 D21	ACC 418	Harnblase; Transitionalzellkarzinom, Grad II
6r	MDA-HER-2			Brustdrüse; Adenokarzinom
7a	MDA-NEO			Brustdrüse; Adenokarzinom
7b	CAL-62		ACC 448	Schilddrüse; anaplastisches Karzinom
7c	DBTRG-05MG	CRL-2020	ACC 359	Gehirn, Gliazelle; multiformes Glioblastom

MATERIAL UND METHODEN

Array Koordinate	Zelllinie	ATCC-Nr.*	DSMZ-Nr.**	Herkunfts-Gewebe
7d	HBL-100	HTB-124		Brustdrüse
7e	HT-1080	CCL-121	ACC 315	Bindegewebe; Fibrosarkom
7f	LN-405		ACC 189	Gehirn; Astrozytom, Grad IV
7g	MDA-MB-433		ACC 65	Brustdrüse;
7h	NCI-H82 (H82)	HTB-175	ACC 556	Lunge; kleinzelliges Karzinom (stammend aus Pleuraerguss)
7i	CRO-AP3		ACC 275	B-Zell-Lymphom
7k	SW-548			Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom, Duke's Typ B???
7l	A431NS	CRL-2592	ACC 91	Haut, Epidermis; epidermoides Karzinom
7m	CRO-AP2		ACC 48	B-Zell-Lymphom
7n	BHT-101		ACC 279	Schilddrüse; anaplastisches papilläres Schilddrüsenkarzinom (stammend aus Lymphknoten)
7o	BT 717			
7p	A-172 (A172)	CRL-1620		Gehirn; Glioblastom
7q	S-117		ACC 266	Schilddrüse; Sarkom
7r	CRO-AP5		ACC 215	B-Zell-Lymphom
8a	B-CPAP		ACC 273	Schilddrüse; Karzinom
8b	BLD 4-1-1			
8c	HCT-8 (HRT-18)	CCL-244		Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
8d	SU-DHL-6		ACC 572	B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL) (stammend aus Pleuraerguss)
8e	MD 435 (MDA-MB-435)			
8f	OCI-LY-19		ACC 528	Knochenmark; B-Zell-Lymphom (Non-Hodgkin-Lymphom)
8g	ZR-75-1	CRL-1500		Brustdrüse, epithelial; duktales Karzinom (stammend aus Aszites)
8h	ML-1		ACC 464	Schilddrüse; follikuläres Karzinom
8i	BT-747 (BT-474)			
8k	8305C		ACC 133	Schilddrüse; Karzinom
8l	NCI-H510A (H510A; NCI-H510)	HTB-184	ACC 568	Lunge; kleinzelliges Karzinom, extrapulmonalen Ursprungs (stammend aus Nebenniere)
8m	SU-DHL-4		ACC 495	B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (B-NHL) (stammend aus Peritonealerguss)
8n	ONCO-DG-1		ACC 507	Schilddrüse; oxyphiles papilläres Karzinom
8o	MDA-MB-435S	HTB-129		Brustdrüse; duktales Adenokarzinom (stammend aus Pleuraerguss)
8p	A-498	HTB-44	ACC 55	Niere; Karzinom
8q	CRL-1472	CRL-1472		Harnblase; Karzinom, Grad 3
8r	Caco-2	HTB-37	ACC 169	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
9a	SK-CO-1	HTB-39		Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom (stammend aus Aszites)
9b	HT-29	HTB 38	ACC 299	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom
9c	Saos-2	HTB-85	ACC 243	Knochen; Osteosarkom
9d	SW480 (SW-480)	CCL-228	ACC 313	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom, Duke's Typ B
9e	786-O (786-0)	CRL-1932		Niere; Adenokarzinom
9f	KARPAS-1106P		ACC 545	B-Zell-Lymphom (Non-Hodgkin-Lymphom)
9g	MDA-MB-415	HTB-128		Brustdrüse; Adenokarzinom (stammend aus Pleuraerguss)
9h	8505C		ACC 219	Schilddrüse; papilläres Adenokarzinom
9i	DLD-1	CCL-221	ACC 278	Dickdarm, epithelial; kolorektales Adenokarzinom, Duke's Typ C
9k	HCT-8 (HRT-18)	CCL-244		Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom

Array Koordinate	Zelllinie	ATCC-Nr.*	DSMZ-Nr. **	Herkunfts-Gewebe
9l	SW403 (SW-403)	CCL-230	ACC 294	Dickdarm; kolorektales Adenokarzinom, Duke's Typ C, Grad III
9m	T-47D	HTB-133		Brustdrüse; duktales Karzinom (stammend aus Pleuraerguss)
9n	P			

* ATCC = American tissue culture collection (www.ATCC.org)

** DMSZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (www.dsmz.de)

Anzucht von pBac-E.coli Klonen

- pBac-E.coli Klon; RZPD Produkt Nummer: RPCIB753B07168Q; Produkt Name: RP11-168B7 (stab-stock Kultur); Vektor: pBACe3.6 ; Chr. 7q31.1
- Kulturmedium: Luria-Broth-Base (25g/l dH₂O); autoklaviert (Invitrogen)
- Antibiotikum Chloramphenicol (34 mg/ml Ethanol abs.) (SIGMA-ALDRICH)
- Schüttelinkubator- Thermocycler K 15/300 (Incutec IH 50)
- Schüttelmaschine LS 10 (gerhardt)

DNA Extraktion

- QIAprep Spin Miniprep KIT 250 von QIAgen; P1(20ml P1+200µl (10mg/ml)RNase A, bei 4°C), (P2, N3, PE und EB (Elution Buffer: 10mM Tris-Cl,pH 8,5) Puffer sowie „QIAprep spin“ Säulen sind in diesem Extraktions KIT enthalten.
- Zentrifugen: Biofuge fresco (Heraeus Instruments), JOTA-AVE (B.Braun Biotech International)
- Thermomixer compact (eppendorf)
- NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (peqLab)

Sondenmarkierung

- Nick Translation System (Invitrogen)
- Digoxigenin 11 dUTP (Roche)
- Polymerase I – 10 U/µl (Invitrogen)
- dNTP-Mix (Invitrogen)
- pBac-DNA-Lösung (selbst hergestellt)
- DNase Enzym Mix - 0,5 U/µl Pol I, 0,4mU/µl DNase I (Invitrogen)
- Minishaker IKA, Vibrofix VF1 Electronic (Janke&Kunkel IKA Labortechnik)
- Thermocycler

Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)

1. Entparaffinierung, proteolytische Vorbehandlung und Hybridisierung

- Objektträger (Starfrost)
- 24x32mm Deckgläschen (Marienfeld-Superior)
- Destilliertes Wasser (H₂O)
- Ethanol (70%, 80%, 95%) (MERCK)
- Xylol (MERCK)
- VP 2000 Pretreatment Reagent; NaSCN-Natriumthiocyanat, pH 5,4 (Vysis)
- VP 2000 Protease Buffer (0,01N HCL, pH: 2,0); Pepsin 250mg (Vysis)
- Fixogum (Marabu)
- Hybrite - Thermobrite, Statspin (Abbot Molecular)
- Wasserbäder (GFL-Gesellschaft für Labortechnik; Typ:1002, Typ:1083)
- Heizplatte (MEDAX)
- Küvetten 100m (Glaswerk Wertheim)
- selbstgestellte DNA-Sonde
- COT Human DNA (Roche)
- Zentromersonde – CEP 7; Spectrum Orange (Abbot)
- Hybridisierungsmix (Master Mix 1.0: aus 5ml deionisiertem Formamid, 1g Dextransulfat, 1,5ml 20xSSC; mit H₂O auf 7ml aufgefüllt; pH=7

2. Detektion

- Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection; (Roche) enthält:
 1. Blocking Solution (Lösung aus niedermolekularen Proteinen)
 2. Anti-DIG monoclonal antibody against digoxigenin mouse IgG1,
 3. Anti-Mouse-Ig-DIG-F(ab)₂ fragment from sheep,
- DAPI – 0,2mM 4'5-Diamindino-2-Phenyl-Indol; Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI; H-1200 (Vector)
- Antifade – p-Phenylenediamine (PPD)
- Brutschrank (WTB BINDER)
- Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss)

3. Waschpuffer

- Hybridisierungswaschpuffer: 2xSSC+0,3%NP40; pH=7,25
(SSC=2xsodiumcitrat,NaCl), (NP40=Octylphenoloxypolyethoxyethanol)
- PBS–Phosphate buffered saline=Natriumchlorid, (Di)Natriumhydrogenphosphat
(DakoCytomation)
- Detektionswaschpuffer: 0,2% TWEEN in 1x PBS; pH=7,4
(TWEEN=Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)
- pH-Meter –Digital pH Meter pH 525 (WTW-Wissenschaftlich Technische Werkstätten)

Immunhistochemie

- TBS –Puffer; Dako, Denmark; #S3006 Wash buffer 10x
- Target retrieval solution pH9, ready to use, Dako,Katalognr.S2368
- Xylol, Sds #0750021
- H₂O₂ : Merck # 1.072209.0250
- Methanol: J-T. Baker # 8045
- NRCAM-AK (goat): R&D Systems, Minneapolis, USA; Katalognummer: AF2034
- Mouse-Anti-Goat-IgG AK: Jackson Immunoresearch; # 205-005-108
- Tertiärantikörper; EnVision Anti-Mouse hrp, Dako, Denmark: # K4001
- DAB⁺Chromogen, liqiud DAD⁺Substrate, Dako; Bestellnr. K3468
- Häkalaun-Lösung, Medite, #41-5131-00
- Antibody diluent, DAKO #S2022

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Bac E.-coli Klonen

Zu Beginn wurde der für die selbst herzustellende NRCAM-Gensonde passende pBac E.coli Klon mit Hilfe der Webseite www.ensembl.org (Ensembl Genome Browser) herausgesucht. Der Klon (BAC RP11-168B7, RZPD) umfasst das zu untersuchende Gen NRCAM, welches auf Chromosom 7q31.1 liegt.

In einen 100ml Erlenmeyerkolben werden 10ml LB-Medium gegeben. Anschließend wird das Medium mit 10 μ l der pBac-E.coli-Kultur aus dem Glycerol-Stock (150 μ l Glycerol; autoklaviert in 2ml-Kryoröhrchen mit 850 μ l E.coli-Kultur) oder mit einem Abstrich aus dem Stab-Stock angeimpft. Der Abstrich wird mit einer Pipettenspitze, die mit einer abgeflamten Pinzette angefasst wird, vorgenommen. Der Kultur werden 30 μ l Chloramphenicol-Lösung (0,1mg/ml) zugefügt, da der gewählte pBac E.-coli Klon eine Chloramphenicolresistenz enthält. Dieser Kulturansatz inkubiert im Schüttelinkubator bei Raumtemperatur und 200rpm für 2 Tage. Von der durch das Bakterienwachstum trüb gewordenen Bakteriensuspension wird ein Aliquot von 10 μ l in 10ml frisches LB-Medium überführt.

Dieser Kulturansatz wird mit erneuten 30 μ l Chloramphenicol-Lösung überimpft. Die folgende Inkubation im Schüttler erfolgt bei 37°C mit 200rpm über Nacht. Erfahrungswerte zeigen, dass in der pBac E.coli-Flüssigkultur nach der Inkubation über Nacht eine ausreichend hohe pBac E.-coli Zelldichte vorliegt, um ausreichend DNA für die herzustellende Gensonde zu isolieren.

2.2.2 pBac-DNA-Extraktion aus einer pBac-E.coli-Flüssigkultur

Die pBac-DNA Extraktion wurde mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ vorgenommen.

Zunächst werden 3-4ml (2ml+1-2ml) der zuvor hergestellten pBac-E.coli-Kultur in 2ml Eppendorf-Röhrchen überführt und für 2 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

Das entstandene Bakterienpellet wird vollständig in 250µl Resuspensionspuffer P1 aufgenommen. Diesem Puffer wird vor Gebrauch RNase zugesetzt. Anschließend werden der Suspension 250µl Lysepuffer P2 zugefügt. Dieser enthält SDS zur Spaltung der Zellmembran und Denaturierung der Proteine sowie NaOH zur Denaturierung der chromosomalen und Plasmid-DNA.

Die Probe wird durch 8-12 maliges vorsichtiges Invertieren der Eppendorfküvetten innerhalb von 5 Minuten durchgemischt und inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 350µl Neutralisationspuffer N3, welcher Natriumacetat enthält, und sofortiges Durchmischen durch 8-12 maliges Drehen die Suspension neutralisiert und die Plasmid-DNA renaturiert.

Nach anschließender Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000rpm verbleibt die Plasmid DNA im Überstand, der in die „QIAprep spin“-Säule (in einer 2ml Aufang-Eppendorfküvette) pipettiert wird. Daraufhin wird die Säule eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Plasmid-DNA bindet an die Säule und der Durchfluss wird in einer 2ml Eppendorfküvette aufgefangen. Die Säule wird durch Zugabe von 500µl ethanolhaltigem 70% PE- Puffer und anschließender Zentrifugation für eine Minute bei 13.000rpm gewaschen. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt.

Zur Elution der pBac-DNA wird die Säule in eine frische Eppendorfküvette gestellt und für eine Minute mit 50µl 70°C warmen Elutionspuffer EB (enthält 15% Isopropanol) beladen und eine Minute inkubiert.

Zum Schluss wird das Eluat durch eine Minute Zentrifugation bei 13.000rpm in der Eppendorfküvette aufgefangen und bei 4°C aufbewahrt.

Die Messung der DNA Konzentration sowie ihrer Reinheit erfolgt durch photometrische Messung (DNA Absorption bei 260nm) am Nano Drop ND-1000 mit dem Programm "ND3.1.0:Nucleic Acid". Als Referenz gilt die Leerprobe mit 1,5µl des verwendeten Elutionspuffers EB.

Die Proben, die einen ausreichenden DNA-Gehalt (DNA-Mindestkonzentration: ca. 50ng/ μ l) und eine Reinheitsratio (260/280 Absorptionsverhältnis DNA/Proteine, welche die Probe verunreinigen) zwischen 1,8 und 2,0 enthalten, werden zur DIG-Nick Translation für die Sondenherstellung verwendet.

2.2.3 DIG-Nick-Translation zur FISH-Sondenmarkierung

Die Nick-Translation ist eine DNA Markierungstechnik bei der das Enzym DNAse genutzt wird, um Einzelstrangbrüche (sogenannte „nicks“) der DNA zu verursachen. Daraufhin baut das Enzym Polymerase I mit Hilfe seiner 5'-3'-Exonuclease Aktivität, die Nukleotide entfernen und am 5'-Ende wieder richtig verketteten kann, markierte Nukleotide (mit Digoxigenin) in den DNA Doppelstrang ein. Bei dieser Reparatur der DNA mit Digoxigenin markierten Sonden als Substrat verschiebt die Polymerase 1 die Einzelstrangbrüche anstatt sie einfach zu schließen, weshalb die Methode „nick Translation“ genannt wird. Die DNA wird gleichzeitig auf die optimale Fragmentlänge für die spätere Hybridisierung gekürzt, die durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert werden kann. Die Markierung wurde mit Hilfe des „Nick Translation System“ von Invitrogen durchgeführt.

Vor der Nick-Translation wird ein 0,5ml Eppendorfröhrchen bereitgestellt in dem im Anschluss ein Ansatz von insgesamt 50 μ l vorbereitet wird, wobei alle zu verwendenden Enzyme auf Eis stehen.

Zu Beginn werden 5 μ l dNTP-Mix, ein Nukleotidmix (ohne dTTP) mit je 0,2mM, in das Eppendorfröhrchen pipettiert. Danach wird 1 μ l Digoxigenin-dTP (1mM) hinzugefügt, um als markiertes Nukleotid in die Einzelstrangbrüche eingebaut zu werden.

Wieviel Volumen der zuvor hergestellten DNA-Lösung benötigt werden, um dem Ansatz die optimale Menge von 2 μ g DNA hinzuzufügen, muss errechnet werden. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass maximal 38 μ l der DNA-

Lösung verwendet werden können, da der gesamte Ansatz das Volumen des 50µl Eppendorfröhrchens nicht überschreiten darf.

Zuerst wird die DNA-Mindestkonzentration errechnet indem die benötigte DNA Menge (2000ng) durch das maximal verwendbare Volumen an DNA-Lösung (38µl) geteilt wird: $2000\text{ng} / 38\mu\text{l} = 52,6 \text{ ng}/\mu\text{l}$

Das benötigte Volumen an DNA-Lösung muss für jede Probe abhängig von ihrer DNA-Konzentration bestimmt werden, sofern diese mindestens 52,6ng/µl beträgt. Dafür wird die optimale Menge der DNA von 2000ng durch die Konzentration der aktuellen Probe geteilt:

$$2000\text{ng} / X_{\text{Konzentration der Probe}} \text{ ng}/\mu\text{l} = X_{\text{benötigte DNA-Lösung}} \mu\text{l}$$

Ist das errechnete Volumen der benötigten DNA-Lösung kleiner als 38µl, wird die Differenz zu 38µl mit dH₂O aufgefüllt.

