

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Institut für Pathologie- Sektion Molekularpathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

## **PDX1-Amplifikationen im humanen Kolonkarzinom**

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

vorgelegt von:

Caroline Lück

Hamburg 2012

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 05.03.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:            Herr Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:        Herr PD Dr. rer. nat. R. Simon

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter:        Herr Prof. Dr. J. Izbicki

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	4
1.1. Das kolorektale Karzinom.....	4
1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie .....	4
1.1.2. Prävention, Klinik und Staging.....	5
1.1.3. Therapie .....	7
1.1.4. Genetik.....	8
1.2. PDX1 .....	12
1.3. Das PDX1-Amplikon.....	14
1.4. Ziel der Arbeit .....	15
<b>2. Material und Methoden</b> .....	16
2.1. Material.....	16
2.1.1. Multitumor Tissue-Microarray .....	16
2.1.2. Kolorektaler Adenom Tissue-Microarray .....	18
2.1.3. Kolonkarzinom Tissue-Microarray .....	18
2.1.4. Zelllinien Tissue-Microarray.....	20
2.1.5. pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung.....	21
2.1.6. DNS-Extraktion aus der E.coli-Kultur .....	21
2.1.7. DNS-Markierung mittels Nick-Translation.....	22
2.1.8. FISH .....	22
2.2. Methoden .....	24
2.2.1. FISH .....	24
2.2.2. Auswahl und Anzucht von BAC Klonen.....	25
2.2.3. DNS-Extraktion.....	25
2.2.5. Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung.....	26
2.2.6. Hybridisierung .....	27
2.2.8. Fluoreszenz-Detektion.....	28
2.2.9. Auswertung .....	28
2.3. Statistik.....	29

<b>3. Ergebnisse</b> .....	30
3.1. PDX1-Amplifikationen in humanen Tumoren.....	30
3.2. PDX1-Amplifikationen in Kolonadenomen.....	31
3.3. PDX1-Amplifikationen in Kolonkarzinomen .....	31
3.3.1. Technische Resultate.....	31
3.3.2. Assoziation zum Phänotyp .....	32
3.3.3. Assoziation zu molekularen Markern des Kolonkarzinoms.....	33
3.3.4. PDX1-Amplifikationen und die Prognose von KRK-Patienten .....	34
3.4. PDX1-Amplifikation in humanen Tumorzelllinien.....	35
<b>4. Diskussion</b> .....	36
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	44
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	46
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	48
<b>8. Danksagung</b> .....	68
<b>9. Anhang</b> .....	69
<b>10. Eidesstattliche Versicherung</b> .....	73

# 1. Einleitung

## 1.1. Das kolorektale Karzinom

### 1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Das kolorektale Karzinom (KRK), zu dem Karzinome des Kolons und des Mastdarms zählen, ist die zweithäufigste Krebserkrankung (Abb. 1) und Krebstodesursache in Deutschland. Dank des Fortschritts in Früherkennung und Therapie hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate seit den 80er Jahren von 50 % auf Werte zwischen 53 und 63% verbessert, dennoch verstarben 2006 über 27.000 Menschen in Deutschland an diesem Tumor [1].

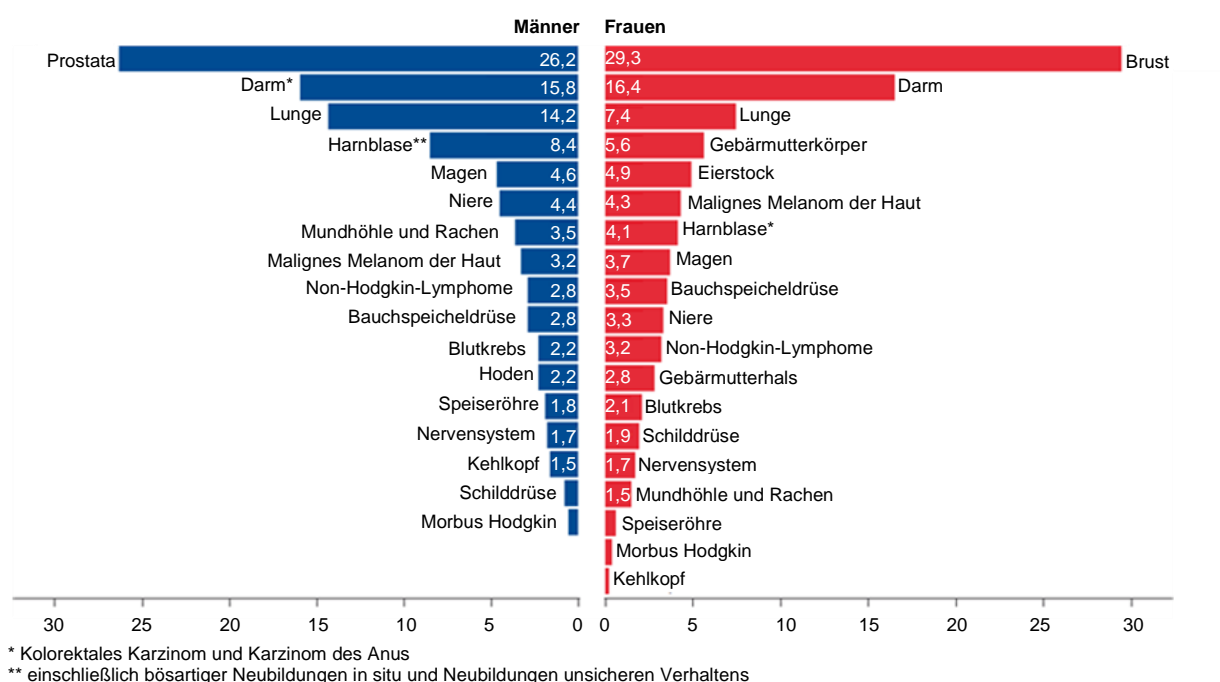


Abb. 1: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) in Deutschland 2006 [1].

Als auslösende Faktoren für die Entartung der Darmzellen werden die hohe metabolische Aktivität der Darmflora und in den Darm gelangte Karzinogene gesehen, die zur Epithelschädigung und später zu Malignität des Gewebes führen können [2].

Es gibt zudem zahlreiche Faktoren, die ein KRK begünstigen. Genetische Erkrankungen wie das hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) oder die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) führen mit einer Wahrscheinlichkeit von 80 bzw. 100 % zu der Tumorerkrankung [3]. Hier liegen bereits in der Keimbahn mutierte Gene zugrunde (s. S. 8 und 9). Weitere Risikofaktoren sind langjährige

chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, die Familienanamnese eines KRKs und Einflüsse der Lebensführung wie ballaststoffarme, fett- und fleischreiche Ernährung, Übergewicht und langjähriger Zigaretten- und Alkoholkonsum [1]. Nicht steroidale Antiphlogistika, die über Cyclooxygenase abhängige und unabhängige Mechanismen Apoptose induzieren, scheinen protektiv zu wirken [4-7]. Sie werden aber in den aktuellen S3-Leitlinien „Kolorektales Karzinom“ aufgrund der noch unklaren Datenlage nicht empfohlen [8].

### **1.1.2. Prävention, Klinik und Staging**

Da das KRK lange klinisch stumm bleibt, ist eine Früherkennung essentiell. Zum Screening werden derzeit in Deutschland hauptsächlich die digital-rektale Untersuchung, der fäkale okkulte Bluttest (FOBT) und die Koloskopie eingesetzt.

Der FOBT ist kostengünstig, hat praktisch keine Nebenwirkungen und kann die tumorbedingte Mortalität um durchschnittlich 14 % senken. Bei positivem Ergebnis muss eine Darmendoskopie erfolgen. Die komplette Koloskopie erlaubt eine genaue Diagnostik und gleichzeitige Primärprävention, da auffällige Adenome, die Vorstufen für Darmkrebs darstellen, sofort entfernt werden können. Sie wird auch als alleiniges Screening-Instrument eingesetzt. Obwohl das Verfahren ab dem 55. Lebensjahr von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen wird, ist die Inanspruchnahme aufgrund der körperlichen Unannehmlichkeiten für den Patienten nicht hoch [1, 9].

Neue Tests, die tumorspezifische molekulare Veränderungen auf DNS- oder Proteinebene in Stuhl und Serum suchen, versprechen Abhilfe. Wenn mit diesen in Zukunft tumoröse Vorstufen und das KRK sicher erkannt werden, entfallen viele unnötige Koloskopien [10, 11]. Vielversprechende Marker sind beispielsweise sCD26 (soluble Cluster of Differentiation 26) oder Bone Sialoprotein. Damit entsprechende Tests klinisch eingesetzt werden können, müssen sie noch an größeren Populationen getestet werden [10, 12]. CEA (Carcinoembryonales Antigen) und CA-19.9 (Carbohydrate Antigen 19.9) können beim Kolonkarzinom auch erhöht sein, sie eignen sich wegen der geringen Spezifität nicht für ein Screening, aber zur Therapiekontrolle bzw. der Rezidivfrüherkennung [13].

Ein kolorektales Karzinom kann durch lokale Anzeichen wie Blutbeimengungen im Stuhl, Blähungen, Verstopfung und Ileussympptome oder durch allgemeine Krankheitszeichen wie Anämie, Leistungsminderung und Gewichtsverlust auffallen [14].

Bei Verdacht auf diesen Tumor wird eine Koloskopie durchgeführt, wobei der Dickdarm nicht nur systematisch abgesucht, sondern zugleich eine Biopsie von suspekten Befunden entnommen und somit die Diagnose histologisch gesichert werden kann. Wenn ein invasives KRK diagnostiziert wird, schließt sich eine Staging-Diagnostik an, um mögliche Metastasen zu finden. Zu dieser zählt ein Röntgen-Thorax in zwei Ebenen und eine Abdomensonographie, bei unklaren Befunden CT-Aufnahmen. Der Tumor wächst per continuitatem durch die Darmwand und breitet sich über die regionalen Lymphabflusswege und hämatogen über das venöse Abflusssystem aus, was primär zu Streuherden in Leber, später auch in Lunge, Skelett und Peritoneum führt. Beim tiefsitzenden Rektumkarzinom erfolgt die primäre Metastasierung in die Lunge.

Das Kolonkarzinom wird entsprechend seiner Histologie, der Infiltrationstiefe, den Lymph- und Fernmetastasen im TNM-System klassifiziert (s.Tab.1). Histologisch unterscheidet man zwischen Adenokarzinomen, welche mit 95 % die größte Gruppe stellen, kleinzelligen, Plattenepithel- und undifferenzierten Karzinomen. Das Karzinom entsteht in über 90 % der Fälle aus gutartigen Adenomen [15, 16].

Tab. 1: Einteilung des KRK im TNM-System [15]. T= Tumor: Ausdehnung des Primärtumors; N= Nodus: Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen; M=Metastasen: Vorhandensein von Fernmetastasen

<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor infiltriert die Submukosa
<b>T2</b>	Tumor infiltriert die Muscularis propria
<b>T3</b>	Tumor infiltriert die Subserosa
<b>T4</b>	Tumor infiltriert andere Organe/Strukturen
<b>N0</b>	Kein Anhalt für Lymphknotenmetastasen (mind. 12 untersuchte Lymphknoten)
<b>N1</b>	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
<b>N2</b>	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
<b>M0</b>	Kein Anhalt für Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen gesichert

Auf Basis der TNM-Klassifikation wird jedes KRK in die UICC-Stadiengruppierung 0-IV (Union internationale contre le cancer, 2002) eingeteilt. Die Stadien sind mit unterschiedlichen Prognosen verbunden (s. Tab. 2).

Tab. 2 : Stadieneinteilung des KRK nach UICC-Klassifikation und die damit verbundene Prognose [16]. 5-JÜR= 5-Jahres-Überlebensrate

UICC	Definition	5-JÜR
I	T1-2 N0 M0	>90 %
II	T3-4 N0 M0	70- 90 %
III	Tx N1-2 M0	40- 75 % je nach N-Stadium
IV	Tx Nx M1	<30 %

### 1.1.3. Therapie

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms besteht je nach UICC-Stadium aus chirurgischen Maßnahmen, Radio- und Chemotherapie. Der kurative Ansatz setzt eine radikale Tumorsektion mitsamt den lokalen Lymphknoten voraus.

Beim Kolonkarzinom wird das tumortragende Darmstück en-bloc und in der sogenannten „no-touch“-Technik entfernt, um eine Streuung von Tumorzellen in den Bauchraum zu vermeiden. Ab dem UICC-Stadium III schließt sich eine adjuvante Chemotherapie mit Oxaliplatin und 5-Flourouracil an, womit in 70 % der Fälle eine 5-Jahres-Tumorfreiheit erreicht werden kann.

Beim Rektumkarzinom wird je nach Ausbreitung des Tumors entschieden, ob sphinktererhaltend operiert werden kann. Fortgeschrittene rektale Tumoren werden ab dem UICC-Stadium II mit einer neoadjuvanten kombinierten Radio-Chemotherapie behandelt, die unter Umständen noch einen Sphinktererhalt ermöglicht und das Risiko eines Lokalrezidivs um 50 % senkt.

Nach einer Therapie mit kurativer Intention treten trotzdem in 10- 30 % loko-regionäre Rezidive auf. Isolierte Lungen- oder Lebermetastasen können manchmal noch kurativ reseziert werden, meist kommen dann aber palliative Methoden zum Einsatz. Bei stenosierenden Tumoren können das Abtragen von Tumorteilen, die Einlage von Stents und Anlagen einer Umgehungsanastomose oder eines Anus praeter naturalis helfen. Eine Polychemotherapie mit 5-Fluoruracil und Oxaliplatin bzw. Irinotecan wird empfohlen, wodurch sich die durchschnittliche Überlebenszeit auf über 20 Monate verlängert.

In den letzten Jahren werden zusätzlich zur Chemotherapie bestimmte Formen der Immuntherapie bei der Behandlung des KRK im UICC-Stadium IV eingesetzt. Das Immunsystem eliminiert normalerweise laufend entartete Zellen, die auch im gesunden Menschen entstehen. Dieser Vorgang, der bei Krebspatienten nicht mehr greift, soll in der Krebsimmuntherapie initiiert bzw. unterstützt werden. Während viele



vielversprechende Ansätze die experimentelle Phase noch nicht überwunden haben, ist die Behandlung des KRKs mit Antikörpern gegen spezifische Tumorantigene für das UICC-Stadium IV zugelassen [17]. Dabei richtet sich ein monoklonaler Antikörper zum Beispiel gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) [18, 19]. EGFR ist Teil eines Signalweges, der in vielen KRKs dereguliert vorkommt [20]. 60-80 % der metastasierten Kolonkarzinome zeigen eine EGFR-Überexpression [21, 22] und sind so einer Antikörpertherapie zugänglich. Der Mutationsstatus von KRAS, das downstream von EGFR wirkt, ist ein prädiktiver Faktor für ein Ansprechen auf die Therapie [18, 20, 23-27]. Da die Therapie trotzdem nur bei 40- 70 % der Patienten mit KRAS-Wildtyp anschlägt [28], wird nach weiteren prädiktiven Markern gesucht. Eine erhöhte EGFR-Kopiezahl hat in Kombination mit dem KRAS-Wildtyp eine höhere Voraussagekraft [29-35], bislang haben sich daraus aber keine therapeutischen Konsequenzen ergeben [8].

#### **1.1.4. Genetik**

Die genetischen Mechanismen, die die Tumorigenese des KRKs bestimmen, werden seit Jahren intensiv beforscht. Schon 1974 stellte Morson die Adenom-Karzinom-Sequenz als Modell für die Genese des KRKs vor. Sie nimmt eine kontinuierliche Entwicklung von gesundem Kolonepithel über ein Adenom zu einem Karzinom an [36].

Nach Vogelstein und Kinzler liegen die Ursachen für die Adenom-Karzinom-Sequenz in der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und der Aktivierung von Onkogenen [37]. Demnach sind sukzessive die Gene APC (adenomatous polyposis coli) [38], KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) [39], DCC/SMAD4 (Deleted in Colon Cancer/mothers against DPP homolog 4) [40, 41] und Tumorprotein p53 [42] von einem Allelverlust (Loss of Heterozygosity) und/oder Mutationen betroffen (Abb. 2).

Bei der hereditären Erkrankung „familiäre adenomatöse Polyposis“ ist ein Allel von APC bereits in der Keimbahn durch Mutation inaktiviert. Bei Ausfall des zweiten, noch funktionsfähigen Allels wird das tumoröse Wachstum im Kolon initiiert. Es entwickeln sich zum Teil Hunderte Polypen im Dickdarm dieser Patienten, aus welchen unbehandelt in 100 % der Patienten ein Kolonkarzinom entsteht [43].

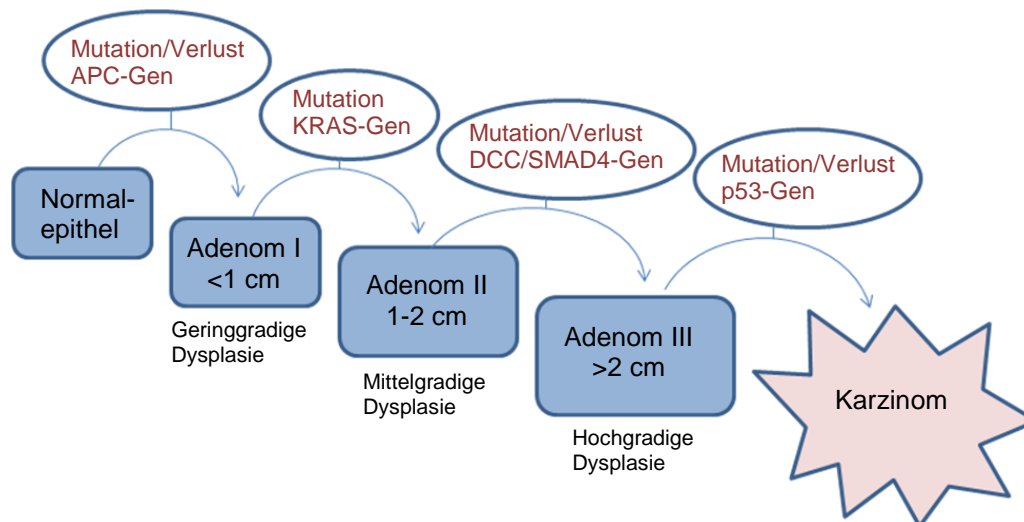


Abb. 2: Die Adenom-Karzinom-Sequenz [17]. Es wird die Entwicklung von gesunder Darmschleimhaut zu einem Adenokarzinom gezeigt. Hierbei führen Mutationen und/oder Verluste von bestimmten Genen zur Karzinombildung (s. S. 8).

