

Aus der Klinik für Chirurgie der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch

**Multiproteomanalysen des sporadischen kolorektalen Karzinoms
und der Vergleich mit der familiären adenomatösen Polyposis**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

Aus der Medizinischen Fakultät

Vorgelegt von

Andreas Christoph Unger

aus Bensheim

Lübeck, im Dezember 2007

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Conny Bürk

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Nils Homann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.08.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der medizinischen Fakultät -

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit beschriebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

“...a complete description of the DNA sequence of any organism no more enables us to reconstruct the organism than a list of English words enables us to reconstruct a play by Shakespeare. The problem is to know how the words - in our case the genes- on the list are used. Under what conditions is each gene product (=protein) made, and, once made, what does it effect?...”

Tim Hunt
Nobel Laureate
In Physiology and Medicine 2001

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	11
1.1 Benigne adenomatöse Veränderungen des Kolorektums	11
1.2. Das sporadische kolorektale Karzinom (sKRK)	13
1.2.1 Epidemiologie des sKRK	13
1.2.2 Ätiologie des sKRK	14
1.2.3. Das Vogelstein Model - Prinzipien der Adenom-Karzinom-Sequenz	15
1.2.4. Klinische Charakteristika des sKRK	17
1.2.5. Screeninguntersuchungen beim sKRK	19
1.3. Hereditäre Tumorsyndrome des Kolons und Rektums	20
1.4. Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP)	20
1.4.1. Epidemiologie und Pathogenese	20
1.4.2. Genetik	21
1.4.3. Klinische Charakteristika der FAP	22
1.4.3.1. Kolische Manifestationsform	22
1.4.3.2. Extrakolische Manifestationsform	24
1.4.3.3. Unterschiedliche Verlaufsformen der FAP	26
1.4.4. Therapie der FAP	26
1.4.5. Familienberatung	27
1.4.6. Vorsorgeprogramm FAP betroffener Familien	27
1.5. Proteomics - neuer Ansatz zur Proteomerforschung	28
1.5.1. Das Humangenom-Projekt	28
1.5.2. Definition des Proteoms	29
2. Ziel der Arbeit	31

3.	Material und Methoden	32
3.1.	Präparation und Asservierung der Proben	32
3.1.1.	Franzén-Technik („Cell enrichment“)	32
3.2.	Zweidimensionale Gelelektrophorese	34
3.2.1.	Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension) mit IPG Strips	35
3.2.2.	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (2.Dimension)	36
3.3.	Computergestützte Bildanalyse	38
3.3.1.	Detektion der Proteinspots im Gel	38
3.3.2.	Matchset	39
3.3.3.	Analyse des Matchsets	41
3.3.4.	Statistische Analyse	42
3.4.	Massenspektrometrische Identifikation	44
4.	Ergebnisse	47
4.1.	Histologie	47
4.2.	Proteinexpression in der Genese und Progression des sporadischen kolorektalen Karzinoms	47
4.2.1.	Test der Probenheterogenität bei sporadischen Tumoren und Metastasen	48
4.2.2.	Principle Component Analyse (PCA)	49
4.2.3.	Identifikation dysregulierter Proteine im Vergleich von Mukosa und Polyp versus Karzinom und Metastase	51
4.3.	Vergleich der Proteinexpression des sKRK zur FAP	54
4.3.1.	Unterschiede innerhalb der verschiedenen Stadien der FAP und des sporadischen Karzinoms	55
4.3.1.1.	Quantitative Unterschiede im Vergleich zwischen normaler Schleimhaut der FAP und dem sporadischen Karzinom	56
4.3.2.	Qualitative Unterschiede zwischen der FAP und dem sporadischen Karzinom	57
4.3.2.1.	Normale Schleimhaut	57
4.3.2.2.	Polypen	59

4.3.2.3.	Karzinom	62
5.	Diskussion	65
5.1.	Das sporadische kolorektale Karzinom (sKRK)	66
5.1.1.	Intra- und interindividueller Vergleich	67
5.1.2.	Massenspektrometrische Identifikation potentieller Markerproteine zur Differenzierung „normal versus disease“	68
5.2.	Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP)	69
5.2.1.	Vergleich der Expressionsmuster von sporadischem (sKRK) und hereditärem (FAP) Gewebe	70
5.3.	Ausblick: Die Rolle von Proteomics in der Zukunft	72
6.	Zusammenfassung	74
7.	Literaturverzeichnis	76
8.	Anhang	91
9.	Danksagung	92
10.	Veröffentlichungen	93
11.	Lebenslauf	94