Zur Fertigstellung des Ansatzes fehlt das Hinzufügen von 5µl Polymerase I-DNase-Mix (0,5U/µl Pol I, 0,4 mU/µl DNase I) und 1µl Polymerase I (10U/µl). Danach wird der 50µl DIG-Nick-Translationsansatz durch vortexen gut gemischt und anschließend kurz zentrifugiert damit sich alle Reagenzien gemischt am Boden des Röhrchens befinden.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Dick-Nick Translationsansatz:

Tabelle 2.4:

Pipettieransatz im 0,5ml-Eppendorf Tube.

dNTP-Mix ohne dTTP	5µl
Digoxigenin 11-dUTP	1µl
pBac-DNA-Lösung	38µl
Pol I-/ DNase Enzym Mix	5µl
DNA Polymerase I	1µl
Ansatzmenge	50µl

Während der Reaktion der Nick Translation inkubiert der Ansatz für 90 Minuten bei 15°C im Thermocycler. Nach Zugabe von 5µl Polymerase I-DNase-Mix und durchsichtigen mit der Pipette inkubiert der Sondenansatz weitere 15 Minuten bei 15°C im Thermocycler.

Daraufhin wird die Reaktion durch Zugabe von 5µl Stop-Puffer (0,5 M EDTA, pH 8,0) gestoppt.

Die Digoxigenin markierte Sonde wird zum Abschluss gevortext und kurz zentrifugiert bevor sie bei 4°C gelagert wird.

2.2.4 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)

2.2.4.1 Methode

Das Verfahren der FISH wird genutzt, um eine oder mehrere DNA-Sequenzen (Genabschnitte), RNA, einzelne Zellen oder Metaphase-Chromosomen darzustellen.

Um den Genabschnitt des zu untersuchenden Gens NRCAM sichtbar zu machen, wurde die selbst hergestellte und mit Digoxigenin indirekt markierte (wie in 2.2.3 beschrieben) genspezifische NRCAM-Sonde verwendet. Als Referenz diente eine kommerzielle Sonde für das Zentromer des Chromosoms 7, auf welchem sich das zu untersuchende Gen befindet.

Die Arbeitsschritte der FISH werden in zwei Arbeitstage aufgeteilt. Am ersten Tag wird das zu untersuchende Präparat auf dem Objektträger (TMA) entparaffiniert, das Gewebe vorbehandelt und daraufhin die Gen- sowie Zentromersonde zur Hybridisierung auf den Objektträger gebracht. Am zweiten Arbeitstag werden unspezifische Bindungen abgewaschen und die spezifische hybridisierte Gensonde wird mit Antikörpern, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, detektiert. Danach wird das Chromatin des Gewebes gegengefärbt und das Präparat unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.4.2 Vorbereitung und Hybridisierung

Entparaffiniert werden die 4µm dicken, auf einem Objektträger fixierten Gewebeschnitte (TMA's) durch dreimaliges Inkubieren in Xylol für 10 Minuten und weiteres zweimaliges Inkubieren in 96% Ethanol für 5 Minuten. Auf einer Heizplatte verdampft das Ethanol bei 48°C für 3 Minuten.

Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung wird das Gewebe 15 Minuten bei 80°C mit Pretreatment-Lösung (NaSCN-pH=5,4) inkubiert. Hierbei wird die Tertiärstruktur von Proteinen im Gewebe sowie der Zellmembran durch Aufbrechen der Disulfidbrücken geschädigt.

Der Objektträger wird 2 Minuten in dH₂O bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend werden alle Proteine des Gewebes innerhalb von 120-300 Minuten durch Inkubation mit Protease-Lösung (0,01N HCL,(pH=2.0)+250mg Pepsin) bei 37°C verdaut. Erneut wird der Objektträger 2 Minuten in dH₂O gewaschen. Darauf folgt die Entziehung des Wassers aus dem Gewebe, wobei der Objektträger jeweils für 3 Minuten in 70%, 80% und 96% Ethanol gestellt wird.

Die hiermit abgeschlossene proteolytische Vorbehandlung des Gewebes ermöglicht der Sonde einen leichten Zugang in das Gewebe und damit die Möglichkeit, optimal komplementär an die zu untersuchende Sequenz zu binden.

Um die Hybridisierung mit dem vorbereiteten Objektträger zu starten, werden 20µl Sonden-Hybridisierungsmix benötigt. Dieser enthält 14µl Basis-Hybridisierungsmix, 2,0µl COT-DNA (1g/µl) und 4µl Sonden-DNA. Die Sonden-DNA setzt sich in diesem Fall aus 3,5µl der selbst hergestellten Gensonde und 0,5µl kommerzieller Zentromersonde zusammen. COT Human-DNA verhindert Kreuzhybridisierungen mit unspezifischen sowie repetitiven DNA-Sequenzen, indem sie diese abblockt.

Tabelle 2.7:

Sondenhybridisierungsmix (Master-Mix 1.0)

Basis-Hybridisierungsmix	14µl
Cot-DNA	2µl
Sonden-DNA	4µl
<hr/>	
Ansatz (Sondenhybridisierungsmix)	20µl

Der Basis-Hybridisierungsmix enthält Formamid, das die Denaturierungstemperatur der DNA durch Schwächung der Wasserstoffbrückenbindungen herabsetzt. Dies erleichtert die vor der Hybridisierung nötige Auftrennung des DNA-Doppelstranges. Hergestellt wird der Basis-Hybridisierungsmix indem 5,0ml deionisiertes Formamid, 1,0g Dextransulfat und 1,5ml 20xSSC auf einem Heizrührer bei 60°C gemischt werden bis das Dextransulfat gelöst ist. Diese Mischung wird mit 2M HCL auf pH 7 eingestellt und dann bei 4°C gelagert.

Der 20µl Sondenhybridisierungsmix kann jetzt auf den Objektträger (TMA) pipettiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt werden. Fixogum wird zum luftdichten Versiegeln des Deckgläschens an dessen Rändern verteilt. Es vermeidet das Austrocknen während der Hybridisierung.

Da die kommerziellen Zentromersonden bereits direkt mit einem lichtempfindlichen Fluorochrom markiert sind, ist ab diesem Zeitpunkt darauf zu achten die Proben und den Objektträger vor Licht zu schützen. Ansonsten bleicht das Leuchtsignal des Fluorochromes frühzeitig aus.

Der Objektträger wird in den Thermobrite gelegt und dort 10 Minuten bei 72°C denaturiert und anschließend für 24-72 Stunden bei 37°C hybridisiert.

2.2.4.3 Waschen und Antikörperdetektion

Der Objektträger (TMA) wird aus dem Thermobrite genommen und das Fixogum sowie das Deckgläschen werden entfernt.

Zum Waschen wird der Objektträger kurz in den Hybridisierungswaschpuffer bei Raumtemperatur gestellt bis ein frischer Hybridisierungswaschpuffer im Wasserbad für eine weitere zweiminütige Waschung auf 72°C erhitzt ist. Dabei wird die nicht gebundene Sonden-DNA abgewaschen.

Der Objektträger wird kurz in PBS-Puffer gestellt und danach mit 500µl 1x Blocking Solution eingedeckt. Mit der aus niedermolekularen Proteinen bestehenden Blocking Solution werden freie Bindungsstellen abgesättigt, um die proteinbindenden Oberflächen abzublocken. Hierdurch entsteht beim Auswerten unter dem Mikroskop weniger Hintergrundleuchten und die Detektionsantikörper können hochspezifisch an die Digoxigenin-markierte Gen-Sonde binden.

Nach der Einwirkdauer von 30-45 Minuten in einer dunklen Inkubationskammer wird die Blocking Solution abgekippt und der Objektträger mit dem ersten Detektions-Antikörper für 60-90 Minuten bei 37°C (im Brutschrank) in einer feuchten Kammer inkubiert.

Überschüssiger Antikörper wird mit einer Waschung im Detektionswaschpuffer in drei Bädern bei 37°C für jeweils eine Minute entfernt. Daraufhin werden mit derselben Methode der zweite und dritte Antikörper inkubiert und abgewaschen, wobei die dritte Waschung in 3 Bädern für jeweils 5 Minuten erfolgt.

Die Detektionskaskade mit einem Antikörperbäumchen, bestehend aus drei Antikörpern, die an das Hapten (Digoxigenin) der Gensonde binden, dient der Signalverstärkung.

Nach Waschung des dritten fluoreszenzgekoppelten Antikörpers muss der Objektträger in einem dunklen Raum lufttrocknen.

Mit einem Tropfen DAPI/Antifade wird der Objektträger eingedeckt und dann mit einem Deckgläschen endgültig für die Auswertung abgedeckt.

DAPI färbt das Chromatin des Gewebes an, um bei der Auswertung die Zugehörigkeit eines Gen- oder Zentromersignals zu einem Zellkern zu ermöglichen. Antifade verhindert das beschleunigte Ausbleichen der Signale.

2.2.5 Auswertung

Die fertigen Objektträger (TMA's) wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Beurteilung der Gensignale wurde der grüne FITC Filter benutzt. Die Zentromersignale wurden mit dem orangen Rhodamin Filter angesehen. Die Gen- und Zentromersignale konnten durch Anfärbung des Zellkerns mit DAPI und einem entsprechenden DAPI-Filter genau einem Zellkern zugeordnet werden. Mit dieser Technik konnte die Ratio NRCAM-Signale : Zentromer 7-Signale in den einzelnen Zellen jeder Gewebeprobe gezählt werden.

Als Amplifikation wurde das Vorliegen von mindestens doppelt so vielen NRCAM-Signalen wie Zentromer-Signalen (Ratio NRCAM : Zentromer 7 \geq 2,0) definiert. Gewebeproben, die eine NRCAM : Zentromer 7 Ratio von über 1,0 jedoch unter 2,0 aufwiesen (Ratio NRCAM : Zentromer 7 $>$ 1,0 aber $<$ 2,0) wurden als „Gains“ bezeichnet. Gain ist somit definiert als Zugewinn an NRCAM Kopiezahlen, jedoch ohne die Kriterien einer Amplifikation zu erfüllen. Alle weiteren Gewebeproben (Ratio NRCAM : Zentromer 7 \leq 1,0) wurden als normal definiert.

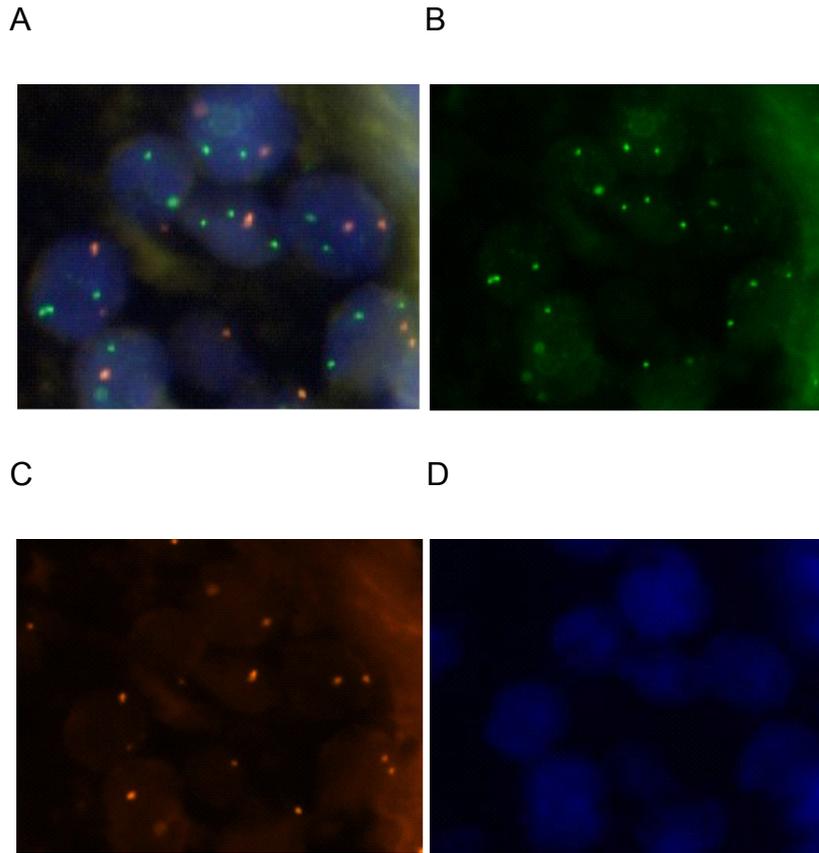


Abbildung 2.3:

Beispiel einer nicht amplifizierten Gewebeprobe in der Auswertung.

A: Drei Filter übereinandergelegt: NRCAM Gensignale (Grün), Zentromer7 Signale (Orange), Zellkerne (Blau) B: NRCAM-Gensignale; FITC C: Zentromer7 Signale; Rhodamin D: Zellkerne; DAPI.

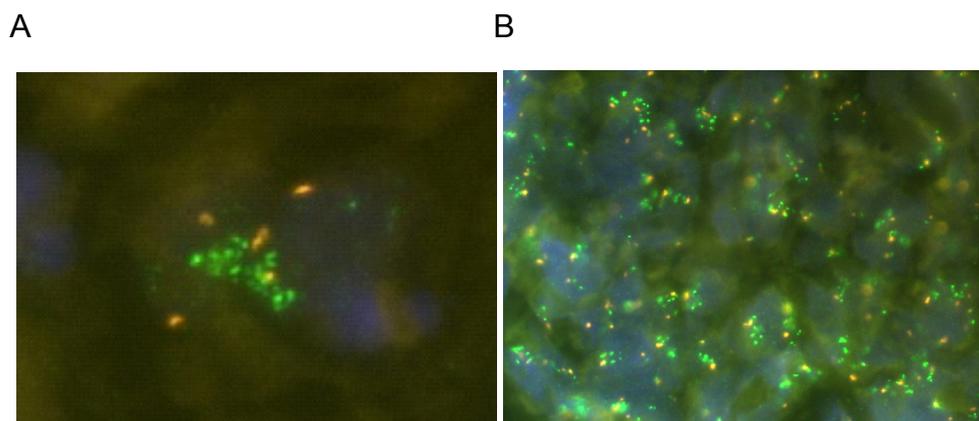


Abbildung 2.4:

Beispiel amplifizierter Zellen.

A: Amplifizierte Zellen des Ösophagus-Plattenepithelkarzinoms auf Ösophagus TMA; Spot: D5I
B: Übersicht auf amplifizierte Zellen des Ösophaguskarzinoms auf Ösophagus TMA; Spot D5I

2.2.6 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode mit der zell- und gewebespezifische Antigene (Proteine) mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Sie dient daher der Ermittlung, in welchen Gewebe ein Protein exprimiert wird und in welchen Kompartiment der Zelle dieses lokalisiert ist.

Verwendet werden 4µm Schnitte des Ösophagus TMA Gewebeblocks von dem zuvor Schnitte für die FISH Analyse genutzt wurden.

Zunächst werden die Objektträger des Ösophagus TMA zur Entparaffinierung eine Stunde mit Xylol inkubiert. Daraufhin werden sie mit einer absteigenden Alkoholreihe (3x 2 Minuten 100%, 2 Minuten 96%, 2 Minuten 80%, Aqua dest.) bewässert.

Zur Vorbereitung und besseren Demaskierung der Antigenepitope („Antigen-retrieval“) werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten auf pH9 im Autoklaven mit dem Zitratpuffer pH9 (Target retrieval solution) inkubiert.

Zum Blockieren endogener Peroxidase werden die Objektträger für 10 Minuten in 1% H₂O₂ (gelöst in Methanol) inkubiert und danach zweimal fünf Minuten in TBS gespült.

Für die immunhistochemische Untersuchung der NRCAM-Expression auf dem Ösophagus TMA wurde der polyklonale anti-humane NRCAM Antikörper aus Ziege (R&D Systems, MN, USA, Katalognr.AF2034) verwendet. Die Schnitte werden mit 100-150µl des mit „antibody diluent“ verdünnten NRCAM-Antikörpers (Primärantikörper) bedeckt und für zwei Stunden bei 30°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Eine optimale Färbung wurde bei einer Verdünnung des NRCAM-Antikörpers von 1:2700 erzielt.

Unspezifische Bindung des AK Überschüssiger/Ungebundener Antikörper wird anschließend durch zweimal fünfminütiges inkubieren in TBS abgespült.

Zur Detektion wird das Gewebe nun mit dem 1:200 in TBS verdünnten Sekundärantikörper Mouse Anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch; Bestellnr.205-005-108) für 30 Minuten bei 30°C inkubiert, der gegen Speziesdeterminanten (Ziege) des Primärantikörpers gerichtet ist.

Es erfolgt eine erneute Waschung für 2x fünf Minuten in TBS.