In den meisten Kolonkarzinomen besteht eine genetische Instabilität, die mit einer erhöhten Mutationsrate einhergeht [44, 45].

Eine weitere Form der genetischen Instabilität kann aus dem Ausfall des Mismatch Repair Systems resultieren. Ein vererbbares Syndrom, das „hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom“, gab darauf die entscheidenden Hinweise. Die Betroffenen haben kaum Polypen im Dickdarm, können aber innerhalb weniger Jahre invasive Kolonkarzinome entwickeln [46]. In der Keimbahn mutierte Mismatch Repair (MMR) Gene liegen diesem Krankheitsgeschehen zugrunde. Das Reparatursystem korrigiert falsch gepaarte Nukleotide der Desoxyribonukleinsäure (DNS). Wenn eine Störung dieser Mechanismen vorliegt, fällt dies vor allem an den Mikrosatelliten auf. Mikrosatelliten sind kurze, nicht kodierende DNS-Sequenzen, die im gesamten Genom vorkommen und sich durch fehlende Reparatur verlängern oder verkürzen. Molekulargenetisch werden Karzinome, in denen das MMR ausgefallen ist, deshalb durch die sogenannte Mikrosatelliteninstabilität (MSI) charakterisiert [47]. Beim spontanen Kolonkarzinom der westlichen Hemisphäre tritt MSI in 10 % der Fälle auf [48], hier ist die Ursache aber keine Mutation wie beim HNPCC, sondern eine epigenetische Aberration. Das Mismatch Repair Gen hMLH1 (mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2) liegt in solchen Tumoren hypermethyliert vor. Dies ereignet sich meistens im Rahmen des CpG island methylation pathway (CIMP), einem neu beschriebenen Tumorigenesepfad. Er zeichnet sich durch epigenetische Veränderungen an DNS-Regionen aus, in denen es eine hohe Zahl von Cytosin- und Guanin-Basenpaaren gibt, die durch Phosphodiester gebunden sind (CpG). Durch

die Hypermethylierung wird hMLH1 inaktiviert („silenced“) [49, 50]. CIMP spielt nicht nur bei MSI-positiven KRKs eine Rolle. In einigen Kolonkarzinomen werden Tumorsuppressorgene wie p16 (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), THBS1 (thrombospondin 1) [51] und Cyclooxygenase 2 [52] durch die Hypermethylierung inaktiviert. Die Inzidenz von CIMP ohne Mikrosatelliteninstabilität wird mit 5- 10 % angegeben [48].

Eine chromosomale Instabilität (CIN) kommt mit 40 % am häufigsten im KRK vor [48]. CIN beschreibt einen Prozess, in dem Krebszellen während der Mitose ihre Chromosomen mit verminderter Sorgfalt trennen, was zu Aneuploidie und dem Verlust der Heterozygotie führen kann und somit die Tumorigenese schneller voranschreiten lässt [53]. Wahrscheinlich sind hierbei mehrere Mechanismen verändert, die sich während der Mitose abspielen [54]. Mutationen in Genen, die zur Schwesterchromatid-Kohäsion beitragen, sind als Auslöser von CIN identifiziert worden [55, 56] und auch zellzykluskontrollierende Gene wie das Tumorsuppressorgen p53 spielen eine Rolle bei der Entwicklung von CIN [54, 57, 58]. p53 ist ein komplexes Protein, das vor allem mit der Integrität des Genoms betraut ist und deshalb auch „Wächter des Genoms“ genannt wird. Die Hauptfunktionen, die gegen ein Malignomwachstum greifen, sind der G0-Zyklusarrest und die Einleitung der Apoptose, wenn DNS-Schäden zu groß für Reparaturen sind [59]. Wenn p53 mutiert vorliegt, kann trotz beschädigter DNS die Zellteilung eingeleitet werden und multiple, onkogen wirkende Veränderungen wie Aneuploidien, Deletionen, Translokationen und Amplifikationen können entstehen. Die verschiedenen genetischen Instabilitätswege im KRK mit ihren sich überlappenden Beziehungen werden in Abbildung 3 dargestellt.

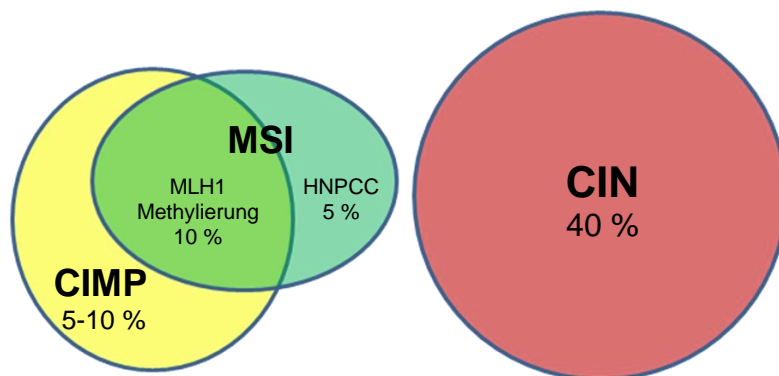


Abb.3. Es werden die verschiedenen genetischen Instabilitätswege im KRK mit ihren sich überlappenden Beziehungen dargestellt. Die Anteile, die die genetischen Instabilitätswege am KRK ausmachen, sind prozentual angegeben. CIMP= CpG island methylation pathway, MSI= Mikrosatelliteninstabilität, CIN= chromosomale Instabilität (verändert nach S. Markowitz und M. Bertagnolli 2009, Abb. 3 [60]).

Amplifikationen sind Vervielfachungen begrenzter DNS-Bereiche. Man unterscheidet zwischen intrachromosomal gelegenen „homogeneously staining regions“ und extrachromosomalen Double-Minutes [61]. Die Wirkung beider Amplifikationsformen ist dieselbe: das amplifizierte Zielgen wird vermehrt transkribiert und entfaltet seine maligne Wirkung durch die Überexpression [62].

In malignen humanen Tumoren kommen Amplifikationen in 10- 50 % der Fälle vor [61]. In Neuroblastomen beispielsweise ist N-MYC (neuroblastoma-derived v-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene) in bis zu 40 % der Fälle amplifiziert und bestimmt die Prognose [63]. EGFR-Amplifikationen kommen in bis zu 50 % der Glioblastome vor [64] und im Blasenkrebs ist die E2F3 (E2F transcription factor 3)-Amplifikation stark mit einem invasivem Tumorwachstum assoziiert [65]. Neu identifizierte amplifizierte Regionen deuten dementsprechend auf putative Onkogene hin.

Manche Amplifikationen können therapeutisch genutzt werden. Beim Mammakarzinom hat die Amplifikation von HER2 (v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2), die in 20- 25 % der Tumore nachgewiesen wird [66], herausragende Bedeutung erlangt. HER2 ist ein Wachstumsfaktor, der in besonders aggressiven Tumortypen des Mammakarzinoms durch Amplifikation überexprimiert wird. Durch den an HER2 spezifisch bindenden Antikörper Herceptin wird die Weiterleitung des Signals, das das Zellwachstum anregt, verhindert. Der gezielte Angriff auf ein vorwiegend in der Tumorzelle vorkommendes Merkmal ermöglicht eine relativ nebenwirkungsarme Therapie. Zudem kann die Behandlung jener Patienten vermieden werden, die von einer Therapie aufgrund einer fehlenden HER2-Amplifikation ohnehin nicht profitieren.

Für das Kolonkarzinom ist keine typische Amplifikation bekannt, es existieren viele amplifizierte Gene mit normalerweise geringen Häufigkeiten. Al-Kuraya et al. ermittelten in 518 untersuchten Karzinomen Amplifikationsraten von 2,2- 13,5 % für HER2, Cyclin D1, EGFR und C-MYC (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog) [67]. Für EGFR exprimierende KRKs steht eine gezielte Therapie (Target-Therapie) in Form eines monoklonalen Antikörpers zur Verfügung (s. S. 8).

Da Amplifikationen potentiell gute molekulare Angriffsziele bieten, könnten neu entdeckte amplifizierte Gene eine individuelle und effektive Therapie des KRKs

ermöglichen. Selbst bei niedrigen Amplifikationsraten würden bei jährlich 28.000 Neuerkrankten noch viele Patienten behandelt werden können [1].

## 1.2. PDX1

In einer Studie wurde mit Proben eines metastasierten Kolonkarzinoms evaluiert, ob das Protein PDX1 (Pancreatic and duodenal homeobox gene 1) sich als Tumormarker eignet. Es wurde von einer sich graduell steigenden PDX1-Expression vom Normalgewebe zum Primärtumor bis zu der Metastase berichtet [68]. Eine Überexpression kann durch eine Amplifikation ausgelöst sein (s. S. 11). PDX1 könnte demnach in einem Teil der Kolonkarzinome amplifiziert sein und womöglich eine gezielte Antikörpertherapie ermöglichen oder die Prognose mitbestimmen.

PDX1, auch bekannt unter STF1 (somatostatin transactivating factor 1), IPF1 (insulin promoter factor 1), IUF1 (insulin upstream factor 1) und IDX1 (islet/duodenum homeobox 1), ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Insulin in vitro initiiert [69] und wichtig für die Entwicklung und Differenzierung des Pankreas, der endokrinen Zellen des Magens und des Duodenums ist [70, 71]. Das Protein wird auch in sich entwickelnden Neuronen und in der Epidermis exprimiert [72, 73].

PDX1 ist ein zu der Hox Gruppe gehörendes Gen aus der Familie der Homeobox-Gene [74]. Das humane Gen besteht aus zwei Exons, die etwa fünf Kilobasenpaare auf Chromosom 13 umfassen. Das zweite Exon kodiert für die Homeodomäne [75], die unter anderem bei der Transkription die spezifische Bindung an den DNS-Strang vermittelt [76].

PDX1 nimmt bei Mäusen in der Beta-Zelle eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Beta-Zell-Differenzierung, der Glukose-Wahrnehmung und der Insulinsynthese [77] ein und reguliert die Amylin-Expression [78]. Mutationen von PDX1 gehen beim Menschen mit MODY (maturity onset diabetes of the young) einher [79], bei Mäusen führt die experimentelle Blockade des Proteins zu einer eingeschränkten Glukosehomeostase und Diabetes [71, 77].

PDX1 ist zudem für die embryonale Entwicklung des Pankreas entscheidend. Dies wird durch die Pankreasagenesie bei Menschen mit mutiertem PDX1 [80] und bei Mäusen mit gentechnisch inaktiviertem PDX1 verdeutlicht [81]. Weiterhin entstehen im ventralen Duodenum der Maus strukturelle Fehlentwicklungen, wenn PDX1 mutiert ist [82] und im Magen fehlen Gastrinzellen fast vollständig, während sich mehr endokrine Vorläuferzellen zu Serotoninzellen differenzieren [70].

Homeobox-Gene wie PDX1 werden häufig dereguliert in Tumoren vorgefunden. Die Expression dieser Gene in Malignomen kann dem Vorschlag Abate-Shens folgend drei unterschiedlichen Kategorien zugeordnet werden [83]. In die erste Kategorie gehören jene Homeobox-Proteine, die im adulten Normalgewebe exprimiert, aber nicht mehr in Krebszellen dieses Gewebes nachgewiesen werden. Die zweite Gruppe enthält Homeobox-Gene, die in einem Gewebe nur während der Embryogenese exprimiert werden, aber nicht im adulten Epithel. Die Expression dieser Gene kann in Tumoren dieser Gewebe wieder auftreten. Die dritte Kategorie beinhaltet Homeobox-Gene, die im Gewebe weder im Embryonal- noch im Erwachsenenstadium exprimiert werden, deren Expression aber in malignen Läsionen nachgewiesen wird [83].

PDX1 fällt in Bezug auf das Pankreaskarzinom in die zweite Kategorie. Im Embryonalstadium wird in murinem Gewebe, welches sich später zu exokrinem Pankreas differenziert, eine PDX1-Expression gemessen, während es im humanen adulten exokrinen Pankreas keine PDX1-Expression gibt. Bei manchen humanen Karzinomen des exokrinen Pankreas setzt die PDX1-Expression wieder ein und korreliert positiv mit klinischen Parametern wie Lymphknotenmetastasierung, histologischer Klassifikation, TNM-Stadium und einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten gegenüber den Pankreaskarzinomen ohne PDX1-Expression. Koizumi et al. und Liu et al. konnten bei 43 bzw. 39 % der Pankreaskarzinome eine PDX1-Expression nachweisen [84, 85].

Liu et al. zeigten auch, dass PDX1 in humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien die Zellproliferation und -invasion reguliert. In PaCA2 Zellen führte die experimentelle PDX1-Überexpression zu einer Zunahme der Proliferation und Invasion. In PANC-1 Zellen, in denen PDX1 endogen überexprimiert wird, hemmte die Blockade der PDX1-Expression die Proliferation. Desweiteren wurde das Tumorwachstum dieser Krebszellen in SCID (severe combined immunodeficiency)-Mäusen gehemmt, dies war mit einer gesteigerten Apoptose assoziiert. 2011 wurde mit in vitro- und in vivo-Verfahren in einer embryonalen Zelllinie nachgewiesen, dass eine stabile Transfektion von PDX1 unter anderem zu einer Senkung der p27-Expression führte. Diese und weitere veränderte Expressionslevel Zellzyklus-relevanter Proteine resultierten in einer erhöhten Zellproliferation der Zellen [86, 87].

Im Kolonepithel wird PDX1 weder im embryonalen noch im adulten Normalgewebe exprimiert, in tumorösen Veränderungen tritt eine Expression hingegen auf.

Fünf KRKs (33 %, n= 15), die in das Ovar metastasiert hatten, zeigten eine PDX1-Expression [88], in verschiedenen Kolonadenomtypen war die PDX1-Expression im Vergleich zum Normalepithel erhöht [89] und eine PDX1-Expression war im KRK wie auch in Tumor angrenzendem Normalgewebe derselben Patienten aufgefallen [90]. Alle Studien, welche die PDX1-Expression in tumorösen Veränderungen des Dickdarms untersuchten, konnten eine Expression nachweisen, so dass eine onkogene Funktion des Proteins möglich wäre. In Bezug auf das Kolonepithel gehört PDX1 in die dritte von Abate-Shen [83] beschriebene Kategorie: Eine Expression tritt in Tumoren auf, obwohl dies in keinem physiologischen Entwicklungsstadium vorkommt.

Expression von PDX1 wurde weiterhin in Ösophagus- Magen-, Mamma-, Prostata-, Nieren- und Ovarialkarzinomen beschrieben [88, 90-94]. Die Ursachen für die PDX1-Expression in humanen Tumoren sind noch nicht untersucht worden. Eine Überexpression könnte beispielsweise durch eine aktivierende Mutation, Translokation oder Amplifikation ausgelöst werden.

### 1.3. Das PDX1-Amplikon

Am Institut für Pathologie des UKE (Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf) wurden in einer Studie (Antje Krohn) Zelllinien und Primärtumoren verschiedener humaner Tumortypen mittels array-komparativer genomischer Hybridisierung (aCGH) auf DNS- Kopiezahlveränderungen untersucht. Im Zuge dieser Analysen wurde bei einer Kolonkarzinomzelllinie (Colo 320 DM) ein Amplikon auf Chromosom 13q12 detektiert (Abb. 4).

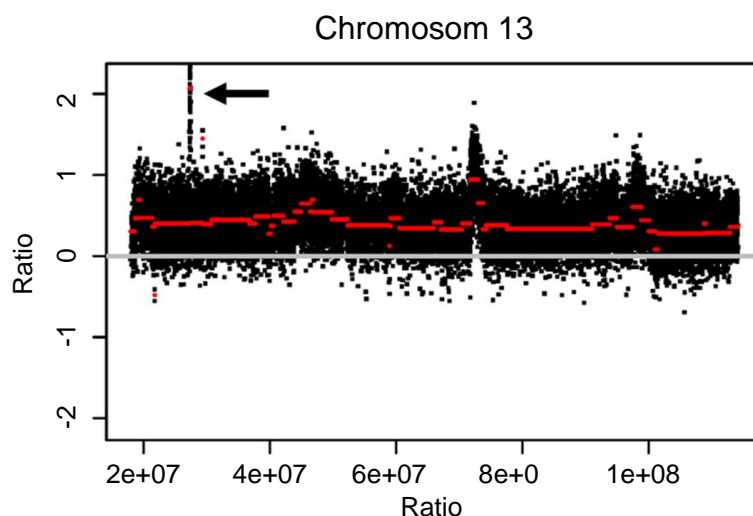


Abb. 4: Array Comparative Genomic Hybridization der Zelllinie Colo 320 DM. Das Amplikon ist mit einem Pfeil markiert.

Dieses Amplikon enthielt 3 Gene: ATP5EP2 (ATP Synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit pseudogene 2), CDX2 (caudal type homeobox 2) und PDX1 (s. Abb. 5).