Abbildungsverzeichnis:

		Seite
Abbildung	1: Histologie des Dickdarmadenoms	11
Abbildung	2: Fearon und Vogelstein Modell	16
Abbildung	3: Entwicklung des sKRK aus einer Kolonkrypte	16
Abbildung	4: Häufigkeit des sKRK und der hereditären KRK	20
Abbildung	5: 27-jähriger Patient mit „de novo“ FAP	21
Abbildung	6: Rektum einer 21-jährigen Patientin mit FAP	23
Abbildung	7: Patient mit intraabdominellem Desmoid Tumor	25
Abbildung	8: Probengewinnung von einem Resektat	32
Abbildung	9: Franzén-Technik zur Gewinnung reiner Zellpellets	33
Abbildung	10: Zellgewinnung zur 2-DE Analyse	34
Abbildung	11: Schematische Darstellung der 1. Dimension	35
Abbildung	12: Schematische Darstellung der 2. Dimension	36
Abbildung	13: Gel eines Kolonkarzinoms mit markierten Proteinspots	37
Abbildung	14: Schematische Darstellung eines Matchsets	39
Abbildung	15: Matchset Kolon – Screenshot von PDQuest 7.3	40
Abbildung	16: Statistisches Analyseset PDQuest	42
Abbildung	17: Gyrolab MALDI SP1 Workstation	45
Abbildung	18: Aufbau einer MALDI-TOF Massenspektrometrieinheit	46
Abbildung	19: Vergleich zweier Proben in einem Karzinom	49
Abbildung	20: PCA Plot des ungefilterten Matchset-Datensatzes	50
Abbildung	21: Identifikation von 72 dysregulierten Proteinen	51
Abbildung	22: Massenspektrometrische Identifikation von Spot 32	53
Abbildung	23: 2-DE Gel mit identifizierten Proteinspots	53
Abbildung	24: Unterschiede zwischen der FAP-Mukosa und sporadischen Mukosa	56
Abbildung	25: Heatmap sporadische Mukosa und FAP Mukosa	57
Abbildung	26: Boxplot-Darstellung exklusiver FAP Proteine auf Mukosaebene	59
Abbildung	27: Heatmap sporadische Polypen und FAP Polypen	60
Abbildung	28: Boxplot-Darstellung exklusiver FAP Proteine auf Polypenebene	61
Abbildung	29: Venn-Diagramm zur Darstellung überlappenden Proteine	64

Tabellenverzeichnis:

	Seite
Tabelle 1: Selbsterkrankungsrisiko Angehöriger von Patienten mit Kolonkarzinom	14
Tabelle 2: Klinische Symptome des sKRK in Prozent	18
Tabelle 3: Klinische Daten der Patienten mit sKRK	48
Tabelle 4: Daten der identifizierten Proteinspots beim sKRK	52
Tabelle 5: Klinische Daten Vergleich sKRK und FAP	55
Tabelle 6: Exklusive Proteine in der Normalmukosa der FAP	58
Tabelle 7: Exklusive Proteine Vergleich sKRK vs. FAP auf Polypenebene	61
Tabelle 8: Exklusive Proteine Vergleich sKRK vs. FAP auf Karzinomebene	63

Abkürzungsverzeichnis:

FAP:	Familiäre Adenomatöse Polyposis
HNPCC:	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
sKRK:	sporadisches Kolorektales Karzinom
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
APC:	Adenomatosis Polyposis Coli
UICC:	Union internationale contre le cancer
CEA:	Carcinoembryonale Antigen
FOBT:	Fäkaler Okkultter Bluttest
HFAS:	Hereditary Flat Adenoma Syndrome
AAPC:	Attenuated Adenomatous Polyposis Coli
NSAID:	Non-steroidal Anti-inflammatory Drug
RNA:	Ribonukleinsäure
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PAGE:	Polyacrylamid Gelelektrophorese
pI:	Isoelektrischer Punkt
IEF:	Isoelektrische Fokussierung
SDS:	Sodium-dodecylsulfat
FDR:	False Discovery Rate
PCA:	Principal Component Analysis
MALDI:	Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation
WHO:	World Health Organisation
HSP:	Heat Shock Proteine

1. Einleitung

1.1 Benigne adenomatöse Veränderungen des Kolorektums

Adenome können prinzipiell im gesamten Gastrointestinaltrakt vorkommen. Ihre häufigste Lokalisation ist das Kolorektum. Grundsätzlich unterscheidet man epitheliale Polypen (sporadisch/hereditär z.B. bei HNPCC, FAP) von hamartösen Polypen (Peutz-Jeghers, Juvenile Polyposis).