Als Färbereagenz dienen 200µl des Tertiärantikörpers (EnVision Anti-Mouse, DAKO, Bestellnummer K4401), welcher hrp (horseradish peroxidase) gekoppelt ist. Hiermit wird der Objektträger für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Verwendung eines Tertiärantikörpers zur Detektion dient der Signalverstärkung. Zur Umsetzung der Enzym-Substrat/Chromogen-Reaktion werden die Objektträger nun zehn Minuten mit DAB (3,3'- Diaminobenzidin) inkubiert, wobei es zu einer braunen Färbungsreaktion kommt.

Anschließend werden die Objektträger zweimal mit Aqua dest. gespült und mit Hämalaunlösung für 1 Minute zur Sichtbarmachung der Zellkerne gegengefärbt.

Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgt unter dem Lichtmikroskop, wobei die Intensität der Färbung entsprechend einem Score von 0 bis 3+ eingeteilt wird.

- 0 : keine Färbung
- 1+ : schwache Färbung
- 2+ : moderate Färbung
- 3+ : starke Färbung
- Tumorzellgehalt in % (0-100%)

Die NRCAM Expression wurde nach folgendem Score zur Auswertung von Biomarkern an TMAs klassifiziert:

Tabelle 2.6:

Auswertungsscore der NRCAM Expression.

Expression (score)	Intensität der Färbung	% Tumorzellen
negativ	0	100%
schwach positiv (weak)	1+	≤ 70%
	2+	≤30%
mittelstark positiv (moderate)	1+	>70%
	2+	30-70%
	3+	≤30%
stark positiv (strong)	2+	>70%
	3+	>30%

2.3 Statistik

Um den Zusammenhang zwischen histologischem Tumortyp, Grad des Tumors, „Staging“ und Genamplifikationen darzustellen, wurden die „Contingency table analysis“ und der Chi-Quadrat-Test angewandt. Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte nach Kaplan-Meier. Der Log-rank-Test wurde angewandt, um den Zusammenhang zwischen Genamplifikationen und Patientenüberleben zu untersuchen. Mit Hilfe der Cox Regression wurden die Abhängigkeiten der analysierten Variablen untereinander in Relation zum Patientenüberleben gesetzt.

3 ERGEBNISSE

3.1 NRCAM Amplifikation in humanen Tumoren

Von den 3.981 Tumoren des Multitumor-Arrays konnten 2.668 (67%) erfolgreich mit der FISH analysiert werden. Bei 1.313 Tumoren konnte kein Resultat erhalten werden, weil entweder der Gewebespot auf dem TMA-Schnitt fehlte (386 = 9,7%) oder weil kein eindeutiges Fluoreszenzsignal für NRCAM sichtbar war (927 = 23,3%).

Eine NRCAM Amplifikation gemäß der vordefinierten Kriterien (siehe 2.2.5) wurde bei 20 (0,7%) Tumoren gefunden, die von acht verschiedenen Tumorentitäten stammen (Tabelle 3.1). Tumoren mit Amplifikationen zeigten in der Regel nicht mehr als etwa zehn Gensignale. Erhöhte NRCAM Kopiezahlen („Gains“), die nicht den Schwellenwert für eine Amplifikation erreichten, wurden in weiteren acht (0,3%) Tumoren gefunden (Tabelle 3.2). „Gain“ ist definiert als Zugewinn an NRCAM Kopiezahlen (Ratio Gen : Zentromer >1.0 aber <2.0), jedoch ohne die Kriterien einer Amplifikation (Ratio Gen : Zentromer >2.0) zu erfüllen (siehe 2.2.5).

Besonders häufig wurden NRCAM Amplifikationen in Ösophaguskarzinomen gefunden. Jeweils 13% der analysierbaren Tumoren der Ösophagus Plattenepithel- (5/37) und Adenokarzinome (5/36) waren amplifiziert.

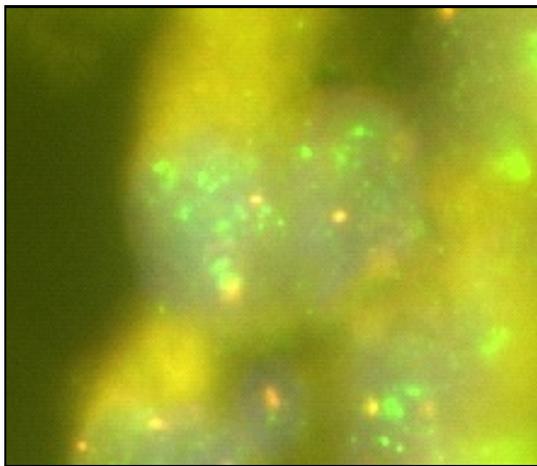
Tabelle 3.1: NRCAM-Amplifikationen in den verschiedenen Tumortypen des Multitumor-Arrays.

Tumortyp	n auswertbare Tumoren	NRCAM Amplifikationen
Ösophagus Adenokarzinom	36	13,9 % (n=5)
Ösophagus Plattenepithelkarzinom	37	13,5 % (n=5)
Larynxkarzinom	38	5,3 % (n=2)
Mammakarzinom (medullär)	40	5,0 % (n=2)
Leiomyosarkom	23	4,3 % (n=1)
Seminom	71	4,2 % (n=3)
Haut, Plattenepithelkarzinom	26	3,8 % (n=1)
Mundbodenkarzinom	45	2,2 % (n=1)

Tabelle 3.2: NRCAM-Zugewinne („Gains“) in den verschiedenen Tumortypen des Multitumor-Arrays.

Tumortyp	n auswertbare Tu- moren	NRCAM-Zugewinn
Paraganglion	27	7,4 % (n=2)
Malignes Melanom	21	4,8 % (n=1)
Urothelkarzinom (Ta)	44	4,5 % (n=2)
Phäochromozytom	46	4,3 % (n=2)
Urothelkarzinom (T2-T4)	39	2,6 % (n=1)

A:



B:

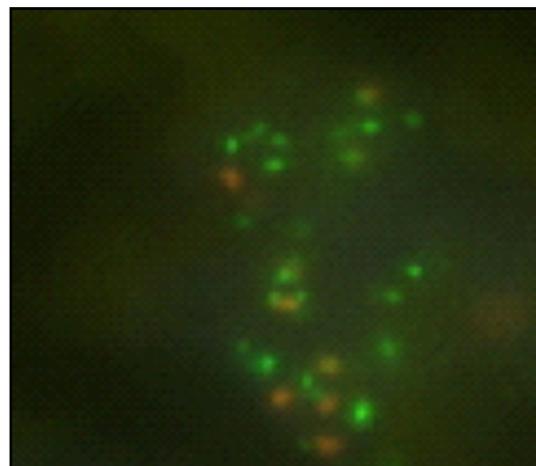
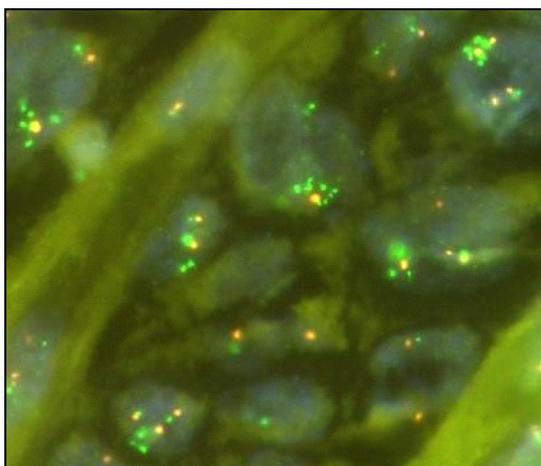


Abbildung 3.1: Beispiele für NRCAM Amplifikationen im Adenokarzinom des Ösophagus analysiert auf dem Multitumor-Array.

A: MTA4, Slide B, Spot C6f B: MTA4, Slide B, Spot C5l

A:



B:

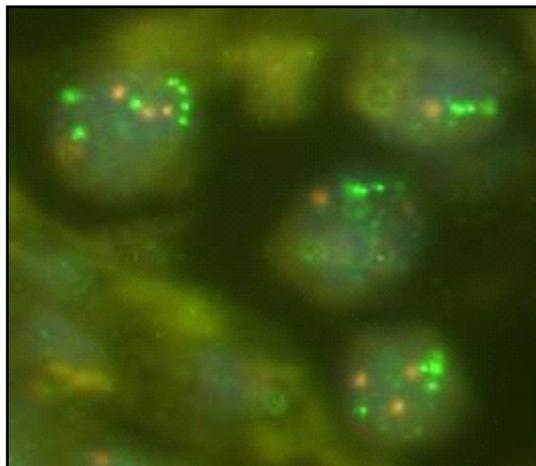


Abbildung 3.2: Beispiele für NRCAM Amplifikationen im Mundboden und Larynxkarzinom analysiert auf dem Multitumor-Array.

A: Mundbodenkarzinom; MTA4, Slide C, Spot A1q. B: Larynxkarzinom; MTA4, Slide C, Spot A5g

3.2 NRCAM Amplifikation im Ösophaguskarzinom

Von den 298 primären Ösophaguskarzinomen des TMA konnten 233 (78,2%) erfolgreich mit der FISH analysiert werden. Für insgesamt 65 (21,8%) Gewebe konnte der NRCAM-Amplifikationsstatus nicht bestimmt werden, weil entweder die Stärke der FISH Signale zu schwach war (n=52) oder weil der Gewebespot auf dem TMA-Schnitt fehlte (n=13).

Von den 233 analysierbaren Tumoren zeigten 23 (9,9%) eine NRCAM Amplifikation gemäß der vordefinierten Kriterien (siehe 2.2.5). Tumoren mit Amplifikationen zeigten meist nicht mehr als 10 Genkopien. Weitere 19 (8,2%) Tumoren zeigten einen geringgradigen Zugewinn („Gain“) mit meist 3-4 Gensignalen.

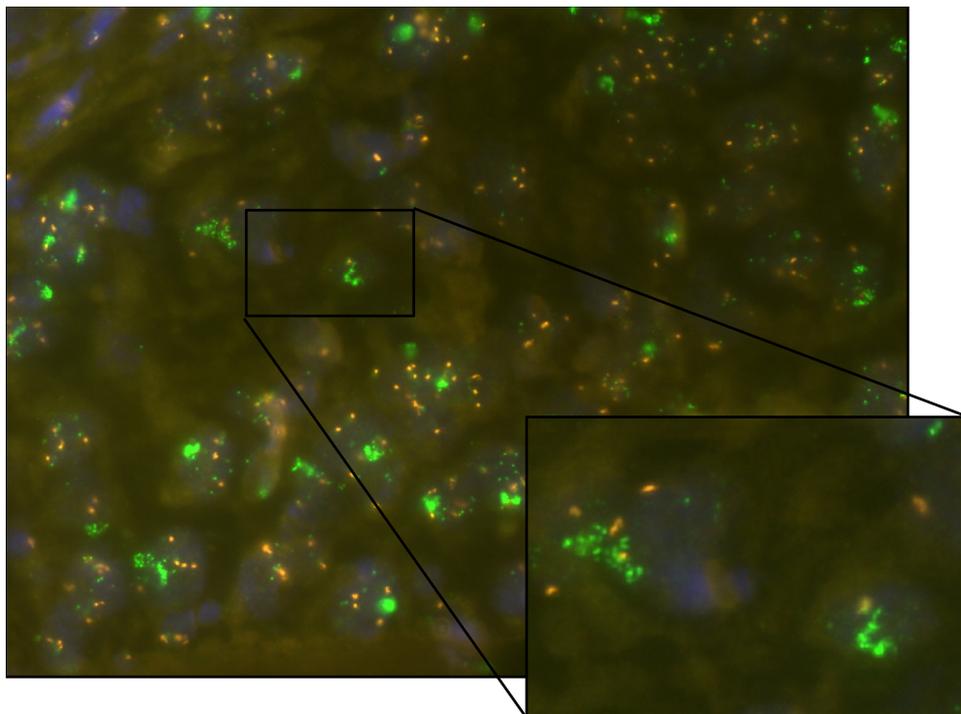


Abbildung 3.3: NRCAM Amplifikation in einer Lymphknotenmetastase eines Ösophaguskarzinoms (Ösophagus TMA; Spot D5I)

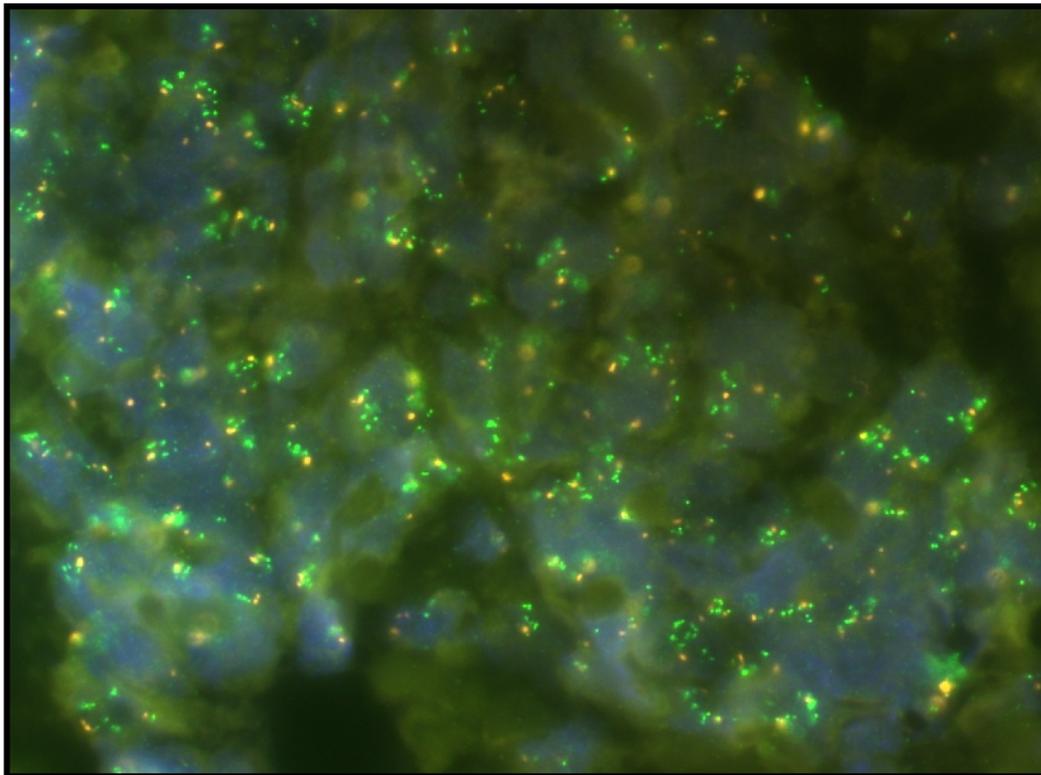


Abbildung 3.4: Beispiel einer NRCAM Amplifikation im Ösophagus Plattenepithelkarzinom (Ösophagus TMA, Spot A4m)

3.2.1 Assoziation zum Tumorphänotyp

Der Vergleich der Genkopiezahlveränderungen von NRCAM zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Plattenepithel- und Adenokarzinomen ($p=0,4208$; siehe Tab. 3.3.)

Tabelle 3.3: Genkopiezahlveränderungen in den verschiedenen Tumorentitäten des Ösophaguskarzinoms.

	n gesamt	n auswertbar	Normal (%)	Polyploidie (%)	Gain (%)	Amplifikation (%)	p-Wert Amplifikation PCA vs ADC
PCA	163	140	60,71	15,0	12,86	11,43	0,4208
ADC	129	86	80,23	10,47	1,16	8,14	
ADC/PCA	6	6	83,33	16,67	0	0	

Innerhalb der Untergruppe der Adenokarzinome zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen der NRCAM-Genkopiezahl und einem positiven Nodalstatus ($p=0.0073$) und dem Auftreten von Fernmetastasen ($p=0,0450$). Dies galt in Bezug auf den Nodalstatus sowohl für Amplifikationen als auch für Genkopiezahlveränderungen, die durch Polysomien von Chromosom 7 hervorgerufen wurden. Zumindest ein deutlicher Trend zeigte sich auch für den Differenzierungsgrad ($p=0,0960$ G1+G2 vs. G2). Kein signifikanter Zusammenhang wurde zwischen NRCAM und dem Tumorstadium gefunden ($p=0,4688$). In Tabelle 3.4 ist die Assoziation zwischen dem NRCAM-Genstatus und den klinischen und pathologischen Parametern in den Adenokarzinomen aufgelistet.