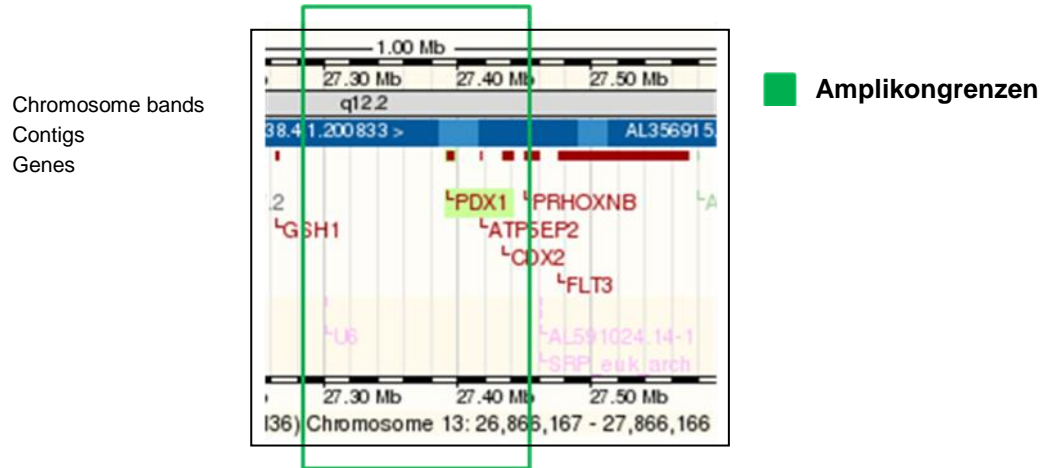


Abb. 5: Graphische Darstellung des Amplikons auf Chromosom 13q12 in Ensembl Gene, Version Mai 2009 [95]. Das Amplikon (Chromosom 13: 27283757-27448578) beinhaltet folgende Gene vollständig: PDX1, ATP5EP2 und CDX2.

Sowohl die bekannte Funktion von PDX1 als auch die bisher publizierten Daten zur PDX1-Expression in verschiedenen humanen Tumortypen sind mit einer onkogenen Rolle von PDX1 vereinbar (s. S. 14).

#### 1.4. Ziel der Arbeit

Aufgrund der möglichen onkogenen Funktion von PDX1 wurde es für weitere Validierungsexperimente ausgewählt. Ziel dieser Arbeit ist es, die molekulare Epidemiologie von PDX1-Amplifikationen in vielen humanen Tumortypen und vornehmlich im Kolonkarzinom zu klären.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Multitumor Tissue-Microarray

Dieser Tissue-Microarray (TMA) besteht aus 3981 Tumoren und 600 Kontrollgeweben, die auf acht Blöcke (Slide A-H) gestanzt wurden. Das Tumorgewebe wurde in 4-prozentiger Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Außer des histologischen Tumorstadiums wurden keine weiteren klinisch-pathologischen Daten erhoben. Sämtliche Schnitte aller Tumoren wurden von zwei Pathologen bezüglich ihres histologischen Tumorstadiums beurteilt. Die Zusammenstellung des Multi-Tumor-Arrays ist in Tabelle 3 gelistet.

Tab. 3: Zusammenstellung des Multi-Tumor-Arrays.

<b>Tumortyp</b>	<b>Anzahl (Slide A)</b>
Prostatakarzinom	63
Teratom	60
Seminom	92
Nicht-Seminom	45
Peniskarzinom	46
Onkozytom	62
Nierenzellkarzinom, papillär	31
Nierenzellkarzinom, chromophob	56
Nierenzellkarzinom, klarzellig	68
Nierenzellkarzinom, andere	9
<b>Tumortyp</b>	<b>Anzahl (Slide B)</b>
Magen-Adenokarzinom, intestinal	62
Magen-Adenokarzinom, diffus	56
Dünndarmkarzinom	22
Analkarzinom	18
Kolonadenom, geringgradig dysplastisch	56
Kolonadenom, hochgradig dysplastisch	40
Kolonkarzinom	60
Ösophagus-Plattenepithelkarzinom	60
Ösophagus-Adenokarzinom	60
Hepatozelluläres Karzinom	55
Karzinoide	40
<b>Tumortyp</b>	<b>Anzahl (Slide C)</b>
Lymphoepitheliales Karzinom	5
Mundbodenkarzinom	54
Larynxkarzinom	57
Thymom	57
Schilddrüsen-Adenom	65
Schilddrüsenkarzinom, papillär	54
Schilddrüsenkarzinom, follikulär	47

Schilddrüsenkarzinom, medullär	28
Schilddrüsenkarzinom, anaplastisch	3
Astrozytom	49
Ependymom	10
Medulloblastom	4
Oligodendrogliom	28
Neuroblastom	51
<b>Tumortyp</b>	<b>Anzahl (Slide D)</b>
Phäochromozytom	64
Nebennieren-Adenom	21
Nebennierenkarzinom	8
Paragangliom	34
Urothelkarzinom (T2-4)	60
Urothelkarzinom (Ta)	62
Urothelkarzinom, andere	10
Benigner Naevus	59
Malignes Melanom	37
Spinaliom	51
Basaliom	67
Pilomatrixom	37
Merkelzell-Karzinom	7
<b>Tumortyp</b>	<b>Anzahl (Slide E)</b>
Hodgkin Lymphom	43
Non-Hodgkin-Lymphom	9
Malignes Mesotheliom	28
Riesenzell-Sehnenscheidenkarzinom	40
Kleinzelliges Bronchialkarzinom	15
Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	14
Bronchialkarzinom, Plattenepithel	59
Bronchialkarzinom, adenös	71
Großzelliges Bronchialkarzinom	48
Bronchialkarzinom, bronchoalveolär	14
Pankreas-Adenokarzinom, duktal	56
Pankreas-Adenokarzinom, Papille	29
Pankreas-Adenokarzinom, neuroendokrin	20
Gallenblasenkarzinom	30
<b>Tumortyp</b>	<b>Anzahl (Slide F)</b>
Angiosarkom	7
Chondrosarkom	5
Dermatofibrosarkom protuberans	5
Desmoid	9
Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	46
Granularzelltumor	8
Hämangioperizytom	7
Leiomyom	27
Leiomyosarkom	28
Liposarkom	16
Malignes Schwannom	14
Malignes fibröses Histiocytom	25
Neurofibrom	60
Warthin Tumor	57
Pleomorphes Adenom (Parotis)	61

Basalzelladenom	37
Mukoepidermoid-Karzinom	46
<b>Tumortyp</b>	<b>Anzahl (Slide G)</b>
Ovarialkarzinom, serös	63
Ovarialkarzinom, muzinös	46
Ovarialkarzinom, endometroid	22
Ovar, Brenner-Tumor	45
Zervixkarzinom, Plattenepithel	63
Zervixkarzinom, adenös	48
Zervixkarzinom, adenosquamös	3
Endometriumkarzinom, endometroid	60
Endometriumkarzinom, serös	58
Vulvakarzinom, Plattenepithel	61
Vaginalkarzinom, Plattenepithel	22
<b>Tumortyp</b>	<b>Anzahl (Slide H)</b>
Mammakarzinom, duktal	62
Mammakarzinom, lobulär	65
Mammakarzinom, muzinös	61
Mammakarzinom, medullär	64
Mammakarzinom, tubulär	60
Mammakarzinom, phylloid	48
Mammakarzinom, kribriiform	26
Mammakarzinom, apokrin	17
Stromasarkom des Uterus	13
Karzinom	38

### **2.1.2. Kolorektaler Adenom Tissue-Microarray**

Auf dem Array befinden sich 233 Adenome kolorektalen Gewebes, die sich wie folgt aufteilen: 157 Gewebestanden sind reine Adenome, davon 108 mit geringgradigen und 49 mit hochgradigen Dysplasien. In 76 Fällen waren die Patienten auch von Karzinomen betroffen, 39 dieser gestanzten Adenome waren geringgradig und 37 hochgradig dysplastisch. Die Proben stammen von Patienten, die in verschiedenen Krankenhäusern im Großraum Hamburg im Zeitraum von 1995 bis 2007 behandelt wurden.

### **2.1.3. Kolonkarzinom Tissue-Microarray**

Der TMA besteht insgesamt aus 2154 Proben, wovon 1793 primäre Kolonkarzinome sind. 1413 primäre Karzinome wurden in Basel und Zürich entnommen, weitere 380 Proben stammen aus Hamburg, bei denen zusätzlich 156 korrespondierende Lymphknoten, 51 Lebermetastasen und 24 Rezidive entfernt wurden. Das Alter der Patienten betrug durchschnittlich 68 Jahre (Spanne 14- 96 Jahre), der Median des Alters liegt bei 70 Jahren und die Operationen erfolgten am UKE in den Jahren 1990-

2005, in Basel von 1986- 1997, sowie in Zürich von 1988- 1996. Alle Objektträger von allen Tumoren wurden von zwei Pathologen beurteilt, und bezüglich ihres histologischen Typs und histologischen Grades eingeteilt. Das Tumorgewebe wurde in 4-prozentiger Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Für die Proben aus der Schweiz wurden den Pathologieberichten folgende Daten entnommen: Tumorlokalisation, maximaler Tumordurchmesser, pT-Stadium, histologischer Grad, Radikalität der Operation (im Gesunden, nicht im Gesunden reseziert), Lymphknotenstatus (Anzahl untersuchte und Anzahl positive Lymphknoten, pN-Stadium). Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 50,6 Monate (1- 152 Monate). Regionäre Lymphknoten waren bei 1366 Patienten untersucht worden. Das pN-Stadium war pN0 in 714, pN1 in 358 und pN2 in 294 Patienten. 673 (47,5 %) Patienten waren Männer und 741 (52,3 %) Frauen, in drei Fällen fehlte diese Information.

Bei den in Hamburg entnommenen Proben stammte das Gewebe der primären Kolonkarzinome und der zugehörigen Metastasen von 380 Patienten des UKE. Die Patienten wurden unterschiedlichen Arten von Kolektomien in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, und Thoraxchirurgie in den Jahren von 1993 bis 2005 unterzogen. Überlebensdaten wurden durch dieselbe Abteilung akquiriert. Die mittlere Nachschauzeit betrug beim Kolonkarzinom 26,62 Monate (Spanne von 0- 180 Monaten). Das pathologische Stadium, Nodal- und Metastasenstatus wurden aus den Erstberichten des Instituts der Pathologie des UKEs der anschließenden Operationen entnommen.

Dieser Arbeit vorangehende Studien, die am Institut für Pathologie am UKE durchgeführt wurden, analysierten den Kolonkarzinom-Array mit verschiedenen immunhistochemischen Markern. Dazu gehörten EGFR1, c-Myc [67, 96, 97], sowie p53, Antigen Ki67, BCL2 (B-Cell Lymphoma 2), p27 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) und Beta-Catenin. Der TMA wurde mittel FISH auch auf ein Vorkommen von HER2- Amplifikationen untersucht. Die Zusammenstellung des Kolonkarzinom Tissue-Microarrays ist in Tabelle 4 zusammengefasst und die Kaplan-Meier Überlebenskurven des Arrays für das Tumorstadium (pT1-4) und den histologischen Grad (Grad 1-3) in Abbildung 6 dargestellt.

Tab. 4: Zusammenstellung des Kolonkarzinom-Arrays. Die Anzahl in den Untergruppen entspricht nicht immer 2154 Proben, da in einigen Fällen nötige Informationen fehlen.

	Alle Proben		n=2154
<b>TMA</b>	Histologie	Primäres Kolonkarzinom	1793
<b>Kolonkarzinom</b>	Stadium	pT1	79
		pT2	273
		pT3	1138
		pT4	266
	Lymphknotenstatus	pN0	901
		pN1	448
pN2		392	
Metastasenstatus	M0	279	
	pM1	101	
Histologischer Grad	G1	33	
	G2	1488	
	G3	241	
	Überlebensdaten verfügbar		1728
<b>Weiteres Tumorgewebe</b>	Korrespondierende Lymphknoten		156
	Lebermetastasen		51
	Rezidive		24
<b>Kontrollen</b>			130

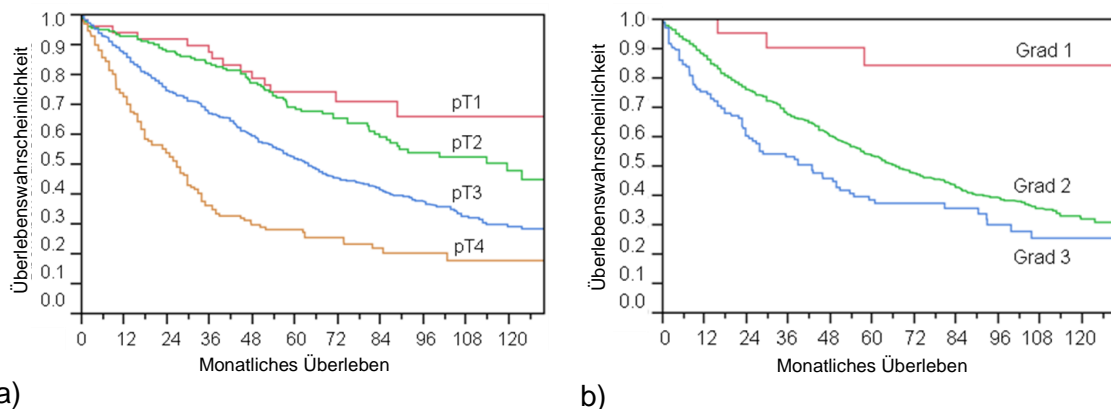


Abb. 6: Kaplan-Meier Überlebenskurven des Kolonkarzinom-Arrays für a) das Tumorstadium (pT1-4) und b) den histologischen Grad (Grad 1-3).

#### 2.1.4. Zelllinien Tissue-Microarray

Die auf dem Array vorliegenden 143 Zelllinien stammen von LGC-Promochem (ATCC), DSMZ, ECACC, ICLC, LGC, NCI-60 sowie unterschiedlichen Forschungslaboren der Universität Basel. Es handelt sich überwiegend um humane

Zelllinien, ebenfalls wurden Zelllinien vom Rind (*bos taurus*), Affen (*african green; cercopithecus aethiops*) und von der Ratte (*rattus norvegicus*) verwendet.

Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um Tumor-, Nicht-Tumor, als auch um präneoplastische 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 im Anhang (s. Tab. 8) tabellarisch gelistet.

### **2.1.5. pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung**

- pBAC-E.coli-Klon, RZPD-Nr.: RP11-328P22 (stab-stock-Kultur)
- Kulturmedium: autoklavierte 25 g Luria-Broth-Base (25 g/l destilliertes Wasser (dH<sub>2</sub>O)); Invitrogen
- Antibiotikum: Chloramphenikol (34 mg/ml Ethanol abs.); Sigma-Aldrich
- Erlenmeyerkolben
- Pipetten
- Küvetten
- Pinzette
- Zahnstocher
- Schüttelinkubator- Thermocycler K 15/300; Incutec IH 50
- Schüttelmaschine LS10; Gerhardt

### **2.1.6. DNS-Extraktion aus der E.coli-Kultur**

- „QIAprep Spin Miniprep Kit 250“; Qiagen
  - P1, P2, N3, PE und EB Puffer (Elution Buffer: 10 mM Tris-Cl, pH 8,5)
  - „QIAprep spin“ Säulen
- Pipetten
- Küvetten
- Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Zentrifugen
  - Biofuge fresco; Heraeus Instruments
  - JOTA-AVE; B.Braun Biotech International
- NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer; PeqLab
- Thermomixer compact; Eppendorf

### **2.1.7. DNS-Markierung mittels Nick-Translation**

- Nick Translation System; Invitrogen
- Digoxigenin 11-dUTP (Desoxyuridintriphosphat); Roche
- Polymerase I; Invitrogen
- dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat) ohne dTTP (Desoxythymidintriphosphat); Invitrogen
- DNase I; Invitrogen
- pBac-DNA-Lösung; eigene Herstellung
- Pipetten
- Küvetten
- Zentrifugen
  - Biofuge fresco; Heraeus Instruments
  - JOTA-AVE; B.Braun Biotech International
- Thermocycler
- Minishaker IKA, Vibrofix VF1 Electronic; Janke&Kunkel IKA Labortechnik

### **2.1.8. FISH**

#### **Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung der TMA-Schnitte**

- Objektträger; Starfrost
- dH<sub>2</sub>O
- Ethanol (70 %/ 80 %/ 96 %); Merck
- VP 2000 Pretreatment Reagent; Vysis
- VP 2000 Protease Buffer (0,01 N HCL); Vysis
- Xylol; Merck
- Heizplatte; Medax
- Wasserbäder, Typ 1002 und 1083; GFL-Gesellschaft für Labortechnik
- Slideholder

#### **Hybridisierung**

- Hybridisierungsmix (14 µl Basis-Hybridisierungsmix, 2 µl Cot Human DNA (Roche), 3,5 µl Sonden-DNS, 0,5 µl CEP-12-Sonde bzw. TEL-13-Sonde= 20 µl)
- Hybrite- Thermobrite, Statspin; Abbot Molecular
- Deckgläschen; Marienfeld-Superior
- Pipetten

- Küvetten 100m; Glaswerk Wertheim
- Fixogum; Marabu

#### Basishybridisierungsmix:

- 20xSSC (Sodiumcitrat, NaCl)
- Cot Human DNA; Roche
- Dextransulfat
- Formamid (deionisiert)
- Pipetten
- Küvetten 100m; Glaswerk Wertheim
- Digital pH-Meter pH 525; WTW-Wissenschaftlich Technische Werkstätten

#### **Waschen**

- 2xSSC
- dH<sub>2</sub>O
- NP40 (NP40= Octylphenoxypolyethoxyethanol)
- Wasserbäder, Typ 1002 und 1083; GFL-Gesellschaft für Labortechnik

#### **Antikörperdetektion**

- „Flourescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection“; Roche
  - Blocking Solution
  - Anti-DIG monoclonal antibody against digoxigenin mouse IgG1,
  - Anti-Mouse-Ig-DIG-F(ab)<sub>2</sub> fragment from sheep
- Waschpuffer
  - 0,2 % TWEEN (TWEEN=Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)
  - in 1x PBS, phosphate buffered saline pH= 7,4; (Natriumchlorid, (Di)Natriumhydrogenphosphat; DakoCytomation)
- Pipetten
- Küvetten 100m; Glaswerk Wertheim
- DAPI (DAPI= 0,2 mM 4'5-Diamindino-2-Phenyl-Indol, Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI; H-1200; Vector)
- Antifade – p-Phenylenediamine
- Deckgläschen; Marienfeld-Superior



- Brutschrank; WTB Binder
- Wasserbäder, Typ 1002 und 1083; GFL-Gesellschaft für Labortechnik

## **Auswertung**

- Epifluoreszenzmikroskop; Zeiss mit grünem FITC (Fluorescein isothiocyanate) - Filter und orangefarbenem Rhodamin Filter

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. FISH**

Für die zweifarbige FISH-Analyse wurden vier Mikrometer dicke TMA-Schnitte eingesetzt. Diese wurden vor der Hybridisierung gemäß des Protokolls des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis, Downers Grove, IL) entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt. Zur Hybridisierung wurde eine selbst hergestellte digoxigenierte BAC-Sonde (13q12.1; BAC RP11-328P22, RZPD, Deutschland), welche das PDX1-Gen umfasst, eingesetzt. Die Markierung der selbst hergestellten DNS-Sonde wurde mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen) durchgeführt. Eine kommerzielle Zentromer-Sonde war für das Chromosom 13 nicht erhältlich, da die Zentromerbereiche beispielsweise der Chromosomen 13 und 15 fast identisch sind. Daher wurde als Referenz bei der Analyse des Multi-Tumor-Arrays eine kommerzielle Zentromer-Sonde für das Chromosom 12 (Spektrum orange; Vysis) verwendet und bei der Untersuchung der Kolonkarzinome und –adenome sowie Tumorzelllinien eine kommerzielle Sonde für das Telomer des Chromosom 13 (Spektrum orange; Vysis) eingesetzt. Die Detektion der hybridisierten TMA-Schnitte wurde mit dem „Fluorescent Antibody Enhancer Set“ (Roche) durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte und Laborprotokolle zur Durchführung der FISH aufgeführt. Diese umfassten:

- pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung
- DNS-Extraktion aus der E. coli-Kultur
- DNS-Markierung mittels Nick-Translation
- Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung der TMA-Schnitte
- Hybridisierung
- Waschen
- Antikörperdetektion
- Auswertung

### **2.2.2. Auswahl und Anzucht von BAC Klonen**

Für die pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung wurden zehn Milliliter Medium in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gefüllt, dann erfolgte die Zugabe von 30 µl Chloramphenikol. Mit abgeflamten Pinzetten wurden autoklavierte Zahnstocher gefasst und Abstriche aus der Stab-stock-Kultur vorgenommen. Diese Zahnstocher wurden zum Animpfen dem Medium hinzugegeben. Die angeimpfte Kultur wurde bei Raumtemperatur und 200 rpm (rounds per minute) im Schüttelinkubator für zwei Tage inkubiert. Zehn Mikroliter der trüb gewordenen Kultur wurden danach in einen mit zehn Milliliter Medium und 30 µl Chloramphenikol versetzten 100 ml-Erlenmeyerkolben mittels Pipette überimpft. Die angeimpfte Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die DNS-Extraktion.