Bei den epithelialen Polypen wird zwischen Adenomen und hyperplastischen Polypen, sowie deren Mischform, den „serrated adenomas“ unterschieden.

Adenome werden makroskopisch in tubuläre, tubulovillöse und villöse Formen unterteilt. Von tubulär wird gesprochen, wenn der Anteil papillärer Komplexe unter 20% liegt. Als tubulovillös werden die Strukturen bezeichnet, wenn dieser Anteil zwischen 20 und 80% liegt. Das rein villöse Adenom besteht in über 80% aus derartigen papillären Komplexen^{1,2}. Typisch für Adenome sind mehr oder weniger stark ausgeprägte Zellatypien und eine Änderung der Zytoarchitektur ohne tumortypisches infiltratives Wachstum.

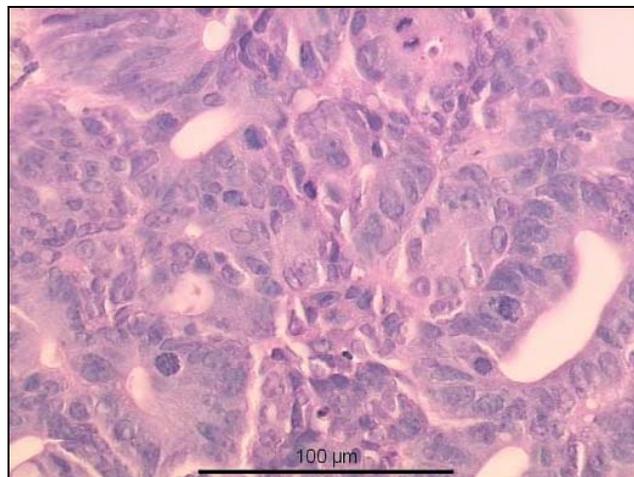


Abb.1: Histologie eines Dickdarmadenoms mit schweren Epitheldysplasien (H&E)

Mikroskopisch sind Adenome umschriebene epitheliale Neoplasien (Abb.1). Sie sind neoplastische Veränderungen, die durch Ausreifungsstörungen, zelluläre Atypien und Architekturstörungen gekennzeichnet sind. In Abhängigkeit vom Ausprägungsgrad dieser Veränderungen wird zwischen geringgradiger und hochgradiger Neoplasie unterschieden. Bei den geringgradigen Neoplasien finden

sich dicht an dicht stehende, hohe, längliche Zellen mit prominenten stäbchenförmigen Kernen. Die Kerne sind parallel angeordnet mit vermehrt nachweisbaren Mitosen. Hochgradige Neoplasien sind architektonisch komplexer. Die zytologischen Atypien sind ausgeprägter und mit einem Polaritätsverlust der Kerne verbunden³.

Hyperplastische Polypen sind klein, meist unter 0,5cm. Es sind Läsionen, die farblich häufig heller als die umgebende Schleimhaut imponieren. Histologisch charakteristisch sind die verlängerten, sägeblattartig-papillär gefalteten Krypten mit kleinen basalständigen Kernen ohne zytologische Atypien. Die Becherzellen sind häufig vergrößert. In Untersuchungen lässt sich eine verlängerte Proliferationszone, die über die mittleren Kryptenabschnitte hinaus bis zur Kryptenöffnung reicht, nachweisen. Die Zellreifung zeigt einen geordneten, aber verzögerten Ablauf.

Sie stellen im Gegensatz zu Adenomen keine Präkanzerose dar. Molekularbiologische Untersuchungsergebnisse zeigen jedoch, dass klonale genetische Veränderungen vorliegen können und phänotypisch eine milde Form der Mikrosatelliteninstabilität in hyperplastischen Polypen nachweisbar sind⁴.

„*Serrated adenomas*“ wurden erstmals 1990 beschrieben⁵. Sie sind eine Sonderform der gemischt adenomatös hyperplastischen Polypen. Charakteristisch sind die für hyperplastische Polypen typische Kryptenarchitektur sowie die für Adenome typischen zytologischen Merkmale der Dysplasie. Diese können nebeneinander innerhalb derselben Krypte vorliegen.