Tabelle 3.4: Assoziation von NRCAM Amplifikationen zu pathologisch-klinischen Variablen des Ösophagusadenokarzinoms.

		n Gesamt	n auswertbar	Normal (%)	Poly (%)	Gain (%)	Amp (%)	p-Wert
Tumorstadium	pT1	24	16	93,7	6,3	0,0	0,0	0,4688
	pT2	46	30	80	6,7	0,0	13,3	
	pT3	55	38	76,3	13,2	2,6	7,9	
	pT4	4	2	50	50,0	0,0	0,0	
Differenzierungsgrad	G1	1	1	100	0,0	0,0	0,0	0,0960*
	G2	50	31	93,6	3,2	0,0	3,2	
	G3	77	53	73,6	13,2	1,9	11,3	
Nodalstatus	N0	34	24	100	0,0	0,0	0,0	0,0073
	N+	94	61	73,8	13,1	1,6	11,5	
Fernmetastasen	cM0	96	59	88,1	6,8	0,0	5,1	0,0450
	cM+	33	27	63	18,5	3,7	14,8	

*G1+G2 vs. G3

Innerhalb der Plattenepithelkarzinome des Ösophagus zeigten sich keine Zusammenhänge zwischen Amplifikationen und dem Tumorphänotyp. Wie auch in den Adenokarzinomen wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen NRCAM und dem Tumorstadium im Ösophaguskarzinom gefunden ($p=0,6072$). Diese Ergebnisse werden in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: Assoziation der NRCAM Amplifikationen zu pathologisch-klinischen Variablen des Ösophagusplattenepithelkarzinoms.

		n Gesamt	n aus- wertbar	Normal (%)	Poly (%)	Gain (%)	Amp (%)	p-Wert
Tumor- stadium	pT1	24	18	72,2	11,1	5,6	11,1	0,6072
	pT2	38	30	53,3	16,7	16,7	13,3	
	pT3	89	82	62,2	13,4	14,6	9,8	
	pT4	11	10	50	30,0	0,0	20,0	
Differen- zierungs- grad	G1	4	4	100	0,0	0,0	0,0	0,4713
	G2	113	99	60,7	13,1	14,1	12,1	
	G3	45	37	56,8	21,6	10,8	10,8	
Nodal- status	N0	67	56	69,7	10,7	10,7	8,9	0,3520
	N+	94	84	54,7	17,9	14,3	13,1	
Fern- metas- tasen	cM0	142	123	59,4	14,6	14,6	11,4	0,1898
	cM+	20	16	68,7	18,8	0,0	12,5	

3.2.2 Bedeutung von Polysomien

Allerdings fiel auf, dass die Häufigkeit speziell von Polysomien mit steigendem Differenzierungsgrad und Nodalstatus stark (jedoch nicht signifikant) zunahm. Dies galt auch für die Adenokarzinome. Diese Beobachtung könnte auf eine wichtige Rolle auch von geringfügigen NRCAM-Kopiezahlerhöhungen hindeuten. Um die Bedeutung von NRCAM-Kopiezahlveränderungen unabhängig vom Chromosom 7 Status zu untersuchen, wurde eine Analyse basierend auf der reinen NRCAM-Kopiezahl angeschlossen (Tabelle 3.6).

Hierbei zeigte sich zunächst eine signifikant höhere NRCAM-Genkopiezahl in den Plattenepithelkarzinomen als in den Adenokarzinomen. So zeigten in dieser Patientengruppe Plattenepithelkarzinome am häufigsten eine erhöhte NRCAM-Genkopiezahl (39,3%), während für die Adenokarzinome nur bei 19,8% der Patienten eine erhöhte Genkopiezahl nachgewiesen wurde (p=0,0018; Abb.:3.5).

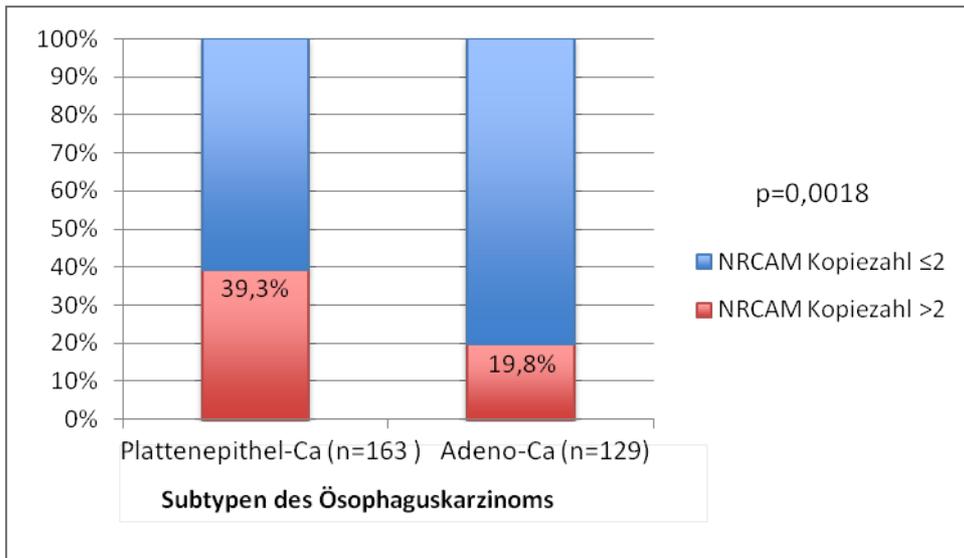


Abbildung 3.6: Zusammenhang zwischen der erhöhten NRCAM-Genkopiezahl und den Tumorsubtypen des Ösophaguskarzinoms.

Genauso wie bei der vorherigen Amplifikationsanalyse konnte bei den Adenokarzinomen ein signifikanter Zusammenhang zum Lymphknotenstatus ($p=0,0005$) nachgewiesen werden. Tumoren mit einer Genkopiezahl von >2 zeigten häufiger Lymphknotenmetastasen als Tumoren mit normaler NRCAM-Genkopiezahl. Auch bei den Plattenepithelkarzinomen zeigte sich ein deutlicher Trend bezüglich eines positiven Nodalstatus ($p=0,0753$). Für das Adenokarzinom ergaben sich weitere signifikante Assoziationen zu einem erhöhten Differenzierungsgrad ($p=0,0138$) sowie zu Fernmetastasen ($p=0,0084$) (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Assoziation der NRCAM-Genkopiezahl zu pathologisch-klinischen Variablen bei dem Adenokarzinom (A) und dem Plattenepithelkarzinom (B) des Ösophaguskarzinoms.

A)

		n Gesamt	n auswertbar	≤2 (%)	>2 (%)	P-Wert
Tumor-stadium	pT1	24	16	93,8	6,3	0,3042
	pT2	46	30	80,0	20,0	
	pT3	55	38	76,3	23,7	
	pT4	4	2	50,0	50,0	
Differen-zierungs-grad	G1	1	1	100,0	0	0,0138*
	G2	50	31	93,6	6,5	
	G3	77	53	73,6	26,4	
Nodal-status	N0	34	24	100	0	0,0005
	N+	94	61	73,8	26,3	
Fern-metas-tasen	cMO	96	59	88,1	11,9	0,0084
	cM+	33	27	63,0	37,0	

*G1+G2 vs. G3

B)

		n Gesamt	n auswertbar	≤2 (%)	>2 (%)	P-Wert
Tumor-stadium	pT1	24	18	72,2	27,8	0,5192
	pT2	38	30	53,3	46,7	
	pT3	89	82	62,2	37,8	
	pT4	11	10	50,0	50,0	
Differen-zierungs-grad	G1	4	4	100,0	0	0,5668*
	G2	113	99	60,6	39,4	
	G3	45	37	56,8	43,2	
Nodal-status	N0	67	56	69,6	30,4	0,0753
	N+	94	84	54,8	45,2	
Fern-metas-tasen	cMO	142	123	59,3	40,7	0,4636
	cM+	20	16	68,8	31,2	

*G1+G2 vs. G3

3.2.3 Assoziation zur Patientenprognose

Eine Kaplan-Meier Analyse zeigte sowohl im Adenokarzinom als auch im Plattenepithelkarzinom eine tendenziell ungünstige Prognose für Tumoren mit Polysomien, wobei der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (z.B. Gain versus Polysomie bei den Plattenepithelkarzinomen) nicht signifikant war (Abb. 3.6 A und B).

Aus diesem Grund wurde eine zweite Analyse angeschlossen, in der Tumoren mit NRCAM Kopiezahlveränderungen (Gain, Polysomie oder Amplifikation) gruppiert wurden. Es zeigte sich eine signifikant schlechtere Prognose für NRCAM veränderte Tumoren in der Subgruppe der Adenokarzinome ($p=0,0110$; Abb. 3.6 C) jedoch nicht in den Plattenepithelkarzinomen ($p=0,4005$; Abb. 3.6 D).

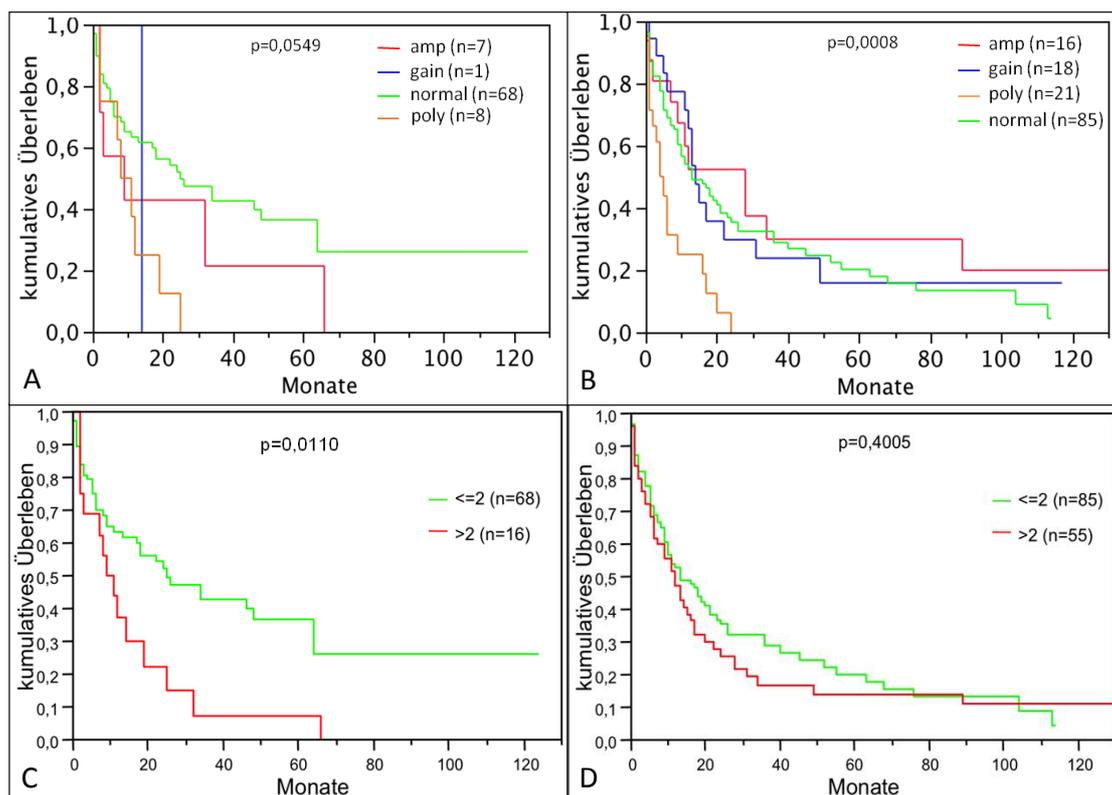


Abbildung 3.6:

Kaplan-Meier Analyse für Amplifikationen, Zugewinne und Polysomien von NRCAM in A) dem Adenokarzinom und B) dem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus sowie für die NRCAM-Genkopiezahl in C) ADC und D) PCA des Ösophaguskarzinoms.

3.3 NRCAM Amplifikation in humanen Tumorzelllinien

Insgesamt 80 von 143 Zelllinien des TMA konnten erfolgreich analysiert werden. Eine NRCAM Amplifikation wurde in 2 Zelllinien gefunden, der Mamma-Karzinom-Zelllinie MCF7 (syn. HTB-22) und der Ovarial-Karzinom Zelllinie OVCAR-4.

Beide Zelllinien zeigten eine vergleichbare NRCAM Kopiezahl mit 6-8 für MCF7 bzw. 4-8 für OVCAR4. Die Chromosom 7-Kopiezahl wurde anhand der Zentromersonde auf 2-4 Kopien bestimmt.

3.4 NRCAM Expression

Die NRCAM Expression konnte in 212 (71,1%) von 298 der Ösophagustumoren des TMA erfolgreich bestimmt werden. Von 86 (28,9%) Tumoren konnte der Expressionsstatus nicht bestimmt werden, da entweder keine Tumorzellen im Gewebespot vorhanden waren oder der Gewebespot auf dem TMA fehlte.

Etwa ein Drittel (30,7%) der 212 analysierbaren Tumoren zeigte keine mit Immunhistochemie detektierbare NRCAM Expression. Von den 147 (69,3%) Tumoren mit detektierbarer Expression zeigten 28 eine schwache, 58 eine mäßige und 61 eine starke Anfärbung.

Tabelle 3.7

Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertung der NRCAM Protein-expression beim A) Adenokarzinom und B) Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.

A)

		n Gesamt	n auswertbar	negativ (5%)	schwach (%)	mäßig (%)	stark (%)	p-Wert
Tumor-stadium	pT1	24	17	17,7	5,9	23,5	52,9	0,5137
	pT2	46	32	31,3	12,5	21,9	34,4	
	pT3	55	48	39,5	13,2	26,3	21,1	
	pT4	4	4	25,0	0	50,0	25,0	
Differenzierungs-grad	G1	1	0	0	0	0	0	0,0707*
	G2	50	33	18,2	9,1	27,3	45,5	
	G3	77	57	40,4	12,3	24,6	22,8	
Nodal-status	N0	34	23	39,1	4,4	13,0	43,5	0,1346
	N+	94	67	29,9	13,4	29,9	26,9	
Fern-metas-tasen	cMO	96	69	36,2	11,6	23,2	29,0	0,3624
	cM+	33	22	18,2	9,1	31,8	40,9	

*G1+G2 vs.G3

B)

		n Gesamt	n auswertbar	negativ (5%)	schwach (%)	mäßig (%)	stark (%)	p-Wert
Tumor-stadium	pT1	24	21	28,6	0	38,1	33,3	0,2564
	pT2	38	28	28,6	21,4	28,6	21,4	
	pT3	89	57	28,1	14,0	31,6	26,3	
	pT4	11	9	22,2	33,3	11,1	33,3	
Differenzierungs-grad	G1	4	1	0	100,0	0	0	0,3431*
	G2	113	78	33,3	12,8	30,8	23,1	
	G3	45	37	18,9	16,2	29,7	35,1	
Nodal-status	N0	67	52	34,6	15,4	26,9	23,1	0,5943
	N+	94	63	23,8	14,3	33,3	28,6	
Fern-metas-tasen	cMO	142	99	28,3	15,2	31,3	25,3	0,8148
	cM+	20	17	29,4	11,8	23,5	35,3	

*G1+G2 vs. G3

Der Vergleich mit den pathologischen und klinischen Parametern des Ösophaguskarzinoms zeigte keine signifikanten Assoziationen (Tabelle 3.7).

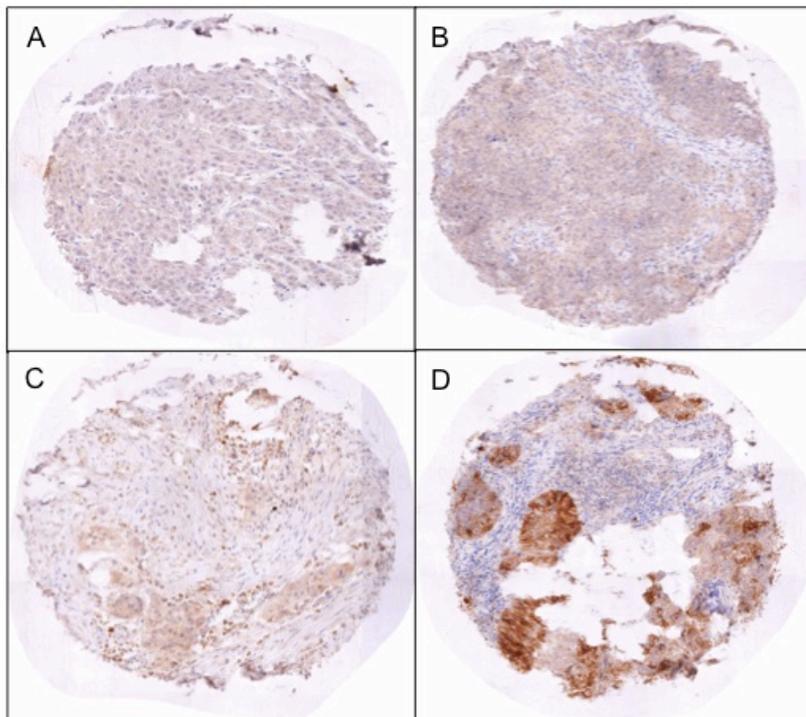
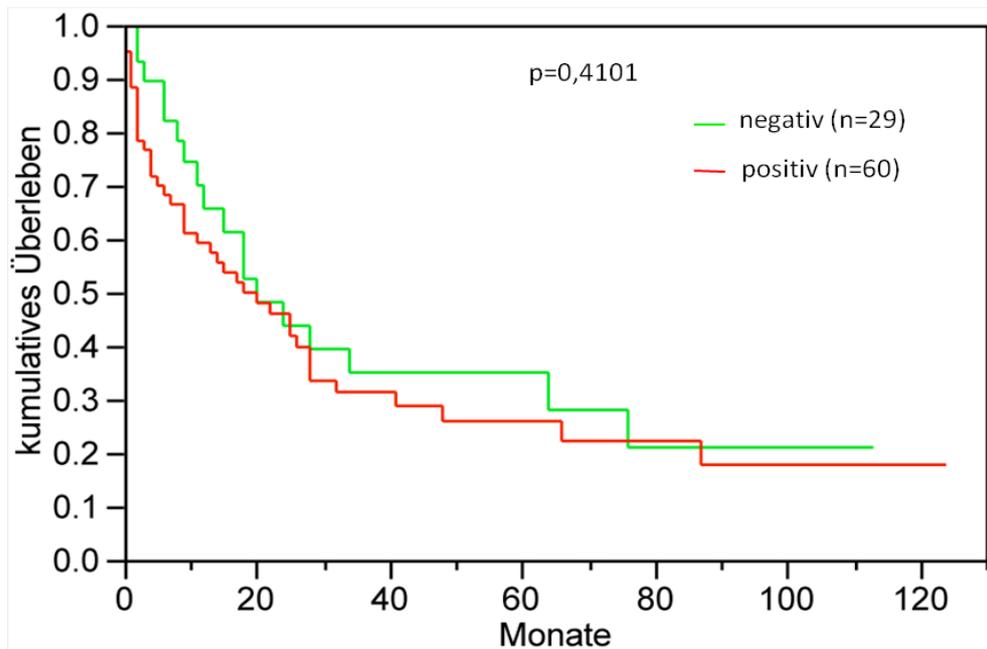


Abbildung 3.7:

Beispiele der NRCAM IHC auf dem Ösophagus TMA (Spot Ø: 0,6mm)
 A) negativ B) schwach C) mäßig D) stark.