### **2.2.3. DNS-Extraktion**

Die DNS wurde aus einer pBAC-E.coli-Flüssigkultur mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen nach leicht modifiziertem Protokoll extrahiert. Alle verwendeten Reagenzien und die „QIAprep spin Säulen“ waren im Extraktions-Kit enthalten.

Drei bis vier Milliliter der Flüssigkultur wurden auf 2 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und in einer Tischzentrifuge (~17.900 g) für 90 Sekunden bei 13.000 rpm pelletiert. Danach wurden die Pellets zusammen in 250 µl Puffer P1 vollständig resuspendiert und 250µl Puffer P2 hinzugegeben. Es wurde vorsichtig gemischt und vier- bis sechsmalig invertiert. Mit dem folgenden Schritt wurde nicht länger als fünf Minuten gewartet. Es folgte die Zugabe von 350 µl Puffer N3 und sofortiges, vorsichtiges Mischen durch vier- bis sechsmaliges Invertieren. Das Eluat wurde zehn Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in eine „QIAprep spin Säule“ überführt. Anschließend wurde der Überstand eine Minute lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die „QIAprep spin Säule“ wurde mit 500 µl Puffer PE beladen und eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss wurde wieder verworfen. Der letzte Schritt wurde zweimalig wiederholt. Die „QIAprep spin Säule“ wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und mit 50 µl auf 70 °C erwärmten Puffer EB beladen. Es wurde eine Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann wieder eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dann konnte die

Säule entfernt und die DNS im NanoDrop quantifiziert werden. Das Eluat wurde nur dann weiterverwendet, wenn der DNS-Gehalt mindestens 50 ng/µl und wenn sich die Reinheitsratio zwischen 1,8 und 2,0 befand (DNS/Proteine: Absorption bei 260nm/280nm). Aufbewahrt wurde die DNS im 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 4 °C.

#### 2.2.4. Sondenmarkierung

Die Nick-Translation wurde mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen) durchgeführt, wobei eine Mindestmenge von einem Mikrogramm DNS zu einem Ansatz von 50 µl hinzugegeben wurde. Das Protokoll des Kits wurde modifiziert verwendet. Das zulässige Höchstvolumen an pBAC-DNS-Lösung von 38 µl wurde als Standardvolumen gewählt (entsprechend ca. 1,5 bis 2,5 µg DNA). Außerdem wurde nach Ablauf der Standardinkubationszeit ein weiteres Mal Pol I-/DNase-Enzym-Mix zugegeben und weiter inkubiert.

Pipettieransatz im 0,5 ml-Reaktionsgefäß, damit sich 50 µl Ansatzmenge ergeben:

dNTP-Mix ohne dTTP	5 µl
Digoxigenin 11-dUTP	1 µl
pBAC-DNS-Lösung	38 µl
Pol I-/ DNase Enzym Mix (0,5 U/µl Pol I, 0,4 mU/µl DNase I)	5 µl
DNS Polymerase I	1 µl
	=50 µl

Der Ansatz wurde gut durchmischt und danach herunter zentrifugiert. Für 90 Minuten wurde er bei 15 °C im Thermocycler inkubiert und dann weitere fünf Mikroliter Pol I-/DNase-Enzym-Mix hinzugegeben. Es wurde erneut mit der Pipette gut durchgemischt und dann für 15 Minuten bei 15 °C im Thermocycler inkubiert. Dann wurden fünf Mikroliter Stopp-Puffer hinzugegeben und es wurde mittels Vortex durchmischt, danach zentrifugiert. Die markierte Sonde wurde bei 4 °C gelagert.

#### 2.2.5. Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung

Die TMA-Schnitte wurden vor der Hybridisierung gemäß des Protokolls des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis) behandelt.

Die TMA-Schnitte wurden drei Mal für jeweils zehn Minuten in Xylol gestellt. Dann wurden die Schnitte zwei Mal für jeweils fünf Minuten in 96-prozentiges Ethanol

gestellt und danach drei Minuten lang auf der Heizplatte bei 48 °C getrocknet. Sie wurden 15 Minuten in im Wasserbad erhitzter 80 °C warmer Pretreatmentlösung inkubiert, dann zwei Minuten in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden sie für 150 Minuten in 37 °C warmer Proteaselösung (Wasserbad) inkubiert und erneut zwei Minuten in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Schließlich wurden die Schnitte nacheinander für jeweils drei Minuten in 70-prozentiges, 80-prozentiges und 96-prozentiges Ethanol gestellt und abschließend drei Minuten lang auf der Heizplatte bei 48 °C getrocknet.

### **2.2.6. Hybridisierung**

Die Hybridisierung wurde mit einer selbst hergestellten genspezifischen Sonde (13q12.1; RZPD-Nr.: RP11-328P22) und entweder mit einer kommerziellen Sonde gegen das Zentromer des Chromosom 12 oder das Telomer des Chromosoms 13 (Spektrum orange, Vysis) als Referenz eingesetzt. Die kommerziellen Sonden wurden nicht in dem mitgelieferten Hybridisierungsmix verdünnt. Die PDX1- und Chromosomen markierenden Sonden wurden gemeinsam in einem Gemisch mit humaner Cot-DNS (zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen/ repetitiver Sequenzen) und einem selbst hergestellten Basisybridisierungsmix auf die TMA-Schnitte gegeben und für zehn Minuten bei 72 °C ko-denaturiert und über Nacht bei 37 °C hybridisiert. Sowohl Denaturierung, als auch Hybridisierung wurden im Hybrite (Vysis) durchgeführt.

#### Herstellung des Basisybridisierungsmix

Fünf Milliliter deionisiertes Formamid, 1,5 ml 20xSSC und ein Gramm Dextransulfat wurden in ein kleines Becherglas gegeben und bei 60 °C auf dem Heizrührer so lange gerührt, bis sich das Dextransulfat gelöst hatte. Die Suspension wurde mit Salzsäure auf den pH-Wert 7 eingestellt und mit dH<sub>2</sub>O auf sieben Milliliter aufgefüllt. Der Mix wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Der Hybridisierungsmix wurde auf den TMA gegeben, mit einem 24x 32 mm Deckgläschen eingedeckelt und mit Rubbrcement versiegelt. Für zehn Minuten wurden die Arrays im Hybrite bei 72 °C denaturiert und dann über Nacht bei 37 °C im Hybrite inkubiert.

### **2.2.7. Waschen**

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die TMA-Schnitte stringent gewaschen, um unspezifische Hybridisierungen zu entfernen.

Die TMA-Schnitte wurden aus dem Hybrite genommen und Rubbervement und Deckgläschen entfernt. Sie wurden in Waschpuffer (2xSSC; 0,3 % NP40) bei Raumtemperatur gestellt und dann zwei Minuten bei 72 °C im Waschpuffer (2xSSC; 0,3 % NP40) gewaschen. Anschließend wurden sie kurz in dH<sub>2</sub>O waschen und im Dunkeln luftgetrocknet.

### **2.2.8. Fluoreszenz-Detektion**

Die Objektträger wurden für 45 Minuten mit 500 µl Blocking Solution eingedeckt, um unspezifische freie Proteinbindungsstellen zu blocken. Danach wurde die Lösung abgekippt. Um möglichst deutliche Fluoreszenzsignale zu erhalten, wurden die Digoxigenin-Reste der selbst hergestellten Sonde über einen Komplex von drei Antikörpern detektiert, wobei der Tertiär-Antikörper fluoreszenzgekoppelt war. Hierzu wurde das „Enhancer Detection Kit“ von Roche eingesetzt.

Der erste Antikörper wurde auf den Objektträger pipettiert und für 60- 90 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Dann wurde der Objektträger dreimalig für jeweils eine Minute in Waschpuffer im 37 °C warmen Wasserbad gewaschen. Die Prozedur wurde für den zweiten und dritten Antikörper wiederholt. Nach dem dritten Antikörper wurde dreimalig für jeweils fünf Minuten in Waschpuffer gewaschen.

Nach der Detektion wurden die Schnitte wieder im Dunkeln luftgetrocknet, mit DAPI und Antifade versetzt und anschließend mit einem 24x 48 mm Deckgläschen bedeckt.

### **2.2.9. Auswertung**

Die Auswertung erfolgte mit einem Epifluoreszenzmikroskop. Hierzu wurden der grüne FITC-Filter für das Gensignal und der orangefarbige Rhodamin-Filter für das Chromosom -Signal eingesetzt. Um die Signale einem Zellkern zuzuordnen, wurde ein DAPI-Filter benutzt.

Die Ratio PDX1-Signale/ Zentromer12- bzw. Telomer13-Signale wurde in den einzelnen Krebszellen für jede Gewebeprobe ausgewertet. Als Amplifikation wurde

das Vorliegen von mindestens doppelt so vielen PDX1-Signalen wie Chromosom markierender Signale ( $\text{Ratio PDX1/CEP12}$  bzw.  $\text{TEL13} \geq 2,0$ ) definiert. Gewebeproben, die eine PDX1/CEP12 bzw. TEL13-Ratio von über 1,0, aber unter 2,0 aufwiesen ( $1,0 < \text{Ratio PDX1/CEP12}$  bzw.  $\text{TEL13} < 2,0$ ), wurden als „Gains“ bezeichnet. Proben, in denen die CEP12- bzw. TEL13-Signale auf über 2 erhöht waren und die Ratio PDX1/CEP12 bzw. TEL13  $< 2$  betrug, wurden als Polysomien gewertet. Alle anderen Gewebeproben ( $\text{Ratio PDX1/Chr13} \leq 1,0$ ) wurden als normal definiert.

Bei den im Multi-Tumor-Array gefundenen PDX1-Amplifikationen lassen sich Polysomien aufgrund der fehlenden korrekten Referenzsonde nicht ausschließen.

### **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. Das Signifikanzniveau wurde auf fünf Prozent festgelegt.

Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte nach Kaplan-Meier. Der Log-rank-Test wurde angewandt, um den Zusammenhang zwischen Genamplifikationen und dem Patientenüberleben zu untersuchen. Mit Hilfe der Cox Regression wurden die Abhängigkeiten der analysierten Variablen untereinander in Relation zum Patientenüberleben gesetzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. PDX1-Amplifikationen in humanen Tumoren

Bei der Untersuchung des Multi-Tumor-TMAs konnten 1886 Tumorstanzen (47,4 %) der 3981 Tumoren auf ein Vorkommen von Amplifikationen geprüft werden. Entweder fehlten die weiteren Proben auf dem TMA-Schnitt (449; 11,3 %) oder sie wiesen kein Fluoreszenzsignal für PDX1 auf (1646, 41,3 %).

PDX1-Amplifikationen wurden in sieben (0,37 %) der untersuchten Tumoren gefunden. Eine hochgradige PDX1-Amplifikation (>20 Gensignale, s. Abb. 8) zeigte sich in einem von 19 (5,3 %) auswertbaren Kolonkarzinomen. Die weiteren Amplifikationen (5-8 Gensignale) traten in einem Urothelkarzinom des Stadiums T2-T4 und einem weiteren des Stadiums Ta, zwei intestinalen Magenkarzinomen, einem großzelligen Bronchialkarzinom und einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mit Amplifikationsraten zwischen 2,2 und 4,8 % auf. Es ergaben sich in weiteren vier (0,21 %) Tumoren Gains (s. Tab. 5).

Tab. 5: PDX1-Amplifikationen und Gains im Multi-Tumor-Array. Amp (%), (x/n)= Amplifikationsrate in % auf die einzelne Tumorentität bezogen (amplifizierte Tumorstanzen/Gesamtzahl der Tumorstanzen), Gain (%), (x/n)= Rate der Gains in % auf die einzelne Tumorentität bezogen (amplifizierte Tumorstanzen/Gesamtzahl der Tumorstanzen) PDX1/CEP12= Anzahl PDX1-Signale/Anzahl Zentromer 12-Signale

	Amp (%)	(x/n)	Gain (%)	(x/n)	PDX1/CEP12
<b>Kolonkarzinom</b>	5,3	(1/19)			20 / 2,5
<b>Magenkarzinom, intestinal</b>	4,8	(2/42)			6 / 2 6 / 2
<b>Urothelkarzinom T2-T4</b>	4,3	(1/23)			8 / 2
<b>Urothelkarzinom Ta</b>	3,4	(1/29)			7 / 2,5
<b>Ösophagus, Plattenepithelkarzinom</b>	2,2	(1/45)	2,2	(1/45)	5 / 2 3,5 / 2
<b>Bronchialkarzinom, großzellig</b>	3,2	(1/31)	3,2	(1/31)	5,5 / 2,5 4 / 2,5
<b>Ovar, Brenner</b>			3,7	(1/27)	3,5 / 2
<b>Paragangliom</b>			10,0	(1/10)	5 / 3

### 3.2. PDX1-Amplifikationen in Kolonadenomen

Es ließen sich 161 (69,1 %) der 233 Kolonadenome des Kolonadenom Tissue-Microarrays analysieren. 23 (9,9 %) Tumorstanzen fehlten, 49 (21,0 %) waren nicht auswertbar. Die Amplifikationsrate betrug 1,3 % (2/161), Gains fanden sich in drei Tumorstanzen (1,9 %) und Polysomien wurden in 18 Proben nachgewiesen (10,8 %). Beide Amplifikationen wurden in reinen Adenomen mit geringgradiger Dysplasie mit einer Ratio von 2,0 bzw. 6,25 PDX1/TEL13 nachgewiesen.

### 3.3. PDX1-Amplifikationen in Kolonkarzinomen

#### 3.3.1. Technische Resultate

1288 Tumorstanzen (69,2 %) der 1861 Primärtumoren des Kolonkarzinom-TMAs konnten untersucht werden. 88 (4,7 %) Tumorstanzen waren nicht mehr auf dem Array vorhanden und für 485 (26,1 %) war kein Fluoreszenzsignal für PDX1 sichtbar. 62 (4,8 %) der untersuchten Tumorstanzen wiesen PDX1-Amplifikationen auf. Bei zwölf (19 % der Amplifikationen) zeigten sich hochgradige Amplifikationen mit mehr als zehn Gensignalen (s Abb. 8). In 71 weiteren Tumorstanzen (5,5 %) konnten Gains festgestellt werden, Polysomien wurden in 13,7 % der Fälle nachgewiesen. Die Verteilung der Kopiezahlen der PDX1-Amplifikationen in Kolonkarzinomen ist in Abbildung 7 dargestellt.

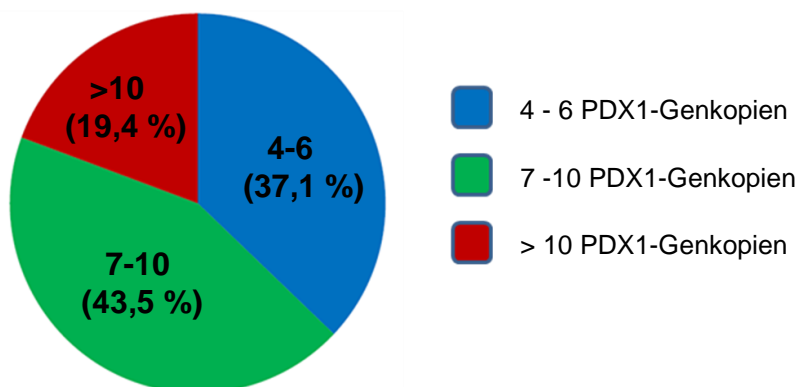


Abb. 7: PDX1-Genkopiezahlen in 62 Kolonkarzinomen mit PDX1-Genamplifikation.