Im Hinblick auf ihre Histogenese wird angenommen, dass die „*serrated adenomas*“ von differenzierteren Zellen innerhalb der Krypten ausgehen als die klassischen Adenome. „*Serrated adenomas*“ gelten als Vorstufe für Neoplasien und sind somit als Präkanzerose zu definieren. Ihr Entartungspotential entspricht dem der Adenome^{6,7}.

Hamartöse Polypen, wie sie beim Peutz-Jeghers-Syndrom vorkommen, sind makroskopisch den epithelialen Polypen ähnlich. Histologisch sind hamartöse Polypen durch die simultane Proliferation von glatten Muskelfasern und Epithel gekennzeichnet. Ihr Wachstumsmuster zeigt eine baumartige Verzweigung. Die Krypten und Villi der Darmschleimhaut wirken dabei unterschiedlich lang. Hamartöse Polypen können dysplastische Veränderungen entwickeln, die denen der Adenome häufig ähnlich sehen. Eine maligne Transformation zum Karzinom

ist somit möglich. Die Häufigkeit der malignen Entartung ist im Vergleich zu der des Adenoms jedoch gering.

Juvenile Polypen treten gehäuft im Dickdarm auf. Ihre Größe variiert zwischen 0,5 und 5cm. Makroskopisch sind sie in der Regel rundlich mit einem rötlich grauen Mukosaüberzug. Histologisch fallen sie durch ein prominentes Stroma sowie durch mit Schleim gefüllte Zysten auf. An der Oberfläche der Polypen zeigen sich erosive Epitheldefekte, die Krypten wirken dilatiert. Im Gegensatz zu den Peutz-Jeghers Polypen findet man histologisch nur vereinzelt glatte Muskelzellen⁸. Auch juvenile Polypen können sich über Jahre dysplastisch transformieren und zum invasiven Karzinom entwickeln.

1.2. Das sporadische kolorektale Karzinom (sKRK)

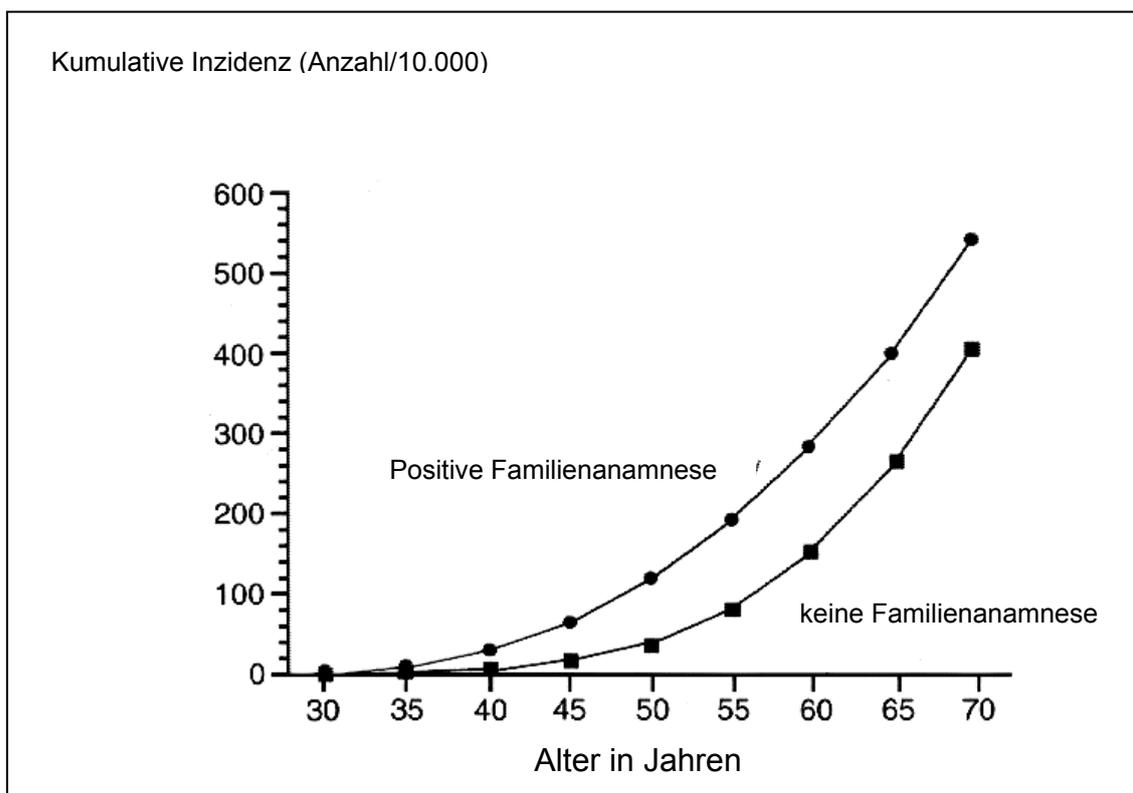
Bei den malignen kolorektalen Tumoren handelt es sich in etwa 90% um Adenokarzinome, die sich aus gutartigen Adenomen entwickeln. Dem Adenokarzinom des Dickdarmes kommt eine besondere Bedeutung zu, da es sich um den häufigsten Tumor des Gastrointestinaltraktes handelt. Diese Entität hat bei rechtzeitiger Diagnosestellung und Behandlung eine günstige Prognose. Seltener Entitäten wie das Plattenepithelkarzinom des Analkanals, das Leiomyosarkom, maligne Karzinoide und maligne Melanome stellen prognostisch ungünstigere Tumoren dar und müssen vom Adenokarzinom abgegrenzt werden.