Für die immunhistochemische Auswertung der NRCAM Proteinexpression im Zusammenhang mit dem Überleben konnte keine signifikante prognostische Relevanz nachgewiesen werden (Abb. 3.10; $p=0,4101$ und $p=0,2238$). Für diese Auswertung wurden alle NRCAM-positiven Tumore in einer Gruppe zusammengefasst.

A)



B)

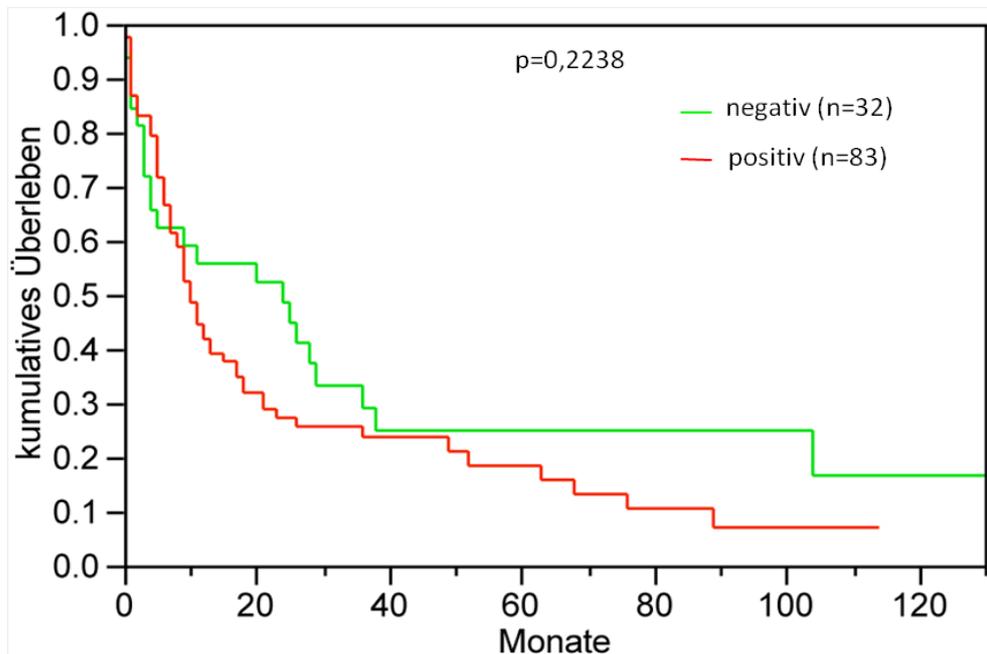


Abbildung 3.8

Einfluss der NRCAM Proteinexpression auf das Patientenüberleben bei A) dem Adenokarzinom und B) dem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.

3.5 Vergleich der NRCAM Genkopiezahl mit der Proteinexpression

Ergebnisse von FISH und IHC waren für 165 der 298 Tumoren (55,4%) vorhanden. Der Vergleich des NRCAM-Amplifikationsstatus mit der Proteinexpression zeigte für das Adenokarzinom, dass 13% der Fälle, die eine stark positive NRCAM-Proteinexpression zeigten, auch amplifiziert waren. Von den Fällen, die ein negatives immunhistochemisches Ergebnis hatten, waren hingegen 0% amplifiziert. Jedoch zeigten sich auch 78% der Tumore mit zwei NRCAM-Genkopiezahlen stark immunhistochemisch angefärbt. Insgesamt ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang (Tabelle 3.8 A).

Auch für das Plattenepithelkarzinom konnte keine eindeutige Übereinstimmung der Proteinexpression mit den Ergebnissen der FISH Analyse gefunden werden. Es zeigten sich beispielsweise gleich viele stark positiv angefärbte Tumoren unter den Polysomien und Gains sowie unter den Amplifikationen. Weiterhin ließ sich sogar eine weitaus größere Anzahl an Tumoren mit zwei NRCAM-Genkopiezahlen stark positiv anfärben (Tabelle 3.8 B).

Tabelle 3.8

Vergleich der NRCAM Amplifikationen (FISH-Analyse) mit der NRCAM Proteinexpression (IHC-Analyse). A) Adenokarzinom B) Plattenepithelkarzinom des Ösophaguskarzinoms.

A)

	n	NRCAM FISH Normal (%)	NRCAM FISH Polysomie (%)	NRCAM FISH Gain (%)	NRCAM FISH Amplifikation (%)	p- Wert
NRCAM IHC negativ	15	86.7	13.3	0.0	0.0	0.5462
NRCAM IHC schwach	7	85.7	0.0	0.0	14.3	
NRCAM IHC mäßig	17	70.6	11.8	5.9	11.8	
NRCAM IHC stark	23	78.3	8.7	0.0	13.0	

B)

	n	NRCAM FISH Normal (%)	NRCAM FISH Polysomie (%)	NRCAM FISH Gain (%)	NRCAM FISH Amplifikation (%)	p- Wert
NRCAM IHC negativ	24	62.5	16.7	16.7	4.2	0.9539
NRCAM IHC schwach	17	70.6	17.7	5.9	5.9	
NRCAM IHC mäßig	29	65.5	10.3	17.2	6.9	
NRCAM IHC stark	28	67.9	10.7	10.7	10.7	

Für die Adenokarzinome wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von NRCAM-Kopiezahlveränderungen (>2 vs. ≤2) zu einem kürzeren Überleben beobachtet (siehe S.52).

Um zu prüfen, ob dieser Zusammenhang unabhängig von den etablierten Prognosefaktoren des Ösophaguskarzinoms war, wurde eine multivariate Analyse durchgeführt (Tab. 3.9). Es zeigte sich keine unabhängige Prognoserelevanz der NRCAM-Kopiezahl.

Tabelle 3.9

Multivariate Analyse: Adenokarzinom
 HR: Hazard ratio; CI: confidence intervall; n=84

Parameter	HR	CI, 95%	p-Wert
T-Stadium			
T2 vs. T1	1,46	0,45 – 6,58	0,5509
T3 vs. T1	2,74	0,85 – 12,44	0,0974
Nodalstatus			
N1 vs. N0	3,98	1,67 – 11,25	0,0011
Differenzierungsgrad			
pG3 vs. P1/2	1,04	0,56 – 1,95	0,9126
NRCAM Kopiezahl			
>2 vs. ≤2	1,03	0,52 – 1,94	0,9382

4 DISKUSSION

4.1 Identifizierung von amplifizierten Genen in humanen Tumoren

Die vorliegende Studie entstand im Rahmen eines Projektes zur Identifizierung und Validierung von amplifizierten Genen in humanen Tumoren. Bei diesen Experimenten wurden unter anderem Ösophagus-Karzinome mittels array-CGH auf DNA-Kopiezahlveränderungen untersucht. In einem von den untersuchten Ösophagustumoren fand sich ein Amplikon auf Chromosom 7q21.1-31.1 mit einer Ausdehnung von 107392518 bis 109503373 bp (ca. 2MB). Innerhalb dieses Amplikons fanden sich sieben proteinkodierende Gene (NRCAM, LAMB1, LAMB4, DNAJB9, PNPLA8, THAP5 und EIF3IP1).

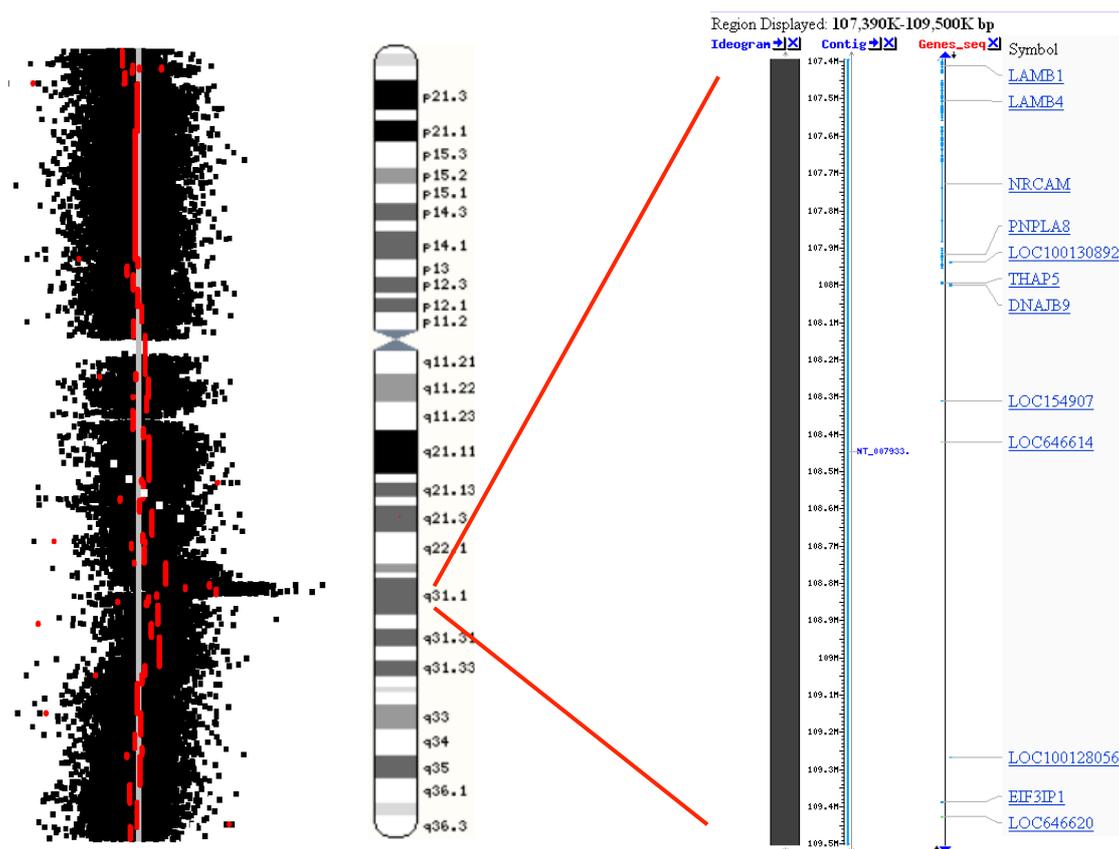


Abbildung 3.11:

Darstellung des Amplikons in der aCGH im Verhältnis zum Chromosom 7 sowie die im Amplikon 7q31.1 enthaltenen Gene.

Das NRCAM Gen wurde für die vorliegende Untersuchung als potenzielles Zielgen der Amplifikation ausgewählt, weil es in zahlreichen Tumorarten einschließlich Neuroblastomen, Schilddrüsenkarzinomen, Rhabdomyosarkomen und Ependymomen mit Tumorwachstum in Verbindung gebracht worden ist (siehe S.64-67).

4.2 NRCAM Amplifikation in humanen Tumoren

In der ersten Phase dieser Studie wurde eine FISH Sonde gegen NRCAM hergestellt und auf einem Multitumor-Array analysiert, um Tumortypen zu identifizieren, die von NRCAM Amplifikationen betroffen sein können.

Diese Analyse zeigte, dass NRCAM Amplifikationen in 5-10% in mehreren Tumortypen vorkommen. Vor allem in Ösophaguskarzinomen wurde in 10 von 73 (13%) Tumoren NRCAM amplifiziert gefunden. Interessanterweise war die Amplifikation in beiden wichtigen histologischen Subtypen des Ösophaguskarzinoms, nämlich dem Plattenepithelkarzinomen (5/36; 13,5%) und dem Adenokarzinomen (5/37; 13,9%), etwa gleich häufig. Da auf dem Multitumor-Array jedoch nur relativ wenige Gewebeproben einer jeden Tumorentität vorhanden sind, müssen die Zahlen zur Amplifikationshäufigkeit mit Vorsicht interpretiert werden. Allerdings deuteten die Daten darauf hin, dass die NRCAM Amplifikation im Vergleich aller Tumortypen besonders häufig in Ösophaguskarzinomen vorhanden sein könnte.

Multitumor-Arrays sind optimal geeignet, um einen umfassenden Überblick über die Prävalenz von molekularen Markern zu erhalten, da sie eine Vielzahl von verschiedenen Tumortypen beinhalten. Allein aufgrund der insgesamt hohen Zahl an Geweben (in diesem Fall über 3.500 Gewebeproben) besteht eine hohe Chance, auch relativ seltene genetische Ereignisse nachweisen zu können. Zudem garantiert die TMA Technologie einen hohen Grad an Standardisierung der Auswertung und somit Konsistenz der Ergebnisse und ist außerdem sehr ressourcenschonend (Kononen *et al.*, 1998). Die parallele Untersuchung einer großen Anzahl von Tumoren ist zudem dann von Vorteil, wenn selbst hergestellte FISH Sonden verwendet werden, die nicht problemlos in gleichbleiben-

der Qualität und in beliebiger Menge hergestellt werden können. Alle Untersuchungen dieser Studie wurden mit demselben Batch Sonde erstellt, so dass davon auszugehen ist, dass kein signifikanter Einfluss der Sondenqualität auf die Versuchsergebnisse vorliegt.

4.3 NRCAM Amplifikation im Ösophaguskarzinom

Basierend auf den Ergebnissen des Multitumor-Arrays, die eine besonders hohe NRCAM Amplifikationsrate im Ösophaguskarzinom zeigten, wurde im zweiten Teil der Studie ein weiterer TMA analysiert, der 298 primäre Ösophaguskarzinome enthielt. Für annähernd alle Tumore dieses TMAs waren klinische Verlaufsdaten, sowie histo-pathologische Daten vorhanden. Es zeigte sich, dass die NRCAM Amplifikationsrate mit 9,9% sehr gut mit den Daten des Multitumor-Arrays übereinstimmte. Auch die nahezu identische Häufigkeit der NRCAM Amplifikation in Adeno- (8%) und Plattenepithelkarzinomen (11%) auf dem Multitumor-Array konnte bestätigt werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die NRCAM Amplifikation keinen besonderen Einfluss auf die Entstehung des einen oder anderen histologischen Subtyps hat.

NRCAM Amplifikationen waren in dieser Studie nicht mit der Patientenprognose assoziiert. Allerdings bedeutet der Mangel an prognostischer Relevanz nicht, dass NRCAM kein potenziell geeignetes Gen für Anti-Tumortherapien sein könnte. Sofern NRCAM auch exprimiert ist, ist zu erwarten, dass NRCAM (oder besser 7q31) amplifizierte Tumore eine massive Expressionssteigerung aufweisen. Dadurch könnte sich ein therapeutisches Fenster für Substanzen eröffnen, die mit NRCAM als Zielstruktur direkt die Tumorzellen attackieren wie z.B. Antikörper mit einem zellschädigenden Konjugat. Der Nutzen oder das Risiko einer solchen Therapie ist aber offensichtlich eng mit dem Expressionsstatus des NRCAM in normalen Geweben verbunden. So bestünde im Falle des NRCAM, welches vor allem in gesunden neuronalen Geweben exprimiert wird, mit Sicherheit die Gefahr von unerwünschten neuronalen Nebenwirkungen.

Eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Häufigkeit der NRCAM Amplifikation und dem Tumorphänotyp konnte in Bezug auf den Nodalstatus und die Fernmetastasierung bei den Adenokarzinomen gefunden werden. Die Amplifikation kommt signifikant häufiger in nodal metastasierten Tumoren vor. Bei den Plattenepithelkarzinomen konnte dies nicht bestätigt werden. Hier zeigten die Daten signifikant häufiger Amplifikationen bei Tumoren mit einem Zugewinn an NRCAM Genkopien („Gain“). Die Daten zeigen auch, dass die NRCAM Amplifikation bei den Adenokarzinomen signifikant häufiger in Tumoren mit Fernmetastasen zu finden ist.

Diese Vermutung wird weiter bekräftigt, wenn nicht der Amplifikationsstatus (d.h. amplifiziert versus „gain“ versus normal), sondern die reine NRCAM-Genkopiezahl untersucht wird. In dieser Analyse zeigte sich, dass eine erhöhte NRCAM-Kopiezahl (>2 Kopien) signifikant häufiger in metastasierten und nodal positiven als in nicht-metastasierten Tumoren zu finden war. Ein solcher Zusammenhang zwischen der Amplifikationshäufigkeit und fortgeschrittenen, schlecht differenzierten Tumoren mit schlechter Prognose ist nahezu typisch für Genamplifikationen. Beispiele hierfür sind HER2 beim Mamma- (Borg *et al.*, 1990; Menard *et al.*, 2001; Tsuda *et al.*, 1990), Harnblasen- (Hauser-Kronberger *et al.*, 2006; Lonn *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 2000) und Magenkarzinom (Mizutani *et al.*, 1993; Tanner *et al.*, 2005) oder C-MYC, FGFR3, MDM2 und E2F3 beim Harnblasenkarzinom (Black & Dinney, 2008; Mahdy *et al.*, 2001; Oeggerli *et al.*, 2004; Simon *et al.*, 2002).

Eine mögliche Erklärung für diesen generellen Zusammenhang ist, dass Genamplifikationen meist erst durch Chromosomenbrüche und fehlerhafte bzw. fehlende DNA-Reparatur entstehen können (Bailey & Murnane, 2006; Bignell *et al.*, 2007; Gisselsson, 2003; Mills *et al.*, 2003). Diese „Voraussetzungen“ existieren typischerweise in den genetisch instabilen Tumoren, die mit dem undifferenzierten Phänotyp einhergehen.

Ähnliche Zusammenhänge wie für NRCAM Amplifikationen wurden für geringgradige NRCAM Zugewinne (sog. „gains“) gefunden. Ein wichtiger Unterschied zwischen „Gains“ und Amplifikationen besteht darin, dass ein „Gain“ meist durch einen Zugewinn eines ganzen Chromosoms (Polysomie) oder großer Bruchstücke von Chromosomen entsteht. Mehr noch als bei Amplifikationen ist

hierbei praktisch immer eine sehr große Zahl von Genen gleichermaßen betroffen. Gains sind somit (wie auch Amplifikationen) vor allem ein Ausdruck für allgemeine genetische Instabilität und nicht für eine spezifische Rolle des NRCAM Gens. Genetische Instabilität und Entdifferenzierung sind aber praktisch bei jedem soliden Tumortyp mit einer schlechten Prognose assoziiert (Ried *et al.*, 1999), z.B. im Mammakarzinom (Carter *et al.*, 2006), Kolonkarzinom (Shackney & Shankey, 1997) (Walther *et al.*, 2008) oder Bronchialkarzinom (Mettu *et al.*, 2010).

Angesichts der Tatsache, dass sowohl Amplifikationen als auch Gains typischerweise eine größere Anzahl von Genen einschließen (selbst die kleinste, mit Array-CGH gefundene 7q31 Amplifikation enthielt neben NRCAM noch weitere sieben Gene), stellt sich die Frage, ob NRCAM tatsächlich das biologisch relevante Zielgen dieser Amplifikation ist.

Die fehlende Assoziation zwischen der NRCAM Amplifikation und der Proteinexpression deutet darauf hin, dass NRCAM zumindest nicht das Gen ist, welches die Entstehung der Amplifikation ursächlich antreibt.

Amplifikationen sind grundsätzlich instabil und werden nur durch den Selektionsvorteil, den die Überexpression eines biologisch relevanten Gens bietet, aufrechterhalten (Weidle *et al.*, 1988). Wäre NRCAM das biologisch relevante Gen innerhalb des Amplikons, müsste es demnach in jedem amplifizierten Tumor auch massiv exprimiert werden.

Vergleichbare Daten wurden auch in einer anderen Studie gefunden, die vergeblich eine NRCAM Amplifikation als potenzielle Ursache für die Überexpression in Astrozytomen und Glioblastomen untersucht hatte (Sehgal *et al.*, 1998).

Die als Ausgangspunkt dieser Arbeit vorhandenen Array-CGH Daten zeigen, dass das NRCAM Amplikon etwa 2,11 Mb umfasst. Neben dem NRCAM Gen liegen etwa sieben weitere Gene im Amplikon, darunter weitere Kandidaten mit möglichem onkogenem Potenzial wie z.B. LAMB1, dessen translationale Hochregulierung die neoplastische Progression von Hepatozyten fördert (Petz *et al.*, 2007) und welches induziert durch IGFBP-2 in Brustkrebszelllinien in der Genexpression hochreguliert ist. Dies wiederum führt zu Proliferation, vermehrter Zellmigration und Adhäsion (Frommer *et al.*, 2006). Um das biologisch

relevante Gen zu finden, müsste nun der Expressionsstatus dieser Gene in 7q31-amplifizierten Tumoren verglichen werden.

Es ist jedoch gut denkbar, dass NRCAM, wenn es in die Amplifikation mit eingeschlossen wird, eine bedeutsame tumorrelevante Rolle spielt. In der Literatur sind bereits verschiedene Tumoren beschrieben, bei denen NRCAM eine potenziell relevante Rolle spielt.

Beispielsweise in kindlichen Neuroblastomen (maligner Tumor des autonomen Nervensystems) wurde NRCAM als β -catenin Zielgen beschrieben und spielt somit eine Rolle in der Tumorgenese (Liu *et al.*, 2008). Dieser Studie zufolge präsentieren sich die Hälfte aller Neuroblastome mit einem aggressiven hochrisiko Phänotyp. Ein Großteil dieser Tumoren weist die Amplifikation des Proto-onkogens MYCN auf, das vermutlich über den WNT/ β -catenin Signalweg für die Ausbildung des aggressiven Phänotyps verantwortlich ist, da MYC ein β -catenin Zielgen ist (Liu *et al.*, 2008). Der Grund für die Ausbildung des aggressiven Phänotyps bei dem übrigen Teil der Tumoren konnte in dieser Untersuchung noch nicht gefunden werden. Es stellte sich außerdem heraus, dass Neuroblastomzelllinien ohne MYCN Amplifikation mehr MYC exprimieren als MYCN amplifizierte Neuroblastomzelllinien.

Bei der Beleuchtung anderer Wege, die zum aggressiven Phänotyp führen könnten, wurde ein alternativer Weg zur Aktivierung des β -catenin Signalwegs in Betracht gezogen, welcher MYC und andere Onkogene aktiviert. Hierbei wurde NRCAM als ein β -catenin Zielgen identifiziert (Liu *et al.*, 2008). Über welchen alternativen Weg zur MYCN Amplifikation maligne entartete Zellen die Fähigkeit erlangen, den β -catenin Signalweg zu aktivieren, ist noch nicht hinreichend geklärt. Sicher ist jedoch, dass in fast allen aggressiven nicht MYCN amplifizierten Neuroblastomen die WNT-Liganden (WNT1, WNT6 u.s.w) sowie β -catenin Zielgene, wie NRCAM, in ihrer Expression hochreguliert sind (Liu *et al.*, 2008). Diese Erkenntnis wird durch eine Untersuchung des Onkogens SKI von (Reed *et al.*, 2005) und (Chen *et al.*, 2003) unterstützt. SKI kann neben seiner bisher bekannten Funktionen auch als transkriptionaler Aktivator des β -catenin Signalweges dienen und damit NRCAM aktivieren (Reed *et al.*, 2005). SKI Überexpression und damit verstärkte Aktivierung von NRCAM ist assoziiert

mit der Progression von humanen Melanomen, Ösophagus-, Mamma- und Kolontumoren (Reed *et al.*, 2005).

Als β -catenin Zielgen wird NRCAM auch von (Conacci-Sorrell *et al.*, 2002) beschrieben. Eine Microarray Analyse von 10.000 Genen ergab, dass NRCAM das am stärksten durch entweder β -catenin oder Plakoglobin (γ -catenin) aktivierte Gen war. Außerdem wurde eine NRCAM Überexpression in humanen Kolonkarzinomgeweben und -zelllinien sowie in humanen malignen Melanomzelllinien im Vergleich zu gesundem Kolongewebe und Melanozyten gefunden. In dieser Studie wurde zudem gezeigt, dass die retrovirale Transduktion von NRCAM in NIH3T3 Zellen das Zellwachstum stimulierte, die Motilität verbesserte und schnellwachsende Tumoren in Mäusen produzierte. Des Weiteren inhibierten NRCAM Antikörper die Motilität von B16 Melanomzellen.

Zusammengefasst ergaben die Untersuchungen, dass das Aktivieren der NRCAM Transkription durch β -catenin eine Rolle in der Tumorgenese von Melanomen und Kolonkarzinomen durch das Antreiben von Zellwachstum und Motilität spielt (Conacci-Sorrell *et al.*, 2002).

Die genauen molekularen Mechanismen und Signalwege, welche der Fähigkeit NRCAMs zur Tumorgenese zugrunde liegen, sind noch ungeklärt. Vermutlich ähneln sie dem Signalweg, welcher im Zusammenhang mit NRCAM und der Wegfindung von Wachstumskegeln diskutiert wird. Hierbei werden Signale via der intrazellulären Domäne NRCAMs auf das Aktinzytoskelet weitergeleitet. 2005 untersuchten (Conacci-Sorrell *et al.*, 2005) diese Mechanismen genauer. Sie fanden heraus, dass die Expression von NRCAM in NIH3T3 Zellen diese in der Abwesenheit von Serum oder Nährstoffen vor Apoptose schützt. Dies geschieht durch Aktivierung der Signalwege der extrazellulär signal-regulierten Kinase und AKT (Proteinkinase 3). Weiterhin entdeckten sie ein Metalloprotease vermitteltes Ausschütten von NRCAM in das Kulturmedium von NRCAM-transfizierten Zellen und B16-Melanoma Zellen mit endogenem NRCAM. Medium und aufgereinigtes NRCAM Fc-Fusionsprotein verbesserten Zellmotilität und Proliferation sowie extrazelluläre signal-regulierte Kinase und AKT Aktivierung. Die Expression der Ektodomäne von NRCAM in NIH3T3 Zellen ermöglichte Zelltransformation und Tumorgenese in Mäusen und führte zu dem Schluss, dass Metalloprotease vermitteltes Ausschütten von NRCAM ins Kul-

turmedium der wesentliche Mechanismus zur Onkogenese ist. Im Umkehrschluss inhibierte die Unterdrückung von NRCAM mit Hilfe von siRNA die adhäsiven und tumorgenerierenden Fähigkeiten in B16 Melanomzellen.

Auch in Ependymomen (Gehirntumore, die ihren Ursprung aus den die Hirnhöhlen und den Rückenmarkskanal auskleidenden Ependymzellen haben) wurde eine Überexpression von NRCAM gefunden (Lukashova-v Zangen *et al.*, 2007). Diese war in der Studie mit einer schlechteren Prognose und einer hohen Tumorproliferationsrate assoziiert. Es ergab sich jedoch kein Zusammenhang zum Tumorstadium, Patientenalter oder Geschlecht (Lukashova-v Zangen *et al.*, 2007).

Weiterhin wird NRCAM im kleinzelligen Bronchialkarzinom überexprimiert und trägt auch hier zur besseren molekularen Abgrenzbarkeit zu anderen histologischen Typen wie dem nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom bei (Taniwaki *et al.*, 2006).

Eine signifikant erhöhte NRCAM Expression wurde auch bei 93,3% von 46 untersuchten primären Schilddrüsenkarzinomen gefunden (Gorka *et al.*, 2007). Außerdem ergab eine QRT-PCR ein um den Faktor 1,3-30,7 erhöhtes Transkriptionslevel von NRCAM in Schilddrüsenkarzinomen im Verhältnis zum gesunden Vergleichsgewebe. Die Höhe der Expression war jedoch unabhängig von Tumorgröße und Staging (Gorka *et al.*, 2007).

Solch einen Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad eines Tumors und der NRCAM Expression konnte aber bei dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas gefunden werden (Dhodapkar *et al.*, 2001). Während sich die NRCAM Expression in intraduktalen Hyperplasien (präneoplastische Läsion) des Pankreas und in gut differenzierten Pankreaskarzinomen hochreguliert zeigte, ist seine Expression in entdifferenzierten Tumoren reduziert oder fehlend. In Lymphknotenmetastasen entdifferenzierter Pankreaskarzinome konnte ebenfalls keine NRCAM Expression gefunden werden. Die Autoren der Studie stellen die Vermutung auf, dass ein Verlust der Expression von NRCAM im Zusammenhang mit der Metastasierungsfähigkeit dieser Tumoren stehen könnte (Dhodapkar *et al.*, 2001).

Auch in Rhabdomyosarkomen (RMS) (bösartige Weichteiltumoren, die aus entarteten Zellen der Skelettmuskulatur herrühren) zeigte sich NRCAM überexprimiert (Lae *et al.*, 2007). Es wurde als downstream Zielgen des PAX-FKHR Fusionsgens identifiziert, welches in dem aggressiveren alveolären RMS im Verhältnis zum embryonalen RMS gehäuft vorkommt. Diese Überexpression wurde nicht weiter untersucht, könnte aber potenziell als zukünftiger Marker zur Unterscheidung der beiden klinisch-morphologisch oft schwer zu differenzierenden RMS dienen (Lae *et al.*, 2007).

Weitere Überexpressionen von NRCAM wurden in humanen Astrozytomen, Gliomen und Glioblastomen sowie Zelllinien dieser Gewebe im Vergleich zu normalen Gehirngewebe gefunden (Sehgal *et al.*, 1998).

In Zelllinien von Meningiomen, Melanomen, normalem Brust- und Prostatagewebe hingegen wurden nur niedrige Expressionslevel gemessen. Ein genomischer Southern Blot zeigte jedoch, dass die Überexpression von NRCAM in Gehirntumoren nicht wie vermutet einer Genamplifikation desselben unterliegt (Sehgal *et al.*, 1998).

Kurz darauf transfizierten (Sehgal *et al.*, 1999) Glioblastomzellen mit Antisense-hNRCAM, welches die native NRCAM Expression reduzierte. Weiterhin verlangsamte es den Zellzyklus und reduzierte die Zellproliferationsrate. Nachdem Antisense-hNRCAM Überexpression *in vitro* eine Reduktion an Kolonien im Agar verursachte, wurde Mäusen subkutan Antisense-hNRCAM überexprimierende Glioblastomzellen gespritzt. Dies führte zu einer totalen Inhibition der Tumorformierung. Auch die Impfung von Antisense-hNRCAM exprimierenden Plasmiden in Glioblastome verlangsamte deren Wachstum in Mäusen.

Diesen Ergebnissen zufolge könnte NRCAM als valides Ziel einer potenziellen Gentherapie von Glioblastomen dienen.

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass durch die Kombination von Multitumor- und Tumortypspezifischen Arrays in kurzer Zeit relevante Daten zur biologischen und klinischen Relevanz von potenziellen Amplifikationszielgenen erhoben werden können. Die erhobenen Daten belegen, dass NRCAM Amplifikationen in etwa 9-13% von Ösophaguskarzinomen vorkommen. Eine signifikante Rolle speziell von NRCAM auf die Biologie und Prognose des Öso-

phaguskarzinoms ist allerdings nicht festzumachen. Nachfolgende Studien können aber das in dieser Studie identifizierte Set an Tumoren mit 7q31 Amplifikation nutzen, um weiter nach dem biologisch relevanten Gen innerhalb des Amplikons zu suchen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde das Amplikon 7q21.1-31.1, welches zuvor in einem Ösophaguskarzinom entdeckt wurde, genauer auf ein potenzielles Zielgen untersucht, das diese Amplifikation verursacht.

Ziel der Arbeit war es, die NRCAM Genamplifikation in humanen Tumoren, insbesondere im Ösophaguskarzinom zu untersuchen. Zur genaueren Analyse wurde das NRCAM Gen ausgewählt, da es Eigenschaften wie z.B. seine Beteiligung an der Zelladhäsion besitzt, die eine ursächliche Wirkung auf Tumorentstehung haben können. Zudem wurde es bereits in Studien mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht.