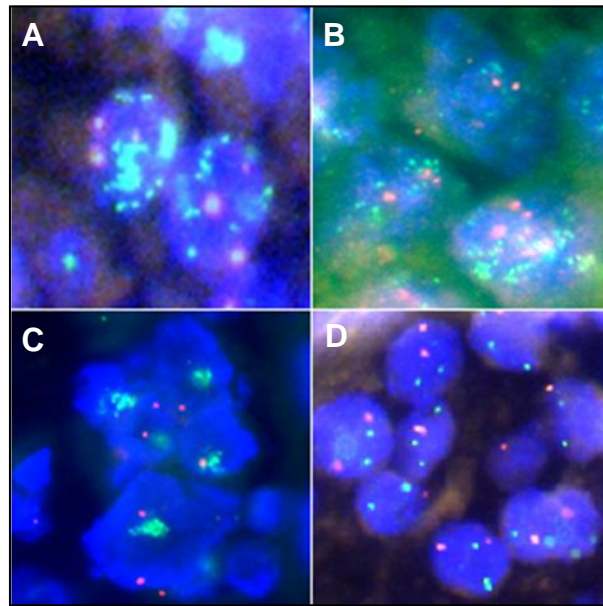


Abb. 8: Beispiele für Amplifikationen. Das Gensignal fluoresziert grün, das CEP12- bzw. TEL13-Signal orange, die Zellkerne sind mit DAPI blau angefärbt. A: Cluster-Amplifikation mit 20 PDX1-Genkopien pro Zellkern in einem Kolonkarzinom des Multi-Tumor-Arrays. Kolonkarzinome des Kolonkarzinom-TMAs mit B: extrachromosomaler PDX1-Amplifikation (ca. 15-30 Genkopien) und mit C: Cluster-Amplifikation (ca. 20-30 PDX1-Genkopien). D: Zellkerne mit jeweils zwei Gen- und zwei CEP-Signalen (Normalbefund).

### 3.3.2. Assoziation zum Phänotyp

Die PDX1-Ergebnisse wurden auf Assoziationen mit dem Tumor-Phänotyp untersucht. Hierbei wurden mehrere Parameter analysiert: das Stadium (pT1-pT4), die Differenzierung des Gewebes (G1-G3), der Lymphknotenstatus (N0-N2), der histologische Gewebetyp, der Typ der Invasionsfront (expansiv oder infiltrierend), und ob eine Gefäßinvasion nachweisbar war oder nicht (s. Tab. 6).

Die Daten lassen einen Trend hinsichtlich einer häufigeren PDX1-Amplifikation in fortgeschrittenen Tumoren erkennen. Einer von 51 (2,0 %) der frühen Tumoren (pT1) zeigte eine PDX1-Amplifikation, während in den pT4-Tumoren bei zehn von 185 (5,4%) Karzinomen eine Amplifikation gefunden wurde ( $p=0,4498$ ). Keines der als G1 klassifizierten Karzinome war amplifiziert ( $n=20$ ), während in zehn von 170 als G3 klassifizierten Tumoren eine PDX1-Amplifikation nachgewiesen werden konnte ( $p=0,3281$ ). Ein ähnlicher Trend zeigte sich auch beim Nodalstatus: 4,2 % der Tumoren ohne Lymphknoten-Metastasen (pN0) hatten eine PDX1-Amplifikation, Tumoren mit ausgeprägter Lymphknotenmetastasierung (pN2) wiesen in 5,6 % der Fälle eine PDX1-Amplifikation auf ( $p=0,2193$ ). Diese Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

Tab. 6: Assoziation der PDX1-Amplifikation mit dem Tumorphänotyp. n= Anzahl untersuchter Tumoren; Auswertbar= Anzahl auswertbarer Tumoren; Normal= Rate der Tumoren mit normalen PDX1-Befund (Ratio≤1); Poly= Rate der Tumoren mit Polysomien (TEL-13>2); Gain= Rate der Tumoren mit PDX1-Gains (1<Ratio<2); Amp= Rate der Tumoren mit PDX1-Amplifikation (Ratio≥2). p= postoperativ; K.= Karzinom; Siegelringz. =Siegelringzellkarzinom

	n	Auswertbar	Normal (%)	Poly (%)	Gain (%)	Amp (%)	p-Wert	
<b>PDX1</b>	1861	1288	75,9	13,7	5,5	4,8		
<b>Stadium</b>	<b>pT1</b>	80	51	82,4	7,8	7,8	2,0	0,4498
	<b>pT2</b>	281	204	81,4	11,8	3,4	3,4	
	<b>pT3</b>	1134	791	75,4	14,0	5,6	5,1	
	<b>pT4</b>	267	185	72,4	16,2	6,0	5,4	
<b>Grad</b>	<b>G1</b>	33	20	85	5,0	10	0	0,3281
	<b>G2</b>	1489	1041	76,2	13,5	5,6	4,8	
	<b>G3</b>	242	170	74,1	16,5	3,5	5,9	
<b>Nodal- status</b>	<b>pN0</b>	902	644	78,7	11,5	5,6	4,2	0,2193
	<b>pN1</b>	447	304	74,0	16,1	4,9	4,9	
	<b>pN2</b>	392	267	71,9	17,2	5,2	5,6	
<b>Gefäß- invasion</b>	<b>V0</b>	782	552	76,3	13,2	6,2	4,4	0,6345
	<b>V1</b>	603	448	73,9	16,1	5,6	4,5	
<b>Invasions- front</b>	<b>Infiltrierend</b>	871	606	73,9	15,2	6,6	4,3	0,5333
	<b>Expansiv</b>	513	393	76,8	13,5	4,8	4,8	
<b>Histologischer Subtyp</b>	<b>Adenok.</b>	1261	924	75,3	14,0	5,8	4,9	0,1136
	<b>medulläres K.</b>	5	0	0	0,0	0	0	
	<b>muzinöses K.</b>	119	78	74,4	19,2	6,4	0,0	
	<b>Siegelringz.</b>	5	2	50	50,0	0	0	
	<b>Andere</b>	12	7	100	0,0	0	0	

### 3.3.3. Assoziation zu molekularen Markern des Kolonkarzinoms

In der vorliegenden Untersuchung wurden acht für das Kolonkarzinom relevante molekulare Marker auf einen Zusammenhang mit PDX1-Amplifikationen geprüft. p53, BCL2 (B-Cell Lymphoma 2), p27 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), das proliferationsassoziierte Antigen Ki67, EGFR, C-MYC und Beta-Catenin wurden per Immunhistochemie in vorherigen Untersuchungen auf eine Expression geprüft und der HER2-Amplifikationsstatus per FISH erhoben (s. S. 19). Es ergaben sich bei drei Markern signifikante Assoziationen zu PDX1-Amplifikationen. So waren PDX1-Amplifikationen signifikant mit einer nukleären Akkumulation von p53 ( $p= 0,0162$ ),

fehlender BCL2-Expression (p= 0,021) und fehlender p27-Expression (p= 0,0429) assoziiert. Bei den übrigen Markern erreichte die Auswertung keine statistische Signifikanz. Die Berechnungen werden in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Assoziation der PDX1-Amplifikation mit molekularen Markern für das KRK. neg.= keine Expression; pos.= Expression vorhanden; Nukl.= Nukleusmembran; Membr.= Zellmembran; amp.= amplifiziert

	n	Auswertbar	Normal (%)	Poly (%)	Gain (%)	Amp (%)	p-Wert
<b>PDX1</b>	1437	1288	75,9	13,7	5,5	4,8	
<b>p53 neg.</b>		350	83,1	8,0	5,4	3,4	0,0162
<b>p53 pos.</b>		269	72,9	14,9	7,1	5,2	
<b>BCL2 neg.</b>		460	77,6	10,2	7,6	4,6	0,021
<b>BCL2 pos.</b>		159	81,8	13,2	1,9	3,1	
<b>p27 neg.</b>		334	76,4	10,8	8,7	4,2	0,0429
<b>p27 pos.</b>		277	81,2	11,2	3,3	4,3	
<b>Ki67 LI</b>		1169	16.1±9.7	14,8±10.5	16.9±9.8	16.9±11.7	0,327
<b>EGFR neg.</b>		622	81,0	10,0	4,8	4,2	0,1708
<b>EGFR pos.</b>		202	74,3	12,4	5,9	7,4	
<b>C-MYC neg.</b>		111	77,5	15,3	3,6	3,6	0,3008
<b>C-MYC pos.</b>		501	78,8	10,2	6,6	4,4	
<b>Beta-Catenin</b>							
<b>Nukl. neg./ Membr. neg.</b>		459	76,5	12,9	5,2	5,5	0,2643
<b>Nukl. neg./ Membr. stark</b>		313	74,8	15,7	7,0	2,6	
<b>Nukl. stark/ Membr. neg.</b>		39	69,2	23,1	2,6	5,1	
<b>Nukl. stark/ Membr. stark</b>		7	71,4	28,6	0,0	0,0	
<b>HER2 FISH normal</b>		986	75,4	14,4	5,9	4,4	0,2648
<b>HER2 FISH amp.</b>		26	57,7	26,9	7,7	7,7	

### 3.3.4. PDX1-Amplifikationen und die Prognose von KRK-Patienten

Von 921 Patienten mit klinischen Daten (Überlebenszeit nach der Operation) konnten Daten über die PDX1-Kopiezahl erhoben werden. Um einen möglichen Einfluss der PDX1-Amplifikation auf den Verlauf der Erkrankung zu untersuchen, wurde eine Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier durchgeführt (Abb. 9). Es zeigte sich, dass weder Amplifikationen noch Gains einen signifikanten Einfluss auf die Prognose ausüben.

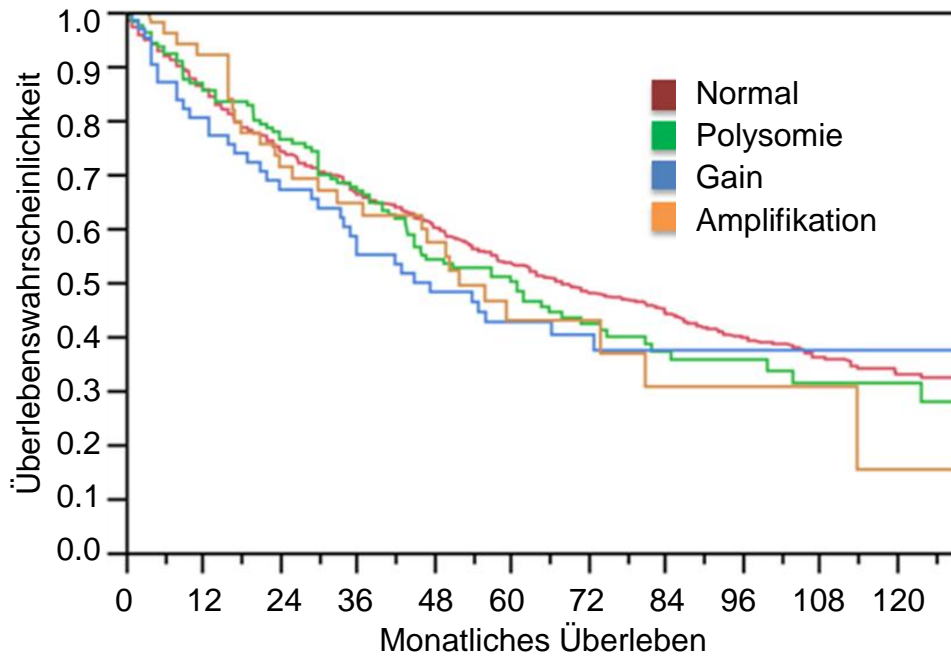


Abb. 9: Einfluss der PDX1-Amplifikation auf die Patientenprognose berechnet mithilfe einer Kaplan-Meier Überlebenskurve (p-Wert= 0,4363).

### 3.4. PDX1-Amplifikation in humanen Tumorzelllinien

Insgesamt konnten 20 von 143 Stenzen der Zelllinien auf dem TMA ausgewertet werden. In der Mammakarzinom-Zelllinie BT-474 konnte eine Amplifikation nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine PDX1-Kopiezahl von etwa sieben PDX1-Kopien, die Anzahl des Chromosom 13 wurde anhand der Telomersonde auf drei Kopien bestimmt.

#### 4. Diskussion

Im ersten Teil dieser Studie wurden insgesamt 1886 Tumoren aus über 100 verschiedenen Tumortypen erfolgreich untersucht. Der Nachweis von PDX1-Amplifikationen in lediglich sieben dieser Tumoren zeigt, dass diese Veränderung in humanen Tumoren eher selten ist. Amplifikationen mit 6- 20 Genkopien wurden in zwei Magenkarzinomen, zwei Urothelkarzinomen in den Stadien Ta und T2-4, einem großzelligen Bronchialkarzinom, einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und einem Kolonkarzinom mit auf die jeweilige Tumorentität bezogene Amplifikationsraten von 2,2- 5,3 % gefunden.

PDX1-Amplifikationen in diesen oder anderen Tumorentitäten sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es gibt allerdings mehrere Studien, die sich mit der Funktion und Expression von PDX1 im Magenkarzinom beschäftigen. Ma et al. maßen mittels Immunhistochemie, Western Blot, Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und quantitativer real-time RT-PCR eine im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe erniedrigte PDX1-Expression in 29 von 39 untersuchten Magenkarzinomen. Auch in sieben Magenkarzinomzelllinien wiesen sie nur eine geringe oder keine Expression nach. Zudem hemmte ektop in den Zelllinien exprimiertes PDX1 die Zellproliferation und induzierte Apoptose [98]. Auch andere Studien geben Hinweise auf eine tumorsuppressive Funktion von PDX1 im Magenkarzinom [94, 99]. Interessant ist aber, dass von den zehn verbleibenden von Ma et al. untersuchten Magenkarzinomen, die keine verminderte PDX1-Expression aufwiesen, sechs Tumoren eine PDX1-Überexpression zeigten. Diese Untergruppe von Magenkarzinomen könnte einen anderen Tumorigeneseppfad eingeschlagen haben, der von einer erhöhten PDX1-Expression profitiert. Zudem ist eine differenzierte Betrachtung der Expressionsmuster von PDX1 bei der Analyse von Magenschleimhaut wichtig, da eine PDX1-Expression normalerweise nur in Pylorus und Antrum vorkommt [93]. Ma et al. sind in ihrer Studie von 2008 leider nicht auf diesen Aspekt eingegangen [98]. Leys et al. und Sakai et al. berücksichtigten diesen Sachverhalt und ermittelten immunhistochemisch eine PDX1-Expression in 50,0 % (n= 46) bzw. 81,0 % (n= 21) der Tumoren antralen Ursprungs, während Tumoren des Fundus bzw. Korpus in 77,0 % (n= 39) bzw. 41,4 % (n= 58) der Fälle PDX1 exprimierten [93, 94]. Die PDX1-Expression verliert sich demnach einerseits in Karzinomen des Antrums und tritt andererseits ektop in Tumoren des Korpus und

Fundus auf. PDX1 scheint eine unterschiedliche Rolle für die Entstehung von Magenkarzinomen in Abhängigkeit von der Lokalisation zu spielen: Im Antrum geht die PDX1-Expression während der Karzinogenese verloren, während im Korpus und Fundus PDX1 erst im Karzinom exprimiert wird.

Studien über PDX1-Amplifikationen oder die PDX1-Expression in der Harnblase oder im Bronchialkarzinom gibt es bislang nicht.

Geringgradige Erhöhungen der Genkopiezahl (5 bzw. 3,5 Kopien) fielen in zwei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus auf. Interessanterweise wiesen Takahashi et al. 2007 nach, dass PDX1 im Normalepithel des Ösophagus praktisch nicht exprimiert, in Plattenepithelkarzinomen (n= 48) aber signifikant höher exprimiert wurde. Dabei ergaben sich keine Unterschiede für die erhöhten Expressionslevel bezüglich klinisch-pathologischer Parameter [92].

In der Literatur ist PDX1 bisher vor allem als putatives Onkogen im Pankreaskarzinom diskutiert worden (s. S. 13). In fast der Hälfte der exokrinen Pankreaskarzinome setzt eine PDX1-Expression wieder ein, während sie sonst auf das Embryonalstadium des exokrinen Gewebes beschränkt ist [84, 85]. Liu et al. konnten nachweisen, dass eine forcierte PDX1-Überexpression in Pankreaskrebszellen die Zellproliferation und -invasion steigert [86]. Die Gründe für die erneute PDX1-Expression im Pankreaskarzinom sind noch nicht bekannt. Eine mögliche Ursache einer Überexpression ist die Amplifikation, in dieser Arbeit sind aber keine PDX1-Amplifikationen nachgewiesen worden (40 von 105 Pankreaskarzinomen auswertbar). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die PDX1-Amplifikation im Pankreas zumindest sehr selten ist und andere Mechanismen für die Überexpression in den meisten Pankreaskarzinomen verantwortlich sein dürften.

Weitere Tumortypen mit erhöhter PDX1-Expression in der Literatur sind Mamma-, Prostata- und Nierenkarzinome [90,91]. In diesen Tumortypen wurden in der vorliegenden Arbeit keine PDX1-Kopiezahlveränderungen gefunden.

Der Nachweis von 5,3 % PDX1-Amplifikationen in Kolonkarzinomen wurde zum Anlass genommen, die klinische Relevanz dieser Veränderung in dieser wichtigen Tumorentität detaillierter zu untersuchen.

Der Vergleich der in dieser Arbeit nachgewiesenen PDX1-Amplifikationen mit dem Tumorphänotyp der Kolonkarzinome und der Patientenprognose zeigte keine signifikanten Assoziationen. Insbesondere stand die PDX1-Amplifikation in keinem Zusammenhang mit der Überlebenszeit der Patienten mit Kolonkarzinom. Jedoch

fanden sich PDX1-Amplifikationen vergleichsweise häufiger in fortgeschrittenen (5,4%) als in frühen (2,0 %) Karzinomen oder in Adenomen (0,62 %). Genauso fanden sich Amplifikationen häufiger in entdifferenzierten Tumoren (Grad 3: 5,9 %) als in differenzierten Karzinomen (Grad 1: 0 %). Dies ist für Genamplifikationen typisch, weil sie als Folge genetischer Instabilität auftreten. Amplifikationen können grundsätzlich nur im Rahmen einer gestörten DNS-Reparatur entstehen. Nur wenn veränderte DNS den Zellzyklus ungehindert durchlaufen kann und keine Reparatur- bzw. Apoptosesysteme initiiert werden, kann sie an die Tochterzellen weitergegeben werden. Das Vorliegen von Amplifikationen ist dementsprechend mit genetischer Instabilität assoziiert, sie ist ein häufiges Merkmal fortgeschrittener Tumoren. Beispiele für eine Assoziation von Amplifikationen mit fortgeschrittenen und entdifferenzierten Tumoren sind Cyclin C-, c-MET (hepatocyte growth factor receptor)- und MDM2 (p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog)- Amplifikationen im KRK [100-103], MYC-, FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1)-, RAF1(v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1)-, MDM2- und E2F3-Amplifikationen im Blasenkrebs [65, 104-106] und Amplifikationen von HER2, EGFR, C-MYC, Cyclin D1 und MDM2 in Mammakarzinomen [107, 108]. Ein solcher Zusammenhang konnte in der vorliegenden Studie nicht mit statistischer Signifikanz belegt werden, dies liegt vermutlich in erster Linie an der geringen Anzahl PDX1-amplifizierter Tumoren (62/1288).