1.2.1. Epidemiologie des sKRK

In den Industrieländern ist das sKRK die dritthäufigste malignomrelatierte Todesursache. Etwa 945.000 Neuerkrankungen werden jährlich weltweit vermutet⁹. Dies entspricht etwa 9,4% aller neu auftretenden Karzinome¹⁰. Das sKRK ist mit etwa 85.000 Neuerkrankungen pro Jahr eines der häufigsten Karzinome in der Bundesrepublik Deutschland. In den USA liegt das „Lifetime“ Risiko, an einem sKRK zu erkranken, bei 6%¹¹. Die Inzidenz des sKRK ist in den westlichen Industrieländern größer. Die Inzidenzrate war 31 von 100.000 im Jahre 1995, während sie 1985 noch bei 38 von 100.000 lag. Begründet wird dieser Rückgang mit einer intensivierten Vorsorge sowie dem konsequenten Abtragen nachgewiesener Polypen^{12, 13}. Die geographischen Unterschiede bezüglich der

Häufigkeit des Auftretens scheinen durch unterschiedliches Essverhalten und Umwelteinflüsse begründet. Japaner, die in die USA immigriert sind, haben aufgrund dieser Einflüsse ein erhöhtes Risiko, an einem sKRK zu erkranken ¹⁴.

Es existiert eine Korrelation zwischen der Anzahl sKRK erkrankter Familienangehöriger und dem Karzinomrisiko der Einzelperson. Für Verwandte ersten Grades ist das Risiko zwei- bis dreifach erhöht. Ebenfalls spielt das Alter bei Erstdiagnose eine Rolle. Es besteht eine 3- bis 4-fache Risikosteigerung, wenn bei dem Indexpatienten das sKRK vor dem 45. Lebensjahr aufgetreten ist und mehr als ein Verwandter ersten Grades von einem sKRK betroffen ist ^{15- 23}.



Tab.1: Selbsterkrankungsrisiko Angehöriger von Patienten mit Kolonkarzinom mit positiver und negativer Familienanamnese bezogen auf Erkrankungsrate pro 10.000 ¹⁶.

1.2.2. Ätiologie des sKRK

Die ätiologischen Faktoren und pathogenetischen Mechanismen zur Entstehung des sKRK sind komplex und heterogen. Das sKRK entsteht in der Mukosa, in der Regel aus dem Epithel eines Adenoms oder einer Schleimhautkrypte. In etwa 80%

handelt es sich um Adenokarzinome, in 10% um schleimbildende Karzinome und in weiteren 10% um undifferenzierte Karzinome.

Fäkale Karzinogene, Verzehr von rotem gebratenem Fleisch (Rind, Schwein, Lamm), Gallensäuren und der fäkale pH Wert scheinen Einfluss auf die Entstehung eines sKRK zu nehmen. Die karzinogene Wirkung von Fett und cholesterinreicher Ernährung beruht auf einer erhöhten Produktion und hepatischer Ausscheidung von Gallensäuren und Cholesterin sowie dem Abbau durch Darmbakterien mit entsprechender Konzentrationssteigerung von toxischen Gallensäuren. Zusammen mit verstärkt synthetisierten Triglyzeriden und fäkalen Pentanen ist somit ein großes Angebot an Karzinogenen vorhanden. Desweiteren sind Alkohol, Übergewicht und insbesondere ein hohes Lebensalter als Risikofaktoren zu benennen. Im Gegensatz hierzu scheinen ausgewogene Ernährung mit Verzehr von reichlich Obst und Gemüse sowie hohe körperliche Aktivität einen protektiven Effekt zu haben. Lösliche Ballaststoffe induzieren im Darm infolge fermentativen Abbaus durch anaerobe Darmbakterien eine gesteigerte Synthese von kurzkettigen Fettsäuren und Butyraten, denen ein protektiver Effekt im Rahmen der Karzinogenese durch Inhibierung von Zellteilung, Förderung von Zelldifferenzierung sowie Induktion von Apoptose zugeschrieben wird. Entscheidend bei der Entstehung des sKRK sind jedoch genetische Veränderungen in den Epithelzellen der Kolonmukosa, die jedoch letztlich Konsequenzen o.g. Risikofaktoren darstellen.