Die FISH Analyse von NRCAM an einem Multitumor-Array zeigte Amplifikationen in 5-10% in mehreren Tumorarten. Die höchsten Amplifikationsraten mit 13% kamen im Ösophaguskarzinom vor, woraufhin eine Analyse auf dem Ösophaguskarzinomarray zur genaueren Evaluation der Amplifikation in Zusammenhang mit dem Tumorphänotyp sowie dem Patientenüberleben erfolgte.

Diese Analyse zeigte wiederum eine hohe NRCAM Amplifikationsrate von 9,9% im Ösophaguskarzinom. Die NRCAM Amplifikation konnte jedoch in keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Tumorphänotyp sowie der Patientenprognose gebracht werden. Eine abberante NRCAM Kopiezahl („Gain“), ohne der Definition einer Amplifikation zu entsprechen, wurde hingegen häufiger in metastasierten Tumoren gefunden und mit einem signifikant schlechteren Überleben in Verbindung gebracht.

Es erfolgte eine immunhistochemische Analyse der Expression von NRCAM auf dem Ösophaguskarzinomarray. Den Ergebnissen dieser Untersuchung zufolge liegt kein Zusammenhang zwischen der NRCAM Genamplifikation und der NRCAM Expression im Ösophaguskarzinom vor. Genausowenig gibt es einen Zusammenhang zwischen der NRCAM Expression und der Patientenprognose. Dies lässt darauf schließen, dass NRCAM zwar ein amplifiziertes Gen des 7q21.1-31.1 Amplikons ist, jedoch nicht das Zielgen der sieben im Amplikon enthaltenen Gene, welche über eine Überexpression zur Tumorentstehung beitragen könnten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Agranovich, A., McGahan, C. E. & Gurjal, A. (2008). Long-term survivorship of esophageal cancer patients treated with radical intent. *Can J Gastroenterol* **22**, 393-398.

Aitkenhead, M., Wang, S. J., Nakatsu, M. N., Mestas, J., Heard, C. & Hughes, C. C. (2002). Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. *Microvasc Res* **63**, 159-171.

Albanell, J. & Baselga, J. (1999). Trastuzumab, a humanized anti-HER2 monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer. *Drugs Today (Barc)* **35**, 931-946.

Atherfold, PA., Jankowski, JA. (2006). Molecular biology of Barrett's cancer. *Best Pract Clin Gastroenterol* **20**, 813-827.

Bailey, S. M. & Murnane, J. P. (2006). Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res* **34**, 2408-2417.

Beckman, M. (2006). CAMs are stopping cancer in its metastatic tracks. *J Natl Cancer Inst* **98**, 576-577.

Bennett, W. P., von Brevern, M. C., Zhu, S. M., Bartsch, H., Muehlbauer, K. R. & Hollstein, M. C. (1997). p53 mutations in esophageal tumors from a high incidence area of China in relation to patient diet and smoking history. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **6**, 963-966.

Bergquist, H., Johnsson, A., Hammerlid, E., Wenger, U., Lundell, L. & Ruth, M. (2008). Factors predicting survival in patients with advanced oesophageal cancer: a prospective multicentre evaluation. *Aliment Pharmacol Ther* **27**, 385-395.

Besharat, S., Jabbari, A., Semnani, S., Keshtkar, A. & Marjani, J. (2008). Inoperable esophageal cancer and outcome of palliative care. *World J Gastroenterol* **14**, 3725-3728.

Bignell, G. R., Santarius, T., Pole, J. C. & other authors (2007). Architectures of somatic genomic rearrangement in human cancer amplicons at sequence-level resolution. *Genome Res* **17**, 1296-1303.

Black, P. C. & Dinney, C. P. (2008). Growth factors and receptors as prognostic markers in urothelial carcinoma. *Curr Urol Rep* **9**, 55-61.

- Bonora, E., Lamb, J. A., Barnby, G. & other authors (2005).** Mutation screening and association analysis of six candidate genes for autism on chromosome 7q. *Eur J Hum Genet* **13**, 198-207.
- Borchard, F. (2001).** Ösophagus. In *Pathologie*, pp. S. 625-634. Edited by H. D. W. Böcker, PH. U. Heitz. München Yena: Urban & Fischer.
- Borg, A., Tandon, A. K., Sigurdsson, H., Clark, G. M., Ferno, M., Fuqua, S. A., Killander, D. & McGuire, W. L. (1990).** HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* **50**, 4332-4337.
- Boyle, P. & Ferlay, J. (2005).** Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* **16**, 481-488.
- Brown, L. M. (2000).** The role of race/ethnicity in the epidemiology of esophageal cancer. *J Assoc Acad Minor Phys* **11**, 32-37.
- Brown, L. M., Devesa, S. S. & Chow, W. H. (2008).** Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age. *J Natl Cancer Inst* **100**, 1184-1187.
- Brummendorf, T. & Rathjen, F. G. (1993).** Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J Neurochem* **61**, 1207-1219.
- Brummendorf, T. & Rathjen, F. G. (1996).** Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 584-593.
- Cappuzzo, F., Varella-Garcia, M., Finocchiaro, G. & other authors (2008).** Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. *Br J Cancer* **99**, 83-89.
- Carter, S.L., Eklund, A.C., Kohane, I.S., Harris, L.N., Szallasi, Z. (2006).** A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet.* **38**, 1043-1048.
- Castellsague, X., Munoz, N., De Stefani, E., Victora, C. G., Castelletto, R., Rolon, P. A. & Quintana, M. J. (1999).** Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. *Int J Cancer* **82**, 657-664.
- Chao, Y. K., Chan, S. C., Chang, H. K., Liu, Y. H., Wu, Y. C., Hsieh, M. J., Tseng, C. K. & Liu, H. P. (2008).** Salvage surgery after failed chemoradiotherapy in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Eur J Surg Oncol.*
- Chen, D., Xu, W., Bales, E. & other authors (2003).** SKI activates Wnt/beta-catenin signaling in human melanoma. *Cancer Res* **63**, 6626-6634.

- Chuang, S. C., Hashibe, M., Scelo, G. & other authors (2008).** Risk of Second Primary Cancer among Esophageal Cancer Patients: a Pooled Analysis of 13 Cancer Registries. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 1543-1549.
- Conacci-Sorrell, M., Kaplan, A., Raveh, S., Gavert, N., Sakurai, T. & Ben-Ze'ev, A. (2005).** The shed ectodomain of Nr-CAM stimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation. *Cancer Res* **65**, 11605-11612.
- Conacci-Sorrell, M. E., Ben-Yedidia, T., Shtutman, M., Feinstein, E., Einat, P. & Ben-Ze'ev, A. (2002).** Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev* **16**, 2058-2072.
- Cook, M. B., Wild, C. P. & Forman, D. (2005).** A systematic review and meta-analysis of the sex ratio for Barrett's esophagus, erosive reflux disease, and nonerosive reflux disease. *Am J Epidemiol* **162**, 1050-1061.
- Cummings, L. C. & Cooper, G. S. (2008).** Descriptive epidemiology of esophageal carcinoma in the Ohio Cancer Registry. *Cancer Detect Prev* **32**, 87-92.
- Custer, A. W., Kazarinova-Noyes, K., Sakurai, T., Xu, X., Simon, W., Grumet, M. & Shrager, P. (2003).** The role of the ankyrin-binding protein NrCAM in node of Ranvier formation. *J Neurosci* **23**, 10032-10039.
- D'Journo, X. B., Michelet, P., Dahan, L., Doddoli, C., Seitz, J. F., Giudicelli, R., Fuentes, P. A. & Thomas, P. A. (2008).** Indications and outcome of salvage surgery for oesophageal cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* **33**, 1117-1123.
- Davis, J. Q., Lambert, S. & Bennett, V. (1996).** Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol* **135**, 1355-1367.
- de la Rosa, E. J., Kayyem, J. F., Roman, J. M., Stierhof, Y. D., Dreyer, W. J. & Schwarz, U. (1990).** Topologically restricted appearance in the developing chick retinotectal system of Bravo, a neural surface protein: experimental modulation by environmental cues. *J Cell Biol* **111**, 3087-3096.
- Denburg, J. L., Caldwell, R. T. & Marnier, J. M. (1995).** Developmental changes in epitope accessibility as an indicator of multiple states of an immunoglobulin-like neural cell adhesion molecule. *J Comp Neurol* **354**, 533-550.
- Devesa, S. S., Blot, W. J. & Fraumeni, J. F., Jr. (1998).** Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* **83**, 2049-2053.
- Dhodapkar, K. M., Friedlander, D., Scholes, J. & Grumet, M. (2001).** Differential expression of the cell-adhesion molecule Nr-CAM in hyperplastic and neoplastic human pancreatic tissue. *Hum Pathol* **32**, 396-400.

Dzhashiashvili, Y., Zhang, Y., Galinska, J., Lam, I., Grumet, M. & Salzer, J. L. (2007). Nodes of Ranvier and axon initial segments are ankyrin G-dependent domains that assemble by distinct mechanisms. *J Cell Biol* **177**, 857-870.

El-Serag, H. (2008). The association between obesity and GERD: a review of the epidemiological evidence. *Dig Dis Sci* **53**, 2307-2312.

Enzinger, PC., Mayer, RJ.(2003). Esophageal cancer. *N Engl J Med* **361**, 2548-2556.

Eshed, Y., Feinberg, K., Poliak, S., Sabanay, H., Sarig-Nadir, O., Spiegel, I., Bermingham, J. R., Jr. & Peles, E. (2005). Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron* **47**, 215-229.

Eshed, Y., Feinberg, K., Carey, D. J. & Peles, E. (2007). Secreted gliomedin is a perinodal matrix component of peripheral nerves. *J Cell Biol* **177**, 551-562.

Frommer, K. W., Reichenmiller, K., Schutt, B. S., Hoeflich, A., Ranke, M. B., Dodt, G. & Elmlinger, M. W. (2006). IGF-independent effects of IGFBP-2 on the human breast cancer cell line Hs578T. *J Mol Endocrinol* **37**, 13-23.

Fujiwara, S., Noguchi, T., Takeno, S., Kimura, Y., Fumoto, S. & Kawahara, K. (2008). Hypermethylation of p16 gene promoter correlates with loss of p16 expression that results in poorer prognosis in esophageal squamous cell carcinomas. *Dis Esophagus* **21**, 125-131.

Gallo, A. & Cha, C. (2006). Updates on esophageal and gastric cancers. *World J Gastroenterol* **12**, 3237-3242.

Gisselsson, D. (2003). Chromosome instability in cancer: how, when, and why? *Adv Cancer Res* **87**, 1-29.

Glienke, J., Schmitt, A. O., Pilarsky, C., Hinzmann, B., Weiss, B., Rosenthal, A. & Thierauch, K. H. (2000). Differential gene expression by endothelial cells in distinct angiogenic states. *Eur J Biochem* **267**, 2820-2830.

Gordon, C., Kang, J. Y., Neild, P. J. & Maxwell, J. D. (2004). The role of the hiatus hernia in gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* **20**, 719-732.

Gore, R. M. (1997). Esophageal cancer. Clinical and pathologic features. *Radiol Clin North Am* **35**, 243-263.

Gorka, B., Skubis-Zegadlo, J., Mikula, M., Bardadin, K., Paliczka, E. & Czarnocka, B. (2007). NrCAM, a neuronal system cell-adhesion molecule, is induced in papillary thyroid carcinomas. *Br J Cancer* **97**, 531-538.

Greenstein, A. J., Wisnivesky, J. P. & Litle, V. R. (2008). Effect of local therapy for the treatment of superficial esophageal cancer in non-operative candidates. *Dis Esophagus*.

Grumet, M., Mauro, V., Burgoon, M. P., Edelman, G. M. & Cunningham, B. A. (1991). Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* **113**, 1399-1412.

H. Renz-Polster, S. K., J. Braun (2004). *Basislehrbuch Innere Medizin*, 3 edn. München Yena: Urban & Fischer.

Hauser-Kronberger, C., Peham, K., Grall, J., Rausch, W., Hutarew, G. & Dietze, O. (2006). Novel approach of human epidermal growth factor receptor 2 detection in noninvasive and invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* **175**, 875-880; discussion 880.

He, D., Zhang, D. K., Lam, K. Y., Ma, L., Ngan, H. Y., Liu, S. S. & Tsao, S. W. (1997). Prevalence of HPV infection in esophageal squamous cell carcinoma in Chinese patients and its relationship to the p53 gene mutation. *Int J Cancer* **72**, 959-964.

Hedstrom, K. L., Xu, X., Ogawa, Y., Frischknecht, R., Seidenbecher, C. I., Shrager, P. & Rasband, M. N. (2007). Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *J Cell Biol* **178**, 875-886.

Holscher, A. H., Bollschweiler, E., Schneider, P. M. & Siewert, J. R. (1995). Prognosis of early esophageal cancer. Comparison between adeno- and squamous cell carcinoma. *Cancer* **76**, 178-186.

Hutcheson, H. B., Olson, L. M., Bradford, Y., Folstein, S. E., Santangelo, S. L., Sutcliffe, J. S. & Haines, J. L. (2004). Examination of NRCAM, LRRN3, KIAA0716, and LAMB1 as autism candidate genes. *BMC Med Genet* **5**, 12.

Ishiguro, H., Liu, Q. R., Gong, J. P., Hall, F. S., Ujike, H., Morales, M., Sakurai, T., Grumet, M. & Uhl, G. R. (2006). NrCAM in addiction vulnerability: positional cloning, drug-regulation, haplotype-specific expression, and altered drug reward in knockout mice. *Neuropsychopharmacology* **31**, 572-584.

Ishiguro, H., Gong, J. P., Hall, F. S., Arinami, T. & Uhl, G. R. (2008). Association of PTPRB gene polymorphism with drug addiction. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*.

Ito, S., Ohga, T., Saeki, H., Watanabe, M., Kakeji, Y., Morita, M., Yamada, T. & Maehara, Y. (2007). Promoter hypermethylation and quantitative expression analysis of CDKN2A (p14ARF and p16INK4a) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* **27**, 3345-3353.

Johnson, J. P. (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* **10**, 11-22.

Kayyem, J. F., Roman, J. M., de la Rosa, E. J., Schwarz, U. & Dreyer, W. J. (1992). Bravo/Nr-CAM is closely related to the cell adhesion molecules L1 and Ng-CAM and has a similar heterodimer structure. *J Cell Biol* **118**, 1259-1270.

Kelsell, D. P., Risk, J. M., Leigh, I. M. & other authors (1996). Close mapping of the focal non-epidermolytic palmoplantar keratoderma (PPK) locus associated with oesophageal cancer (TOC). *Hum Mol Genet* **5**, 857-860.

Kleinerman, D. I., Troncoso, P., Lin, S. H., Pisters, L. L., Sherwood, E. R., Brooks, T., von Eschenbach, A. C. & Hsieh, J. T. (1995). Consistent expression of an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and loss of expression in prostate cancer: implication as a tumor suppressor. *Cancer Res* **55**, 1215-1220.

Klump, B., Hsieh, C. J., Holzmann, K., Gregor, M. & Porschen, R. (1998). Hypermethylation of the CDKN2/p16 promoter during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* **115**, 1381-1386.

Kok, T. C., Nooter, K., Tjong, A. H. S. P., Smits, H. L. & Ter Schegget, J. T. (1997). No evidence of known types of human papillomavirus in squamous cell cancer of the oesophagus in a low-risk area. Rotterdam Oesophageal Tumour Study Group. *Eur J Cancer* **33**, 1865-1868.

Kollarova, H., Machova, L., Horakova, D., Janoutova, G. & Janout, V. (2007). Epidemiology of esophageal cancer--an overview article. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **151**, 17-20.

Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A. & other authors (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* **4**, 844-847.

Koppert, L. B., Wijnhoven, B. P., van Dekken, H., Tilanus, H. W. & Dinjens, W. N. (2005). The molecular biology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* **92**, 169-190.

Lae, M., Ahn, E. H., Mercado, G. E., Chuai, S., Edgar, M., Pawel, B. R., Olshen, A., Barr, F. G. & Ladanyi, M. (2007). Global gene expression profiling of PAX-FKHR fusion-positive alveolar and PAX-FKHR fusion-negative embryonal rhabdomyosarcomas. *J Pathol* **212**, 143-151.

Lambert, R. & Hainaut, P. (2007). Esophageal cancer: cases and causes (part I). *Endoscopy* **39**, 550-555.

Lambert, S., Davis, J. Q. & Bennett, V. (1997). Morphogenesis of the node of Ranvier: co-clusters of ankyrin and ankyrin-binding integral proteins define early developmental intermediates. *J Neurosci* **17**, 7025-7036.

Lane, R. P., Chen, X. N., Yamakawa, K., Vielmetter, J., Korenberg, J. R. & Dreyer, W. J. (1996). Characterization of a highly conserved human homolog to the chicken neural cell surface protein Bravo/Nr-CAM that maps to chromosome band 7q31. *Genomics* **35**, 456-465.