Einer der wichtigsten Faktoren, um die Integrität des Genoms zu bewahren, ist p53 (s. S. 10). Die Inaktivierung von p53 beispielsweise durch Mutation ist häufig mit genetischer Instabilität in malignen Tumoren assoziiert [109, 110]. Auch in der vorliegenden Untersuchung wiesen Tumoren mit PDX1-Veränderungen signifikant häufiger eine positive Immunfärbung für p53 auf als Tumoren ohne Amplifikation. Die immunhistochemische Anfärbbarkeit von p53 ist hierbei als Surrogatmarker für das Vorliegen einer inaktivierenden p53-Mutation zu sehen [111, 112]. Mutiertes p53-Protein akkumuliert im Zellkern aufgrund einer verlängerten Halbwertszeit, während das Wildtyp-p53 mit einer Halbwertszeit von weniger als 20 Minuten [113] immunhistochemisch nicht darstellbar ist.

In der gesunden Zelle unterliegt die Apoptose, der programmierte Zelltod, einer strengen Kontrolle. Der Verlust dieser Mechanismen ist ein weiterer wichtiger Faktor der Tumorprogression. In dieser Studie war die PDX1-Amplifikation signifikant mit dem Verlust der BCL2-Expression assoziiert. Da BCL2 ein anti-apoptotisches Protein

ist, erscheint dieser Zusammenhang zunächst widersprüchlich, wenn man einen fördernden Einfluss der PDX1-Amplifikation auf die Karzinogenese annimmt. Es existiert jedoch eine Vielzahl von Publikationen, die einen Zusammenhang zwischen starker BCL2-Expression und einer guten Patientenprognose belegen beispielsweise in Mammakarzinomen [114-116], aber auch in Kolonkarzinomen [117-120], während der Verlust der BCL2-Expression mit nachteiligen Tumorparametern einhergeht. Die Assoziation der PDX1-Amplifikation mit dem Verlust der BCL2-Expression weist daher auf PDX1 als einen ungünstigen Parameter hin.

CDKN1B kodiert für das Protein p27, welches den Übergang von der G0 zur G1-Phase des Zellzyklus kontrolliert und diesen verhindert, wenn es akkumuliert [121]. Der Verlust einer p27-Expression ist im KRK wie auch in anderen Tumorentitäten ein Marker für eine schlechte Prognose [121-124]. In der vorliegenden Arbeit war eine PDX1-Amplifikation signifikant mit Tumoren assoziiert, die p27 nicht exprimierten. Dies deutet auch auf PDX1 als einen ungünstigen Parameter im Kolonkarzinom hin. Die Ergebnisse einer Studie legen sogar eine direkte Regulation der p27-Expression durch PDX1 nahe. Liu et al. zeigten 2011 mit in vitro- und in vivo-Verfahren in einer embryonalen Zelllinie, dass eine stabile Transfektion von PDX1 unter anderem zu einer Senkung der p27-Expression führte. Diese und weitere veränderte Expressionslevel Zellzyklus-relevanter Proteine resultierten in einer erhöhten Zellproliferation der Zellen [87]. Im Hinblick auf den in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant mit PDX1-amplifizierten Tumoren assoziierten Ki67-Index, der ein Marker für Zellproliferation ist, scheint die Wirkung der fehlenden p27-Expression in PDX1-amplifizierten Tumoren aber nicht ausgeprägt zu sein.

In dieser Arbeit wurde geprüft, ob PDX1-Amplifikationen häufiger in HER2-amplifizierten Tumoren vorkamen als in Karzinomen ohne HER2-Amplifikation. PDX1-Amplifikationen fanden sich vergleichsweise häufiger in HER2-amplifizierten (7,7 %) als in nicht HER2-amplifizierten (4,4 %) Karzinomen und nur 57,7 % der HER2-amplifizierten Tumore wurden bezüglich der PDX1-Kopiezahl als normal eingestuft. Obwohl sich ein Trend andeutete, erreichte die Auswertung wahrscheinlich aufgrund der geringen Fallzahl an HER2-amplifizierten Tumoren (n= 26) keine statistische Signifikanz ( $p= 0,2648$ ). In der Literatur wird diskutiert, ob durch bestimmte onkogene Veränderungen Amplifikationen begünstigt werden [125]. Eine überzufällige Häufung von Amplifikationen verschiedener Genomregionen fällt in bestimmten Mammakarzinomen auf, hier wird von einem sogenannten „Amplifier“



Phänotyp gesprochen [108, 126-128]. Im KRK ist eine Häufung von Amplifikationen noch nicht bekannt, das mag auch an den niedrigen Amplifikationsraten bisher im KRK untersuchter Gene liegen [67]. Letztlich könnte dieser Trend auf einen amplifikationsaffinen Subtyp des KRKs hinweisen, in dem eine hohe genomische Instabilität vorherrscht, welche Amplifikationen begünstigt.

Bei der Analyse des Zelllinien-TMAs konnten nur 20 der 144 Zelllinien ausgewertet werden. Dies ist vermutlich auf technische Probleme zurückzuführen. Eine erneute Analyse mit veränderten Versuchsbedingungen wie beispielsweise einem längeren Verdau des Gewebes könnte Abhilfe schaffen. Auf diese weiterführenden Experimente wurde jedoch verzichtet, weil PDX1-Amplifikationen so selten waren. In der Zelllinie BT-474 konnte formal eine Amplifikation nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine PDX1-Kopiezahl von etwa sieben PDX1-Kopien, die Anzahl von Chromosom 13 wurde mit der Telomersonde auf drei Kopien bestimmt. Laut ATCC (American Type Culture Collection) ist die Zelllinie BT-474 hypertetraploid und hat ein 13q-Isochromosom [129]. Das Ergebnis spiegelte somit acht PDX1-Kopien auf vier Kopien des Chromosom 13 wider, es handelte sich hier um keine PDX1-Amplifikation.

Der Nachweis einer PDX1-Amplifikation in einer Zelllinie wäre für anknüpfende Experimente sehr nützlich. Um zu erfahren, inwieweit die PDX1-Kopiezahl Einfluss auf die Expression hat, könnten Gen und Genprodukt gezielt ausgeschaltet oder gesteigert werden.

PDX1 wurde beim Menschen auf Chromosom 13, Zytobande 13q12.1, lokalisiert [130]. Der Chromosomenarm 13q und auch kleinere DNS-Sequenzen, die PDX1 beinhalten, sind im Kolonkarzinom amplifiziert nachgewiesen worden. In einer Meta-Analyse von 2006 wurde die amplifizierte Sequenz 13q11-q34 in Primärtumoren im Vergleich zu Adenomen signifikant häufiger beobachtet [131]. Solche Amplifikationen könnten die Ursache für die oben beschriebene Überexpression im Kolonkarzinom sein.

Nicht alle Gene innerhalb eines Amplikons werden auch exprimiert. Daher werden oft Expressionsanalysen angeschlossen, um nicht exprimierte Gene aus der Liste möglicher Kandidaten auszuschließen [125]. Scheffer et al. haben die Genomveränderungen im KRK von 299 Expressions- und 130 SNP- (Single Nucleotide Polymorphism) Arrays untersucht und statistisch analysiert. POLR1D (polymerase (RNA) I polypeptide D, 16kDa), ein Gen, das für eine Untereinheit der

RNA-Polymerase I und III kodiert, wurde als Kandidatengen gehandelt, weil es nicht nur amplifiziert war, sondern auch vermehrt exprimiert wurde. PDX1 liegt nur etwa 250 Kilobasenpaare von diesem Gen entfernt, wurde von den Autoren aber nicht speziell untersucht [132].

Platzer et al. untersuchten mit DNS-Microarrays den Expressions- und Amplifikationsstatus von 15 Lebermetastasen von KRKs und acht aus Lebermetastasen gewonnenen Zelllinien. Obwohl eine Überexpression amplifizierter Regionen selten war, wurden acht von 251 Genen der amplifizierten Sequenz 13q11-13q21 überexprimiert [133]. Es ist möglich, dass PDX1 in dieser Region enthalten ist. PDX1 genauer im Vergleich mit den im Paper angegebenen Sequenzen zu lokalisieren, scheitert an den sich noch ändernden Sequenzdaten. Wegen des ständigen Zugewinns an Wissen über das menschliche Genom wird es immer neu systematisiert und Gene werden unterschiedlichen Sequenzen zugeordnet. Dunham et al. haben erst 2004 das humane Chromosom 13 vollständig sequenziert und analysiert [134]. PDX1 ist in der aktuellen Version von Ensembl Gene nicht in der Sequenz enthalten, in der Archivversion vom August 2007 war es das hingegen schon [135].

Expressionsanalysen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Arrays könnten einen weiteren Baustein darstellen, der die Rolle von PDX1-Amplifikationen im KRK charakterisiert. Damit wäre feststellbar, ob ein Zusammenhang zwischen der PDX1-Kopiezahl und der PDX1-Expressionsstärke besteht. Wenn PDX1 in den amplifizierten Kolonkarzinomen gar nicht exprimiert würde, könnte PDX1 als Driver-Gen ausgeschlossen werden. Dann kämen andere Kandidatengene wie beispielsweise die im ursprünglichen Amplikon neben PDX1 enthaltenen Gene ATP5EP2 und CDX2 in Frage.

ATP5EP2 ist ein Pseudogen [136], deshalb kodiert es wahrscheinlich nicht für ein funktionierendes Protein. Es gibt keine Literatur zu diesem Gen.

Das vermutlich damit verwandte Gen ATP5E (synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit), welches auf Zytobande 20q13 lokalisiert ist, kodiert für eine Untereinheit des F1-Komplexes der mitochondrialen ATP-Synthase. Die ATP-Synthase ist für die Energiebereitstellung in der Zelle und für den Ablauf einer wirksamen Apoptose essentiell [137, 138]. Passend hierzu ist der katalytische F1-Komplex der Synthase in vielen Karzinomen herunterreguliert [139, 140], so auch im Kolonkarzinom [141, 142]. In der Zusammenschau dieser Daten

erscheint es unwahrscheinlich, dass das Pseudogen ATP5EP2 Ziel einer Amplifikation ist.

CDX2 war auch in dem ursprünglich gefundenen Amplikon enthalten. Es ist wie PDX1 ein Transkriptionsfaktor aus der Homeoboxgenfamilie, der eine Rolle in der Insulinexpression und der Differenzierung des intestinalen Epithels einnimmt [143]. CDX2 wird im embryonalen wie auch adulten Kolonepithel exprimiert [144]. Diese Expression verliert sich in Kolonkarzinomen [145-147], sie sinkt mit zunehmender Entdifferenzierung des Gewebes [83, 148, 149]. CDX2-heterozygote Mäuse entwickeln nach Mutagenexposition früher Kolonkarzinome im Vergleich zu ihren Wild-Typ Verwandten [150]. Das Protein hemmt den Zellzyklus durch die Stabilisierung von p27 [148] und eine wiederhergestellte CDX2-Expression in der Kolonkarzinomzelllinie HT 29 reduzierte signifikant die Wachstumsrate der Zellen und die Phorbol-ester-stimulierte Zellmigration [151]. Wenn CDX2 eine Tumorsuppressor-Funktion im Kolon hat, wie die Literatur es andeutet, wird es nicht das Driver-Gen einer Amplifikation sein. Darüber hinaus war CDX2 in sieben von zehn untersuchten humanen Kolonkarzinomen mit chromosomaler Instabilität amplifiziert, diese Veränderung führte jedoch nicht zu einer Protein-Expressionssteigerung [152].

Obwohl es unwahrscheinlich ist, dass ATP5EP2 oder CDX2 Zielgene einer Amplifikation sind, würde man auch mit Gensonden, die an diese Gene binden, annähernd gleiche Amplifikationsraten wie für PDX1 erhalten. Amplikons sind fast immer größer als ihr Zielgen [125] und da ATP5EP2 und CDX2 in unmittelbarer Nachbarschaft zu PDX1 liegen, würden sie häufig ko-amplifiziert vorliegen, selbst wenn PDX1 das Driver-Gen ist.

Diese Studie ist ein Beispiel für die Effizienz der Gewebemikroarray- Technologie zur Detektion von seltenen molekularen Veränderungen. Die Analyse von über 5500 Tumoren mit klassischen Verfahren– Schnitt für Schnitt an jedem Tumor einzeln– wäre im Rahmen der zur Verfügung stehenden Zeit nicht möglich gewesen. Die TMA Technologie erlaubt darüber hinaus ein Maß an Standardisierung der Analyse, das mit herkömmlichen Methoden nicht erreichbar ist. Weil die Menge an Gensonde, die in einem Versuchsansatz hergestellt werden kann, begrenzt ist, hätten im klassischen Verfahren nur etwa 15 Objektträger mit derselben FISH-Sonde analysiert werden können. Abgesehen von den enormen Kosten der Reagenzien, die bei der

Herstellung von FISH-Sonden für 5500 Analysen angefallen wären, muss immer mit einer gewissen Varianz der Versuchsergebnisse je nach Qualität der Sonde gerechnet werden. Für die vorliegende Studie wurde aus mehreren Sondenansätzen die beste ausgewählt, sodass alle Gewebe unter genau denselben, optimalen experimentellen Bedingungen ausgewertet werden konnten. Aufgrund der kleinen Gewebeproben, die unter Umständen den Tumor nicht vollständig repräsentieren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine gewisse Anzahl an PDX-Amplifikationen übersehen worden ist. Dieser Mangel ist aber wegen der hohen Fallzahl vernachlässigbar. Bei der Untersuchung humaner Tumoren auf PDX1-Amplifikationen ohne eine passende Zentromersonde ergeben sich Fehler technischer Art. Bei geringfügigen Kopiezahlerhöhungen kann ohne die korrekte Referenzsonde nicht zwischen Double-Minute-Amplifikationen und Polysomien unterschieden werden. Hierdurch können Amplifikationen übersehen oder Polysomien fälschlicherweise als Amplifikation klassifiziert werden.

Für das Kolonkarzinom ergab sich bei der Analyse humaner Tumoren eine Amplifikationsrate von 5,3 % (1/19 Kolonkarzinomen). In der Untersuchung von 1288 Kolonkarzinomen war die Amplifikationsrate mit 4,8 % nahezu identisch mit der Häufigkeit auf dem Multitumorarray. Dies kann als Beweis gelten, dass auch eine Untersuchung kleinerer Fallzahlen einzelner Tumorentitäten einen guten Überblick über die Häufigkeit und damit Bedeutung einer Amplifikation verschaffen kann.

Die Häufigkeit der PDX1-Amplifikation in humanen Tumoren bleibt aufgrund der fehlenden korrekten Referenzsonde trotzdem fraglich. Da Cluster aber sicher erkannt werden konnten und sie in dieser Arbeit nur selten waren, kann zumindest festgehalten werden, dass es nur selten High-Level PDX1-Amplifikationen in humanen Tumoren gibt.

## 5. Zusammenfassung

Amplifikationen sind DNS-Vermehrungen, die zu einer Erhöhung der Gen-Kopiezahl und damit auch des Expressionsniveaus der betroffenen Gene führen können. Amplifizierte DNS-Abschnitte (Amplikons) enthalten in der Regel mindestens ein tumorrelevantes Gen, das durch die Amplifikation onkogen aktiviert wird und den Tumorzellen mittels Amplifikation einen Wachstumsvorteil verschafft. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Amplikon auf Chromosom 13q12, das in der Kolo 380 Zelllinie entdeckt wurde, näher untersucht. Es enthält u.a. das Gen „Pancreatic and Duodenal Homeobox 1“ (PDX1), einen embryonalen Transkriptionsfaktor, der in zahlreichen humanen Tumoren überexprimiert wird. Darüber hinaus werden ihm in Pankreaskarzinom-Zelllinien onkogene Eigenschaften zugeschrieben.

Die Ziele der Arbeit waren, a) die Häufigkeit der PDX1-Amplifikation in über 100 verschiedenen humanen Tumortypen zu bestimmen, b) nach möglichen Assoziationen zwischen der PDX1-Amplifikation und dem Tumorphänotyp sowie der Patientenprognose in einem großen Kollektiv von Kolonkarzinomen zu suchen und c) das Vorliegen einer PDX1-Amplifikation mit anderen molekularen Markern des Kolonkarzinoms (p53, BCL2, p27, Ki67, EGFR, C-MYC, Beta-Catenin, HER2) zu korrelieren, für die Daten bereits vorlagen. Dazu wurden zwei Gewebemikroarrays (TMAs) mit insgesamt über 5.800 Tumorgewebeproben mit einer selbst hergestellten PDX1-Sonde mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) untersucht und eine statistische Datenanalyse durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Amplifikationen von PDX1 in humanen Tumoren generell selten sind. Nur 0,4 % von 1.886 analysierbaren Tumoren zeigten eine Amplifikation, darunter zwei Harnblasenkarzinome, zwei Magenkarzinome und jeweils ein Lungen-, Ösophagus- und Kolonkarzinom. Die Analyse des Kolonkarzinom-spezifischen TMAs ergab bei 1.288 analysierbaren Tumorstanzen eine mittlere PDX1-Amplifikationsrate von 4,8 %. Es zeigte sich eine Zunahme der Amplifikationshäufigkeit mit steigendem Tumorstadium (pT1: 2,0 %, pT4: 5,4 %) und Malignitätsgrad (G1: 0 %, G2: 4,8 %, G3: 5,9 %), jedoch waren diese Assoziationen nicht signifikant ( $p= 0,4498$  bzw.  $p= 0,3281$ ). Dies ist vermutlich auf die geringe Anzahl von Amplifikationen ( $n= 62$ ) zurückzuführen. Die Amplifikation zeigte keinen

Einfluss auf die Patientenprognose. Der Vergleich mit weiteren Markern des Kolonkarzinoms ergab, dass die PDX1-Amplifikation signifikant mit der nukleären Akkumulation des Tumorsuppressor-Proteins p53 (gleichbedeutend mit dessen Inaktivierung;  $p= 0,0162$ ) sowie dem Verlust der Expression des Apoptose-Regulators BCL2 ( $p= 0,021$ ) und des Zellzyklus-Inhibitors p27 ( $p= 0,0429$ ) assoziiert war.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die PDX1-Amplifikation zu den eher seltenen molekularen Veränderungen in humanen Tumoren gehört. Beim Kolonkarzinom ist sie mindestens tendenziell mit ungünstigen Parametern des Tumors wie fortgeschrittenem Stadium und Entdifferenzierung sowie ungünstigen molekularen Parametern assoziiert.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP5E</b>	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit
<b>ATP5EP2</b>	ATP Synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit pseudogene 2
<b>BCL2</b>	B-Cell Lymphoma 2
<b>CA-19.9</b>	Carbohydrate Antigen 19.9
<b>CDKN1B/p27</b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
<b>CDX2</b>	caudal type homeobox 2
<b>CEA</b>	carcinoembryonales Antigen
<b>CEP</b>	Zentromer
<b>CGH</b>	Komparative genomische Hybridisierung
<b>CIMP</b>	CpG island methylation pathway „CpG Inselmethylierungsweg“
<b>CIN</b>	Chromosomale Instabilität
<b>CK20</b>	Zytokeratin 20
<b>c-MET</b>	hepatocyte growth factor receptor
<b>C-MYC</b>	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
<b>DAPI</b>	0,2 mM 4'5-Diamindino-2-Phenyl-Indol
<b>DCC</b>	Deleted in Colon Cancer
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>dUTP</b>	Desoxyuridintriphosphat
<b>EGFR</b>	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
<b>E2F3</b>	E2F transcription factor 3
<b>FAP</b>	Familiäre adenomatöse Polyposis
<b>FGFR1</b>	fibroblast growth factor receptor 1
<b>FISH</b>	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate
<b>FOBT</b>	Fäkaler okkultur Bluttest
<b>G</b>	Histologischer Differenzierungsgrad von Tumorgewebe
<b>GIST</b>	Gastrointestinaler Stromatumor
<b>HER2</b>	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
<b>hMLH1</b>	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2
<b>HNPCC</b>	Hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
<b>IDX1</b>	islet/duodenum homeobox 1
<b>IPF1</b>	insulin promoter factor 1
<b>IUF1</b>	insulin upstream factor 1
<b>KRAS</b>	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

<b>KRK</b>	Kolorektales Karzinom
<b>M</b>	Metastasenstatus; Vorhandensein von Fernmetastasen
<b>MDM2</b>	p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog
<b>MMR</b>	Mismatch Repair
<b>MODY</b>	maturity onset diabetes of the young
<b>MSI</b>	Mikrosatelliteninstabilität
<b>N-MYC</b>	neuroblastoma-derived v-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene
<b>N</b>	Nodalstatus; Vorhandensein von regionären lymphknotenmetastasen
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction (engl.)= Polymerase Kettenreaktion
<b>PDX1</b>	pancreatic and duodenal homeobox 1
<b>POLR1D</b>	polymerase (RNA) I polypeptide D, 16kDa
<b>POL1</b>	Polymerase 1
<b>p16</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<b>RAF1</b>	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
<b>rpm</b>	rounds per minute
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
<b>sCD26</b>	soluble Cluster of Differentation 26
<b>SCC</b>	Sodiumcitrat, NaCl
<b>SCID</b>	severe combined immunodeficiency
<b>SMAD4</b>	mothers against DPP homolog 4
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>STF1</b>	somatostatin transactivating factor 1
<b>pT</b>	postoperativ festgestelltes Tumorstadium; Ausdehnung des Primärtumors
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TEL</b>	Telomer
<b>THBS1</b>	Thrombospondin 1
<b>TMA</b>	Tissue-Microarray
<b>TWEEN</b>	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
<b>UICC</b>	Union internationale contre le cancer
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b>5-JÜR</b>	5-Jahresüberlebensrate



## 7. Literaturverzeichnis

1. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2010) Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Berlin. 12, 36.
2. Goldin B (1986) In situ bacterial metabolism and colon mutagens. *Annu Rev Microbiol* 40: 367-93.
3. Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F (2011) Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 792362: 1-19.
4. Baron J, Sandler R, Bresalier R, Quan H, Riddell R, Lanas A, Bolognese J, Oxenius B, Horgan K, Loftus S, Morton D; APPROVe Trial Investigators (2006) A randomized trial of rofecoxib for the chemoprevention of colorectal adenomas. *Gastroenterology* 131: 1674-82.
5. Logan R, Grainge M, Shepherd V, Armitage N, Muir K, ukCAP Trial Group (2008) Aspirin and folic acid for the prevention of recurrent colorectal adenomas. *Gastroenterology* 134: 29-38.
6. Elder D, Halton D, Hague A, Paraskeva C (1997) Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clin Cancer Res* 3: 1679-83.
7. Chan T, Morin P, Vogelstein B, Kinzler K (1998) Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 681-6.
8. Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Fleig W, Fölsch P, Frühmorgen P, Graeven U, Hohenberger W, Holstege A, Junginger T, Kopp I, Kühlbacher T, Porschen R, Propping P, Riemann J, Rödel C, Sauer R,

- Sauerbruch T, Schmitt W, Schmoll H, Zeitz M, Selbmann H (2008) S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“. Ergebnisse evidenzbasierter Konsensuskonferenzen am 6./7. Februar 2004 und am 8./9. Juni 2007 (für die Themenkomplexe IV, VI und VII) Z Gastroenterol. 46: 1-73.
9. Layer G, Riemann J (2007) Screening des kolo-rektalen Karzinoms. Radiologe 48: 26-32.
  10. Hundt S, Haug U, Brenner H (2007) Blood markers for early detection of colorectal cancer: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16: 1935-53.
  11. Levin B (2006) Molecular screening testing for colorectal cancer. Clin Cancer Res 12: 5014-7.
  12. Cordero O, Imbernon M, Chiara L, Martinez-Zorzano V, Ayude D, de la Cadena M, Rodriguez-Berrocal F (2011) Potential of soluble CD26 as a serum marker for colorectal cancer detection. World J Clin Oncol 2: 245-61.
  13. Locker G, Hamilton S, Harris J, Jessup J, Kemeny N, Macdonald J, Somerfield M, Hayes D, Bast R Jr; ASCO (2006) ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. J Clin Oncol 24: 5313-27.
  14. Graeven U, Schmiegel W (2004) Tumoren des Dün- und Dickdarms. In: Innere Medizin. Classen M, Diehl D, Kochsiek K, Berdel W, Böhm M, Schmiegel W (Hrsg.), 5. Auflage, Urban & Fischer, München Jena. 1238.
  15. Böcker W, Denk H, Heitz P, Moch H (2004) Pathologie, 3. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München Jena. 742-45.
  16. Renz-Polster H, Krautzig S (2008) Basislehrbuch Innere Medizin, 4. Auflage, Urban & Fischer, München. 619-22.

17. Herold G (2010) Innere Medizin. Dr. med. Gerd Herold, Köln. 473-78.
18. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351: 337-45.
19. Kabbinavar F, Hambleton J, Mass R, Hurwitz H, Bergsland E, Sarkar S (2005) Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23: 3706-12.
20. Grossmann A, Samowitz W (2011) Epidermal growth factor receptor pathway mutations and colorectal cancer therapy. *Arch Pathol Lab Med* 135: 1278-82.
21. Messa C, Russo F, Caruso M, Di Leo A (1998) EGF, TGF-alpha, and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncol* 37: 285-9.
22. Porebska I, Harlozińska A, Bojarowski T (2000) Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour Biol* 21: 105-15.
23. Karapetis C, Khambata-Ford S, Jonker D, O'Callaghan C, Tu D, Tebbutt N, Simes R, Chalchal H, Shapiro J, Robitaille S, Price T, Shepherd L, Au H, Langer C, Moore M, Zalberg J (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359: 1757-65.
24. Van Cutsem E, Köhne C, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh J, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P (2009) Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360: 1408-17.

25. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann J, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos A, Zubel A, Koralewski P (2009) Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27: 663-71.
26. Peeters M, Price T, Cervantes A, Sobrero A, Ducreux M, Hotko Y, André T, Chan E, Lordick F, Punt C, Strickland A, Wilson G, Ciuleanu T, Roman L, Van Cutsem E, Tzekova V, Collins S, Oliner K, Rong A, Gansert J (2010) Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 28: 4706-13.
27. Douillard J, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocákova I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon J, Rother M, Oliner K, Wolf M, Gansert J (2010) Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 28: 4697-705.
28. Ålgars A, Lintunen M, Carpén O, Ristamäki R, Sundström J (2011) EGFR gene copy number assessment from areas with highest EGFR expression predicts response to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Br J Cancer* 105: 255-62.
29. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S, Bardelli A (2005) Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 6: 279-86.
30. Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G, Cortesi E, Nichelatti M, Gambacorta M, Siena S (2007) Epidermal growth factor receptor gene copy

number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol* 25: 3238-45.

31. Lièvre A, Bachet J, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile J, Côté J, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66: 3992-5.
32. Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne L, Cavalli F, Mazzucchelli L (2007) PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 97: 1139-45.
33. Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, Jänne P, Carnaghi C, Calandri C, Bencardino K, Ligorio C, Ciardiello F, Pressiani T, Destro A, Roncalli M, Crino L, Franklin W, Santoro A, Varella-Garcia M (2008) EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 19: 717-23.
34. Scartozzi M, Bearzi I, Mandolesi A, Pierantoni C, Loupakis F, Zaniboni A, Negri F, Quadri A, Zorzi F, Galizia E, Berardi R, Biscotti T, Labianca R, Masi G, Falcone A, Cascinu S (2009) Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gene copy number (GCN) correlates with clinical activity of irinotecan-cetuximab in K-RAS wild-type colorectal cancer: a fluorescence in situ (FISH) and chromogenic in situ hybridization (CISH) analysis. *BMC Cancer* 9, 30: 1-8.
35. Personeni N, Fieuws S, Piessevaux H, De Hertogh G, De Schutter J, Biesmans B, De Roock W, Capoen A, Debiec-Rychter M, Van Laethem J, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S (2008) Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study. *Clin Cancer Res* 14: 5869-76.

36. Morson B (1974) President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med* 67: 451-7.
37. Fearon E, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: p. 759-67.
38. Powell S, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan T, Hamilton S, Thibodeau S, Vogelstein B, Kinzler K (1992) APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359: 235-7.
39. Bos J, Fearon E, Hamilton S, Verlaan-de Vries M, van Boom J, van der Eb A, Vogelstein B (1987) Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327: 293-7.
40. Zhou S, Buckhaults P, Zawel L, Bunz F, Riggins G, Dai J, Kern S, Kinzler K, Vogelstein B (1998) Targeted deletion of Smad4 shows it is required for transforming growth factor beta and activin signaling in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2412-6.
41. Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, Bredesen D, Scoazec J, Mehlen P (2004) Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431: 80-4.
42. Ohue M, Tomita N, Monden T, Fujita M, Fukunaga M, Takami K, Yana I, Ohnishi T, Enomoto T, Inoue M, et al (1994) A frequent alteration of p53 gene in carcinoma in adenoma of colon. *Cancer Res* 54: 4798-804.
43. Beggs A, Hodgson S (2008) The genomics of colorectal cancer: state of the art. *Curr Genomics* 9: 1-10.
44. Little M (2010) Cancer models, genomic instability and somatic cellular Darwinian evolution. *Biol Direct* 5: 1-19.
45. Loeb L (2001) A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61: 3230-9.

46. Järvinen H, Aarnio M, Mustonen H, Aktan-Collan K, Aaltonen L, Peltomäki P, De La Chapelle A, Mecklin J (2000) Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 118: 829-34.
47. Boland C, Goel A (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138: 2073-87.
48. Ogino S, Goel A (2008) Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 10: 13-27.
49. Samowitz W, Albertsen H, Herrick J, Levin T, Sweeney C, Murtaugh M, Wolff R, Slattery M (2005) Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 129: 837-45.
50. Curtin K, Slattery M, Samowitz W (2011) CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. *Patholog Res Int*: 902674: 1-8.
51. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman J, Baylin S, Issa J (1999) CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8681-6.
52. Toyota M, Shen L, Ohe-Toyota M, Hamilton R, Sinicrope F, Issa J (2000) Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. *Cancer Res* 60: 4044-8.
53. Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386: 623-7.
54. Duensing A, Duensing S (2005) Guilt by association? p53 and the development of aneuploidy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 331: 694-700.

55. Barber T, McManus K, Yuen K, Reis M, Parmigiani G, Shen D, Barrett I, Nouhi Y, Spencer F, Markowitz S, Velculescu V, Kinzler K, Vogelstein B, Lengauer C, Hieter P (2008) Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3443-8.
56. Rajagopalan H, Jallepalli P, Rago C, Velculescu V, Kinzler K, Vogelstein B, Lengauer C (2004) Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* 428: 77-81.
57. Burds A, Lutum A, Sorger P (2005) Generating chromosome instability through the simultaneous deletion of Mad2 and p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11296-301.
58. Thompson S, Compton D (2010) Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism. *J Cell Biol* 188: 369-81.
59. Romer L, Klein C, Dehner A, Kessler H, Buchner J (2006) p53--a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. *Angew Chem Int Ed Engl.* 45: 6440-60.
60. Markowitz S, Bertagnolli M (2009) Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 361: 2449-60.
61. Renz H (2003) Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. Pathophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie. 329.
62. Brison O (1993) Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1155: 25-41.
63. Cetinkaya C, Hultquist A, Su Y, Wu S, Bahram F, Pålman S, Guzhova I, Larsson L (2007) Combined IFN-gamma and retinoic acid treatment targets



the N-Myc/Max/Mad1 network resulting in repression of N-Myc target genes in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther* 6: 2634-41.

64. Brandes A, Franceschi E, Tosoni A, Hegi M, Stupp R (2008) Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments. *Clin Cancer Res* 14: 957-60.
65. Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P, Calvano-Forte D, Schafroth S, Simon R, Gasser T, Mihatsch M, Sauter G (2004) E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene* 23: 5616-23.
66. Sauter G, Lee J, Bartlett J, Slamon D, Press M (2009) Guidelines for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing: Biologic and Methodologic Considerations. *J Clin Oncol* 27: 1323-33.
67. Al-Kuraya K, Novotny H, Bavi P, Siraj A, Uddin S, Ezzat A, Sanea N, Al-Dayel F, Al-Mana H, Sheikh S, Mirlacher M, Tapia C, Simon R, Sauter G, Terracciano L, Tornillo L (2007) HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 60: 768-72.
68. Ballian N, Liu S, Brunicardi F (2008) Transcription factor PDX-1 in human colorectal adenocarcinoma: a potential tumor marker? *World J Gastroenterol*, 14: 5823-6.
69. Aramata S, Han S, Yasuda K, Kataoka K (2005) Synergistic activation of the insulin gene promoter by the beta-cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1. *Biochim Biophys Acta* 1730: 41-6.
70. Larsson L, Madsen O, Serup P, Jonsson J, Edlund H (1996) Pancreatic-duodenal homeobox 1 -role in gastric endocrine patterning. *Mech Dev* 60: 175-84.

71. Holland A, Hale M, Kagami H, Hammer R, MacDonald R (2002) Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12236-41.
72. Perez-Villamil B, Schwartz P, Vallejo M (1999) The pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 is expressed in neural cells during brain development. *Endocrinology* 140: 3857-60.
73. Mazur P, Grüner B, Nakhai H, Sipos B, Zimmer-Strobl U, Strobl L, Radtke F, Schmid R, Siveke J (2010) Identification of epidermal Pdx1 expression discloses different roles of Notch1 and Notch2 in murine Kras(G12D)-induced skin carcinogenesis in vivo. *PLoS One* 5 e13578: 1-12.
74. Brooke N, Garcia-Fernández J, Holland P (1998) The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* 392: 920-2.
75. Inoue H, Riggs A, Tanizawa Y, Ueda K, Kuwano A, Liu L, Donis-Keller H, Permutt M (1996) Isolation, characterization, and chromosomal mapping of the human insulin promoter factor 1 (IPF-1) gene. *Diabetes* 45: 789-94.
76. Longo A, Guanga G, Rose R (2007) Structural basis for induced fit mechanisms in DNA recognition by the Pdx1 homeodomain. *Biochemistry* 46: 2948-57.
77. Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H (1998) Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12: 1763-8.
78. Serup P, Jensen J, Andersen F, Jørgensen M, Blume N, Holst J, Madsen O (1996) Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9015-20.

79. Stoffers D, Ferrer J, Clarke W, Habener J (1997) Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17: 138-9.
80. Stoffers D, Zinkin N, Stanojevic V, Clarke W, Habener J (1997) Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 15: 106-10.
81. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371: 606-9.
82. Offield M, Jetton T, Labosky P, Ray M, Stein R, Magnuson M, Hogan B, Wright C (1996) PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122: 983-95.
83. Abate-Shen C (2002) Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nat Rev Cancer* 2: 777-85.
84. Koizumi M, Doi R, Toyoda E, Masui T, Tulachan S, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Gittes G, Imamura M (2003) Increased PDX-1 expression is associated with outcome in patients with pancreatic cancer. *Surgery* 134: 260-6.
85. Liu T, Gou S, Wang C, Wu H, Xiong J, Zhou F (2007) Pancreas duodenal homeobox-1 expression and significance in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 13: 2615-8.
86. Liu S, Ballian N, Belaguli N, Patel S, Li M, Templeton N, Gingras M, Gibbs R, Fisher W, Brunnicardi F (2008) PDX-1 acts as a potential molecular target for treatment of human pancreatic cancer. *Pancreas* 37: 210-20.
87. Liu S, Patel S, Gingras M, Nemunaitis J, Zhou G, Chen C, Li M, Fisher W, Gibbs R, Brunnicardi F (2011) PDX-1: demonstration of oncogenic properties in pancreatic cancer. *Cancer* 117: 723-33.