Launoy, G., Milan, C. H., Faivre, J., Pienkowski, P., Milan, C. I. & Gignoux, M. (1997). Alcohol, tobacco and oesophageal cancer: effects of the duration of consumption, mean intake and current and former consumption. *Br J Cancer* **75**, 1389-1396.

Layke, J. C. & Lopez, P. P. (2006). Esophageal cancer: a review and update. *Am Fam Physician* **73**, 2187-2194.

Lengauer, C., Kinzler, KW., Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643-649.

Lievre, A., Bachet, J. B., Le Corre, D. & other authors (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* **66**, 3992-3995.

Liu, X., Mazanek, P., Dam, V. & other authors (2008). Deregulated Wnt/beta-catenin program in high-risk neuroblastomas without MYCN amplification. *Oncogene* **27**, 1478-1488.

Lonn, U., Lonn, S., Friberg, S., Nilsson, B., Silfversward, C. & Stenkvist, B. (1995). Prognostic value of amplification of c-erb-B2 in bladder carcinoma. *Clin Cancer Res* **1**, 1189-1194.

Low, D. E., Kunz, S., Schembre, D., Otero, H., Malpass, T., Hsi, A., Song, G., Hinke, R. & Kozarek, R. A. (2007). Esophagectomy--it's not just about mortality anymore: standardized perioperative clinical pathways improve outcomes in patients with esophageal cancer. *J Gastrointest Surg* **11**, 1395-1402; discussion 1402.

Lukashova-v Zangen, I., Kneitz, S., Monoranu, C. M., Rutkowski, S., Hinkes, B., Vince, G. H., Huang, B. & Roggendorf, W. (2007). Ependymoma gene expression profiles associated with histological subtype, proliferation, and patient survival. *Acta Neuropathol* **113**, 325-337.

Luu, T. D., Gaur, P., Force, S. D., Staley, C. A., Mansour, K. A., Miller, J. I., Jr. & Miller, D. L. (2008). Neoadjuvant chemoradiation versus chemotherapy for patients undergoing esophagectomy for esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* **85**, 1217-1223; discussion 1223-1214.

Maertens, B., Hopkins, D., Franzke, C. W., Keene, D. R., Bruckner-Tuderman, L., Greenspan, D. S. & Koch, M. (2007). Cleavage and oligomeri-

zation of gliomedin, a transmembrane collagen required for node of ranvier formation. *J Biol Chem* **282**, 10647-10659.

Mahdy, E., Pan, Y., Wang, N., Malmstrom, P. U., Ekman, P. & Bergerheim, U. (2001). Chromosome 8 numerical aberration and C-MYC copy number gain in bladder cancer are linked to stage and grade. *Anticancer Res* **21**, 3167-3173.

Marger, R. S. & Marger, D. (1993). Carcinoma of the esophagus and tylosis. A lethal genetic combination. *Cancer* **72**, 17-19.

Martin, P. M., Carnaud, M., Garcia del Cano, G., Irondelle, M., Irinopoulou, T., Girault, J. A., Dargent, B. & Goutebroze, L. (2008). Schwannomin-interacting protein-1 isoform IQCJ-SCHIP-1 is a late component of nodes of Ranvier and axon initial segments. *J Neurosci* **28**, 6111-6117.

Marui, T., Funatogawa, I., Koishi, S. & other authors (2008). Association of the neuronal cell adhesion molecule (NRCAM) gene variants with autism. *Int J Neuropsychopharmacol*, 1-10.

Mauro, V. P., Krushel, L. A., Cunningham, B. A. & Edelman, G. M. (1992). Homophilic and heterophilic binding activities of Nr-CAM, a nervous system cell adhesion molecule. *J Cell Biol* **119**, 191-202.

McEwen, D. P. & Isom, L. L. (2004). Heterophilic interactions of sodium channel beta1 subunits with axonal and glial cell adhesion molecules. *J Biol Chem* **279**, 52744-52752.

Menard, S., Fortis, S., Castiglioni, F., Agresti, R. & Balsari, A. (2001). HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology* **61 Suppl 2**, 67-72.

Mercer, C. D., Wren, S. F., DaCosta, L. R. & Beck, I. T. (1987). Lower esophageal sphincter pressure and gastroesophageal pressure gradients in excessively obese patients. *J Med* **18**, 135-146.

Messmann, H. (2001). Squamous cell cancer of the oesophagus. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **15**, 249-265.

Mettu, RK., Wan, YW., Habermann, JK., Ried, T., Guo, NL. (2010). A 12-gene genomic instability signature predicts clinical outcomes in multiple cancer types. *Int J Biol Markers* **25**, 219-228.

Mills, KD., Ferguson, DO., Alt, FW. (2003). The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunol Rev* **194**, 77-95.

Miyamoto, H., Kubota, Y., Noguchi, S., Takase, K., Matsuzaki, J., Moriyama, M., Takebayashi, S., Kitamura, H. & Hosaka, M. (2000). C-ERBB-2 gene amplification as a prognostic marker in human bladder cancer. *Urology* **55**, 679-683.

- Mizutani, T., Onda, M., Tokunaga, A., Yamanaka, N. & Sugisaki, Y. (1993).** Relationship of C-erbB-2 protein expression and gene amplification to invasion and metastasis in human gastric cancer. *Cancer* **72**, 2083-2088.
- Montesano, R., Hollstein, M. & Hainaut, P. (1996a).** Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* **69**, 225-235.
- Montesano, R., Hollstein, M. & Hainaut, P. (1996b).** Molecular etiopathogenesis of esophageal cancers. *Ann Ist Super Sanita* **32**, 73-84.
- Morales, G., Hubert, M., Brummendorf, T., Treubert, U., Tarnok, A., Schwarz, U. & Rathjen, F. G. (1993).** Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. *Neuron* **11**, 1113-1122.
- Muto, M., Hironaka, S., Nakane, M., Boku, N., Ohtsu, A. & Yoshida, S. (2002).** Association of multiple Lugol-voiding lesions with synchronous and metachronous esophageal squamous cell carcinoma in patients with head and neck cancer. *Gastrointest Endosc* **56**, 517-521.
- Nabeya, K., Hanaoka, T., Onozawa, K., Ri, S., Nyumura, T. & Kaku, C. (1990).** Early diagnosis of esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* **37**, 368-370.
- Natali, P. G., Hamby, C. V., Felding-Habermann, B., Liang, B., Nicotra, M. R., Di Filippo, F., Giannarelli, D., Temponi, M. & Ferrone, S. (1997).** Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res* **57**, 1554-1560.
- Neumaier, M., Paululat, S., Chan, A., Matthaes, P. & Wagener, C. (1993).** Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10744-10748.
- Oeggerli, M., Tomovska, S., Schraml, P., Calvano-Forte, D., Schafroth, S., Simon, R., Gasser, T., Mihatsch, M. J. & Sauter, G. (2004).** E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene* **23**, 5616-5623.
- Pera, M., Manterola, C., Vidal, O. & Grande, L. (2005).** Epidemiology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* **92**, 151-159.
- Petz, M., Kozina, D., Huber, H., Siwiec, T., Seipelt, J., Sommergruber, W. & Mikulits, W. (2007).** The leader region of Laminin B1 mRNA confers cap-independent translation. *Nucleic Acids Res* **35**, 2473-2482.
- Pickens, A. & Orringer, M. B. (2003).** Geographical distribution and racial disparity in esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* **76**, S1367-1369.

Ra, J., Paulson, E. C., Kucharczuk, J., Armstrong, K., Wirtalla, C., Rappaport-Kelz, R., Kaiser, L. R. & Spitz, F. R. (2008). Postoperative mortality after esophagectomy for cancer: development of a preoperative risk prediction model. *Ann Surg Oncol* **15**, 1577-1584.

Raja, S., Finkelstein, S. D., Baksh, F. K., Gooding, W. E., Swalsky, P. A., Godfrey, T. E., Buenaventura, P. O. & Luketich, J. D. (2001). Correlation between dysplasia and mutations of six tumor suppressor genes in Barrett's esophagus. *Ann Thorac Surg* **72**, 1130-1135.

Reed, J. A., Lin, Q., Chen, D., Mian, I. S. & Medrano, E. E. (2005). SKI pathways inducing progression of human melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **24**, 265-272.

Reichelt, U., Duesedau, P., Tsourlakis, M. & other authors (2007). Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus. *Mod Pathol* **20**, 120-129.

Ried, T., Heselmeyer-Haddad, K., Blegen, H., Schröck, E., Auer, G. (1999). Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. *Genes Chromosomes Cancer* **25**, 195-204.

Risk, J. M., Field, E. A., Field, J. K. & other authors (1994). Tylosis oesophageal cancer mapped. *Nat Genet* **8**, 319-321.

Robert Koch-Institut (Hrsg), G. d. e. K. i. D. e. V. H. (2008). Speiseröhrenkrebs; Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. *Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends* **6. Auflage, Berlin**, 26-30.

Rogers, E. L., Goldkind, S. F., Iseri, O. A., Bustin, M., Goldkind, L., Hamilton, S. R. & Smith, R. L. (1986). Adenocarcinoma of the lower esophagus. A disease primarily of white men with Barrett's esophagus. *J Clin Gastroenterol* **8**, 613-618.

Rösch, W. (2001). Ösophaguskarzinom. In *Duale Reihe: Innere Medizin*, pp. 1000-1004. Stuttgart: Thieme.

Rossini, A. R., Hashimoto, C. L., Iriya, K., Zerbini, C., Baba, E. R. & Moraes-Filho, J. P. (2008). Dietary habits, ethanol and tobacco consumption as predictive factors in the development of esophageal carcinoma in patients with head and neck neoplasms. *Dis Esophagus* **21**, 316-321.

Rygiel, A. M., Milano, F., Ten Kate, F. J., Schaap, A., Wang, K. K., Poppelbosch, M. P., Bergman, J. J. & Krishnadath, K. K. (2008). Gains and Amplifications of c-myc, EGFR, and 20.q13 Loci in the No Dysplasia-Dysplasia-

Adenocarcinoma Sequence of Barrett's Esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 1380-1385.

Sakurai, T., Ramoz, N., Reichert, J. G., Corwin, T. E., Kryzak, L., Smith, C. J., Silverman, J. M., Hollander, E. & Buxbaum, J. D. (2006). Association analysis of the NrCAM gene in autism and in subsets of families with severe obsessive-compulsive or self-stimulatory behaviors. *Psychiatr Genet* **16**, 251-257.

Schuchert, M. J. & Luketich, J. D. (2007). Barrett's esophagus-emerging concepts and controversies. *J Surg Oncol* **95**, 185-189.

Sehgal, A., Boynton, A. L., Young, R. F., Vermeulen, S. S., Yonemura, K. S., Kohler, E. P., Aldape, H. C., Simrell, C. R. & Murphy, G. P. (1998). Cell adhesion molecule Nr-CAM is over-expressed in human brain tumors. *Int J Cancer* **76**, 451-458.

Sehgal, A., Ricks, S., Warrick, J., Boynton, A. L. & Murphy, G. P. (1999). Antisense human neuroglia related cell adhesion molecule hNr-CAM, reduces the tumorigenic properties of human glioblastoma cells. *Anticancer Res* **19**, 4947-4953.

Shackney, S. E. & Shankey, T. V. (1997). Common patterns of genetic evolution in human solid tumors. *Cytometry* **29**, 1-27.

Simon, R., Struckmann, K., Schraml, P. & other authors (2002). Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer. *Oncogene* **21**, 2476-2483.

Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A. & other authors (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707-712.

Stahl, M. & Oliveira, J. (2008). Esophageal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **19 Suppl 2**, ii21-22.

Stallmach, A., von Lampe, B., Matthias, H., Bornhöft, G., Riecken, EO. (1992). Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumour transformation. *Gut* **33**, 342-346.

Stein, H. J. & Siewert, J. R. (1993). Barrett's esophagus: pathogenesis, epidemiology, functional abnormalities, malignant degeneration, and surgical management. *Dysphagia* **8**, 276-288.

Steyerberg, E. W., Neville, B. A., Koppert, L. B., Lemmens, V. E., Tilanus, H. W., Coebergh, J. W., Weeks, J. C. & Earle, C. C. (2006). Surgical mortality in patients with esophageal cancer: development and validation of a simple risk score. *J Clin Oncol* **24**, 4277-4284.

Takeda, S., Tokuno, K., Nishimura, T., Yoshino, S. & Oka, M. (2007). [A clinical study of esophagectomy after chemo-radiation therapy for advanced esophageal carcinoma]. *Gan To Kagaku Ryoho* **34**, 1982-1984.

Taniwaki, M., Daigo, Y., Ishikawa, N., Takano, A., Tsunoda, T., Yasui, W., Inai, K., Kohno, N. & Nakamura, Y. (2006). Gene expression profiles of small-cell lung cancers: molecular signatures of lung cancer. *Int J Oncol* **29**, 567-575.

Tanner, M., Hollmen, M., Junttila, T. T. & other authors (2005). Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* **16**, 273-278.

Tokuda, Y. (2003). Antibodies as molecular target-based therapy: trastuzumab. *Int J Clin Oncol* **8**, 224-229.

Tsuda, H., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Hirota, T., Tsugane, S., Watanabe, S., Terada, M. & Yamamoto, H. (1990). Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erbB-2 gene in breast carcinoma. A retrospective analysis of 176 cases. *Cancer* **65**, 1794-1800.

Uhl, G. R. (2006). Molecular genetics of addiction vulnerability. *NeuroRx* **3**, 295-301.

von Brevern, M., Hollstein, M. C., Risk, J. M., Garde, J., Bennett, W. P., Harris, C. C., Muehlbauer, K. R. & Field, J. K. (1998). Loss of heterozygosity in sporadic oesophageal tumors in the tylosis oesophageal cancer (TOC) gene region of chromosome 17q. *Oncogene* **17**, 2101-2105.

Wagener, C. (1999). *Molekulare Onkologie : Entstehung und Progression maligner Tumoren*, 2 edn. Stuttgart New York: Thieme.

Walther, A., Houlston, R., Tomlinson, I. (2008). Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* **57**, 941-950.

Wang, B., Williams, H., Du, J. S., Terrett, J. & Kenwrick, S. (1998). Alternative Splicing of Human NrCAM in Neural and Nonneural Tissues. *Mol Cell Neurosci* **10**, 287-295.

Weidle, U.H., Buckel, P., Wienberg, J. (1988). Amplified expression constructs for human tissue-type plasminogen activator in Chinese hamster ovary cells: instability in the absence of selective pressure. *Gene* **66**, 193-203.

Werner, M., Mueller, J., Walch, A. & Hofler, H. (1999). The molecular pathology of Barrett's esophagus. *Histol Histopathol* **14**, 553-559.

Wilson, M., Rosato, E. L., Chojnacki, K. A., Chervoneva, I., Kairys, J. C., Cohn, H. E., Rosato, F. E., Sr. & Berger, A. C. (2008). Prognostic significance

of lymph node metastases and ratio in esophageal cancer. *J Surg Res* **146**, 11-15.

Wu, X., Chen, V. W., Ruiz, B., Andrews, P., Su, L. J. & Correa, P. (2006). Incidence of esophageal and gastric carcinomas among American Asians/Pacific Islanders, whites, and blacks: subsite and histology differences. *Cancer* **106**, 683-692.

Yao, P. F., Li, G. C., Li, J. & other authors (2006). Evidence of human papilloma virus infection and its epidemiology in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* **12**, 1352-1355.

Yokoyama, A., Omori, T., Yokoyama, T., Sato, Y., Kawakubo, H. & Maruyama, K. (2008). Risk of metachronous squamous cell carcinoma in the upper aerodigestive tract of Japanese alcoholic men with esophageal squamous cell carcinoma: a long-term endoscopic follow-up study. *Cancer Sci* **99**, 1164-1171.

Yu, Y., Taylor, P. R., Li, J. Y. & other authors (1993). Retrospective cohort study of risk-factors for esophageal cancer in Linxian, People's Republic of China. *Cancer Causes Control* **4**, 195-202.

Zhang, H., Chen, S. H. & Li, Y. M. (2004). Epidemiological investigation of esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* **10**, 1834-1835.

7 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. G. Sauter danke ich herzlich dafür, dass er es mir möglich gemacht hat, diese Dissertation am Institut für Pathologie durchzuführen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. R. Simon, der mich durch seine engagierte und persönliche Betreuung und wertvollen Anregungen bereicherte und mich mit zahlreichen Ratschlägen sowie interessanten Diskussionen immer tatkräftig bei der Ausarbeitung dieser Arbeit unterstützt hat.

Für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten möchte ich Pierre Tennstedt danken.

Des Weiteren gilt mein Dank Frederik Holst und Antje Krohn für die wertvolle Unterstützung im Labor.

Für die freundliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft im Labor möchte ich mich bei Silvia Schnöger und Sascha Eghtessadi bedanken.

Zuletzt möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts danken, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

8 LEBENS LAUF

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

9 ERKLÄRUNG

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: _____