88. Lin X, Lindner J, Silverman J, Liu Y (2008) Intestinal type and endocervical-like ovarian mucinous neoplasms are immunophenotypically distinct entities. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 16: 453-8.
89. Mochizuka A, Uehara T, Nakamura T, Kobayashi Y, Ota H (2007) Hyperplastic polyps and sessile serrated 'adenomas' of the colon and rectum display gastric pyloric differentiation. *Histochem Cell Biol* 128: 445-55.
90. Wang X, Li Z, Magnusson J, Brunicardi F (2005) Tissue MicroArray analyses of pancreatic duodenal homeobox-1 in human cancers. *World J Surg* 29: 334-8.
91. Jonmarker S, Glaessgen A, Culp W, Pisa P, Lewensohn R, Ekman P, Valdman A, Egevad L (2008) Expression of PDX-1 in prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia and benign prostatic tissue. *APMIS* 116: 491-8.
92. Takahashi O, Hamada J, Abe M, Hata S, Asano T, Takahashi Y, Tada M, Miyamoto M, Kondo S, Moriuchi T (2007) Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 17: 753-60.
93. Leys C, Nomura S, Rudzinski E, Kaminishi M, Montgomery E, Washington M, Goldenring J (2006). Expression of Pdx-1 in human gastric metaplasia and gastric adenocarcinoma. *Hum Pathol* 37: 1162-8.
94. Sakai H, Eishi Y, Li X, Akiyama Y, Miyake S, Takizawa T, Konishi N, Tatematsu M, Koike M, Yuasa Y (2004) PDX1 homeobox protein expression in pseudopyloric glands and gastric carcinomas. *Gut* 53: 323-30.
95. Ensembl Gene Archiv Version 46, Herausgabe August 2007. URL: [http://may2009.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000139515;r=13:27283757-27448578;t=ENST00000381033](http://may2009.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000139515;r=13:27283757-27448578;t=ENST00000381033). Suchabfrage mit den Amplikongrenzen 13:27283757-27448578 am 24.09.2010.

96. Marx A, Burandt E, Choschzick M, Simon R, Yekebas E, Kaifi J, Mirlacher M, Atanackovic D, Bokemeyer C, Fiedler W, Terracciano L, Sauter G, Izbicki J (2010) Heterogenous high-level HER-2 amplification in a small subset of colorectal cancers. *Hum Pathol* 41: 1577-85.
97. Fahmüller M (2003) Epidemiologie der EGFR-Expression beim Kolon-Karzinom: Eine "Gewebe-Chip"-Untersuchung an 1417 Tumoren. Unveröffentlichte Dissertation, Universität Basel.
98. Ma J, Chen M, Wang J, Xia H, Zhu S, Liang Y, Gu Q, Qiao L, Dai Y, Zou B, Li Z, Zhang Y, Lan H, Wong B (2008) Pancreatic-duodenal homeobox 1 (PDX1) functions as a tumor suppressor in gastric cancer. *Carcinogenesis* 29:1327-33.
99. Ma J, Wang J, Zhang W, Zou B, Chen W, Lam C, Chen M, Pang R, Tan V, Hung I, Lan H, Wang Q, Wong B (2010) Promoter hypermethylation and histone hypoacetylation contribute to pancreatic-duodenal homeobox 1 silencing in gastric cancer. *Carcinogenesis* 31: 1552-60.
100. Bondi J, Husdal A, Bukholm G, Nesland J, Bakka A, Bukholm I (2005) Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome. *J Clin Pathol* 58: 509-14.
101. Forslund A, Zeng Z, Qin L, Rosenberg S, Ndubuisi M, Pincas H, Gerald W, Notterman D, Barany F, Paty P (2008) MDM2 gene amplification is correlated to tumor progression but not to the presence of SNP309 or TP53 mutational status in primary colorectal cancers. *Mol Cancer Res* 6: 205-11.
102. Sugano N, Suda T, Godai T, Tsuchida K, Shiozawa M, Sekiguchi H, Yoshihara M, Matsukuma S, Sakuma Y, Tsuchiya E, Kameda Y, Akaike M, Miyagi Y (2010) MDM2 gene amplification in colorectal cancer is associated with disease progression at the primary site, but inversely correlated with distant metastasis. *Genes Chromosomes Cancer* 49: 620-9.

103. Zeng Z, Weiser M, Kuntz E, Chen C, Khan S, Forslund A, Nash G, Gimbel M, Yamaguchi Y, Culliford A 4th, D'Alessio M, Barany F, Paty P (2008) c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer Lett* 265: 258-69.
104. Zaharieva B, Simon R, Ruiz C, Oeggerli M, Mihatsch M, Gasser T, Sauter G, Toncheva D (2005) High-throughput tissue microarray analysis of CMYC amplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer* 117: 952-6.
105. Simon R, Richter J, Wagner U, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Wilber K, Anabitarte M, Hering F, Hardmeier T, Schönenberger A, Flury R, Jäger P, Fehr J, Schraml P, Moch H, Mihatsch M, Gasser T, Sauter G (2001) High-throughput tissue microarray analysis of 3p25 (RAF1) and 8p12 (FGFR1) copy number alterations in urinary bladder cancer. *Cancer Res* 61: 4514-9.
106. Simon R, Struckmann K, Schraml P, Wagner U, Forster T, Moch H, Fijan A, Bruderer J, Wilber K, Mihatsch M, Gasser T, Sauter G (2002) Amplification pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer. *Oncogene* 21: 2476-83.
107. Ramieri M, Murari R, Botti C, Pica E, Zotti G, Alo P (2010) Detection of HER2 amplification using the SISH technique in breast, colon, prostate, lung and ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 30: 1287-92.
108. Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zaharieva B, Novotny H, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Köchli O, Zuber M, Dieterich H, Mross F, Wilber K, Simon R, Sauter G (2004) Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res* 64: 8534-40.
109. Vogelstein B, Lane D, Levine A (2000) Surfing the p53 network. *Nature*. 408: 307-10.

110. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B (1994) Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* 57: 1-9.
111. Levine A (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-31.
112. Oren M, Maltzman W, Levine A (1981) Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* 1: 101-10.
113. Maltzman W, Czyzyk L (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 4: 1689-94.
114. Tawfik K, Kimler B, Davis M, Fan F, Tawfik O (2012) Prognostic significance of Bcl-2 in invasive mammary carcinomas: a comparative clinicopathologic study between "triple-negative" and non-"triple-negative" tumors. *Hum Pathol* 43: 23-30.
115. Callagy G, Webber M, Pharoah P, Caldas C (2008) Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer* 8, 153: 1-10.
116. Dawson S, Makretsov N, Blows F, Driver K, Provenzano E, Le Quesne J, Baglietto L, Severi G, Giles G, McLean C, Callagy G, Green A, Ellis I, Gelmon K, Turashvili G, Leung S, Aparicio S, Huntsman D, Caldas C, Pharoah P (2010) BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer* 103: 668-75.
117. Ofner D, Riehemann K, Maier H, Riedmann B, Nehoda H, Tötsch M, Böcker W, Jasani B, Schmid K (1995) Immunohistochemically detectable bcl-2 expression in colorectal carcinoma: correlation with tumour stage and patient survival. *Br J Cancer* 72: 981-5.

118. Buglioni S, D'Agnano I, Cosimelli M, Vasselli S, D'Angelo C, Tedesco M, Zupi G, Mottolese M (1999). Evaluation of multiple bio-pathological factors in colorectal adenocarcinomas: independent prognostic role of p53 and bcl-2. *Int J Cancer* 84: 545-52.
119. Manne U, Weiss H, Grizzle W (2000) Bcl-2 expression is associated with improved prognosis in patients with distal colorectal adenocarcinomas. *Int J Cancer* 89: 423-30.
120. Poincloux L, Durando X, Seitz J, Thivat E, Bardou V, Giovannini M, Parriaux D, Barriere N, Giovannini M, Delpero J, Monges G (2009) Loss of Bcl-2 expression in colon cancer: a prognostic factor for recurrence in stage II colon cancer. *Surg Oncol* 18: 357-65.
121. Chu I, Hengst L, Slingerland J (2008) The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 8: 253-67.
122. Li M, Li J, Zhao A, He J, Zhou L, Li Y, Gu J (2007) Survival stratification panel of colorectal carcinoma with combined expression of carcinoembryonic antigen, matrix metalloproteinases-2, and p27 kip1. *Dis Colon Rectum* 50: 1887-98.
123. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, De Vita F, Castellano P, Imperatore V, Romano C, Ciardiello F, Agostini B, Pignatelli C (2004) Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas. *Clin Cancer Res* 10: 3490-9.
124. Belluco C, Esposito G, Bertorelle R, Del Mistro A, Fassina A, Vieceli G, Chieco-Bianchi L, Nitti D, Lise M (1999) Absence of the cell cycle inhibitor p27Kip1 protein predicts poor outcome in patients with stage I-III colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 6: 19-25.
125. Albertson D (2006) Gene amplification in cancer. *Trends Genet* 22: 447-55.



126. Fridlyand J, Snijders A, Ylstra B, Li H, Olshen A, Seagraves R, Dairkee S, Tokuyasu T, Ljung B, Jain A, McLennan J, Ziegler J, Chin K, Devries S, Feiler H, Gray J, Waldman F, Pinkel D, Albertson D (2006) Breast tumor copy number aberration phenotypes and genomic instability. *BMC Cancer* 6, 96: 1-13.
127. Choschzick M, Lassen P, Lebeau A, Marx A, Terracciano L, Heilenkötter U, Jaenicke F, Bokemeyer C, Izbicki J, Sauter G, Simon R (2010) Amplification of 8q21 in breast cancer is independent of MYC and associated with poor patient outcome. *Mod Pathol* 23: 603-10.
128. Melchor L, Alvarez S, Honrado E, Palacios J, Barroso A, Díez O, Osorio A, Benítez J (2005) The accumulation of specific amplifications characterizes two different genomic pathways of evolution of familial breast tumors. *Clin Cancer Res* 11: 8577-84.
129. ATCC Website URL: [www.atcc.org](http://www.atcc.org) unter Rubrik ‚Cell Lines and Hybridomas‘. Suchabfrage mit BT-474 am 24.09.2010.
130. Stoffel M, Stein R, Wright C, Espinosa R 3rd, Le Beau M, Bell G (1995) Localization of human homeodomain transcription factor insulin promoter factor 1 (IPF1) to chromosome band 13q12.1. *Genomics* 28: 125-6.
131. Hughes S, Williams R, Webb E, Houlston R (2006) Meta-analysis and pooled re-analysis of copy number changes in colorectal cancer detected by comparative genomic hybridization. *Anticancer Res* 26: 3439-44.
132. Sheffer M, Bacolod M, Zuk O, Giardina S, Pincas H, Barany F, Paty P, Gerald W, Notterman D, Domany E (2009) Association of survival and disease progression with chromosomal instability: a genomic exploration of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 7131-6.

133. Platzer P, Upender M, Wilson K, Willis J, Lutterbaugh J, Nosrati A, Willson J, Mack D, Ried T, Markowitz S (2002) Silence of chromosomal amplifications in colon cancer. *Cancer Res* 62: 1134-8.
134. Dunham A, Matthews L, Burton J, Ashurst J, Howe K, Ashcroft K, Beare D, Burford D, Hunt S, Griffiths-Jones S, Jones M, Keenan S, Oliver K, Scott C, Ainscough, Almeida J, Ambrose K, Andrews D, Ashwell R, Babbage A, Bagguley C, Bailey J, Bannerjee R, Barlow K, Bates K, Beasley H, Bird C, Bray-Allen S, Brown A, Brown J, Burrill W, Carder C, Carter N, Chapman J, Clamp M, Clark S, Clarke G, Clee C, Clegg S, Cobley V, Collins J, Corby N, Coville G, Deloukas P, Dhami P, Dunham I, Dunn M, Earthrowl M, Ellington A, Faulkner L, Frankish A, Frankland J, French L, Garner P, Garnett J, Gilbert J, Gilson C, Ghorji J, Grafham D, Gribble S, Griffiths C, Hall R, Hammond S, Harley J, Hart E, Heath P, Howden P, Huckle E, Hunt P, Hunt A, Johnson C, Johnson D, Kay M, Kimberley A, King A, Laird G, Langford C, Lawlor S, Leongamornlert D, Lloyd D, Lloyd C, Loveland J, Lovell J, Martin S, Mashreghi-Mohammadi M, McLaren S, McMurray A, Milne S, Moore M, Nickerson T, Palmer S, Pearce A, Peck A, Pelan S, Phillimore B, Porter K, Rice C, Searle S, Sehra H, Shownkeen R, Skuce C, Smith M, Steward C, Sycamore N, Tester J, Thomas D, Tracey A, Tromans A, Tubby B, Wall M, Wallis J, West A, Whitehead S, Willey D, Wilming L, Wray P, Wright M, Young L, Coulson A, Durbin R, Hubbard T, Sulston J, Beck S, Bentley D, Rogers J, Ross M (2004) The DNA sequence and analysis of human chromosome 13. *Nature* 428: 522-8.
135. Ensembl Gene Archiv Version 46, Herausgabe August 2007. URL: [http://aug2007.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/geneview?gene=ENSG00000139515](http://aug2007.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000139515). Suchabfrage mit PDX1 am 19.05.2012.
136. Source Search zur Verfügung gestellt von dem Institut für Genetik der Stanford Universität, Stanford/ USA. URL: <http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>. Suchabfrage mit ATP5EP2 am 19.05.2012.

137. Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15: 2922-33.
138. Yoshida M, Muneyuki E, Hisabori T (2001) ATP synthase- a marvellous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 669-77.
139. Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa E, Alonso A, Cejas P, Hardisson D, Fresno Vara J, Belda-Iniesta C, González-Barón M, Cuezva J (2005) Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26: 2095-104.
140. Isidoro A, Martínez M, Fernández P, Ortega A, Santamaría G, Chamorro M, Reed J, Cuezva J (2004) Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 378: 17-20.
141. Bacolod M, Barany F (2010) Gene dysregulations driven by somatic copy number aberrations-biological and clinical implications in colon tumors: a paper from the 2009 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 12: 552-61.
142. Cuezva J, Krajewska M, de Heredia M, Krajewski S, Santamaría G, Kim H, Zapata J, Marusawa H, Chamorro M, Reed J (2002) The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62: 6674-81.
143. Beck F (2002) Homeobox genes in gut development. *Gut* 51: 450-4.
144. James R, Erler T, Kazenwadel J (1994) Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J Biol Chem* 269: 15229-37.
145. Ee H, Erler T, Bhathal P, Young G, James R (1995) Cdx-2 homeodomain protein expression in human and rat colorectal adenoma and carcinoma. *Am J Pathol* 147: 586-92.

146. Hinoi T, Tani M, Lucas P, Caca K, Dunn R, Macri E, Loda M, Appelman H, Cho K, Fearon E (2001) Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol* 159: 2239-48.
147. Mallo G, Rechreche H, Frigerio J, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M, Jordan B, Dusetti N, Dagorn J, Iovanna J (1997) Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human Cdx1 and Cdx2 homeobox. Down-regulation of Cdx1 and Cdx2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer* 74: 35-44.
148. Aoki K, Kakizaki F, Sakashita H, Manabe T, Aoki M, Taketo M (2011) Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27Kip1. *Cancer Res* 71: 593-602.
149. Zheng J, Sun X, Qi J, Li S, Wang W, Ren H, Tian Y, Lu S, Du J (2011) Effects of homeodomain protein CDX2 expression on the proliferation and migration of lovo colon cancer cells. *Pathol Oncol Res* 17: 743-51.
150. Bonhomme C, Duluc I, Martin E, Chawengsaksophak K, Chenard M, Kedinger M, Beck F, Freund J, Domon-Dell C (2003) The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* 52: 1465-71.
151. Mallo G, Soubeyran P, Lissitzky J, André F, Farnarier C, Marvaldi J, Dagorn J, Iovanna J (1998) Expression of the Cdx1 and Cdx2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells. *J Biol Chem* 273: 14030-6.
152. Subtil C, Guérin E, Schneider A, Chenard M, Martin E, Domon-Dell C, Duluc I, Brabletz T, Kedinger M, Duclos B, Gaub M, Freund J (2007) Frequent rearrangements and amplification of the CDX2 homeobox gene in human sporadic colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Lett* 247: 197-203.

## **8. Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Guido Sauter für die Übernahme des Erstgutachtens und für die Möglichkeit, an seinem Institut arbeiten zu dürfen.

Ich danke besonders dem Betreuer meiner Arbeit Herrn PD Dr. rer. nat. Ronald Simon für die Überlassung des Themas und seine große Unterstützung bei der Verfassung der Dissertationsschrift.

Vielen Dank an Pierre Temstedt für den Einsatz bei der statistischen Auswertung und an Frederick Holst und Antje Krohn für die Einführung in die Methodik.

Den Mitarbeitern des Labors an der Frickestraße möchte ich für ihre freundliche Hilfe danken.

Meinem Freund und meiner Familie bin ich dankbar für ihre Liebe und Unterstützung.

## 9. Anhang

Tabelle 8: Detaillierte Auflistung der Zelllinien vom Zelllinien-TMA (s. S. 22).

Array Koordinate	Zelllinie	ATCC-Nr.*	DSMZ-Nr. **	Herkunftsgewebe
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)
1o	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 (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

Array Koordinate	Zelllinie	ATCC-Nr. *	DSMZ-Nr. **	Herkunftsgewebe
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
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

Array Koordinate	Zelllinie	ATCC-Nr. *	DSMZ-Nr. **	Herkunftsgewebe
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		Pankreas; 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-HER2			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
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, Dukes' 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



Array Koordinate	Zelllinie	ATCC-Nr. *	DSMZ-Nr. **	Herkunftsgewebe
				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
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](http://www.ATCC.org)) \*\* DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de))

## **10. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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: .....