1.2.3. Das Vogelstein Model - Prinzipien der Adenom-Karzinom-Sequenz

Maligne Tumoren sind in der Regel klonalen Ursprungs. Eine Zelle erwirbt z. B. durch Mutation einen geringfügigen Wachstumsvorteil. Nach Expansion dieses bevorteilten Zellklons können Tochterzellen weitere Mutationen aquirieren, die zusätzliche Wachstumsvorteile verleihen. Nach weiteren Teilungszyklen kann sich schließlich ein maligner Tumor entwickeln.

Dieses Modell der Tumorentstehung setzt voraus, dass sich durch eine Reihe genetischer Aberrationen in einer einzelnen Zelle ein maligner Tumor entwickelt. Ein Modell der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms wurde von Fearon und Vogelstein erstmalig 1990 propagiert ²⁴ (Abb.2).

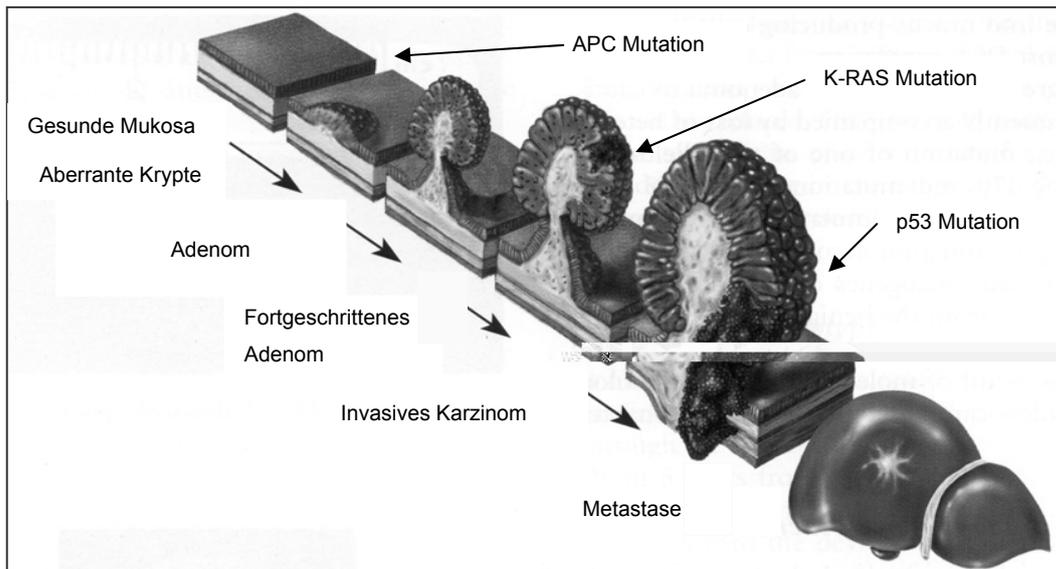


Abb.2: Fearon und Vogelstein Modell der Kolonkarzinogenese

Bis zur Ausbildung eines KRK lassen sich nach klinischen und histologischen Gesichtspunkten verschiedene Stadien abgrenzen. Man nimmt an, dass Herde dysplastischer Zellen in aberranten Krypten das erste morphologisch erkennbare Stadium darstellen (Abb.3).

Die initiale proliferative Abnormalität geht über in eine progressive Proliferation. Es kommt konsekutiv zur Ausbildung eines Adenoms. Am Ende dieser Entwicklung steht das invasive kolorektale Karzinom. Das von Fearon und Vogelstein vorgeschlagene Modell ordnet den verschiedenen Stadien der kolorektalen Karzinogenese definierte genetische Veränderungen zu (Abb.2).

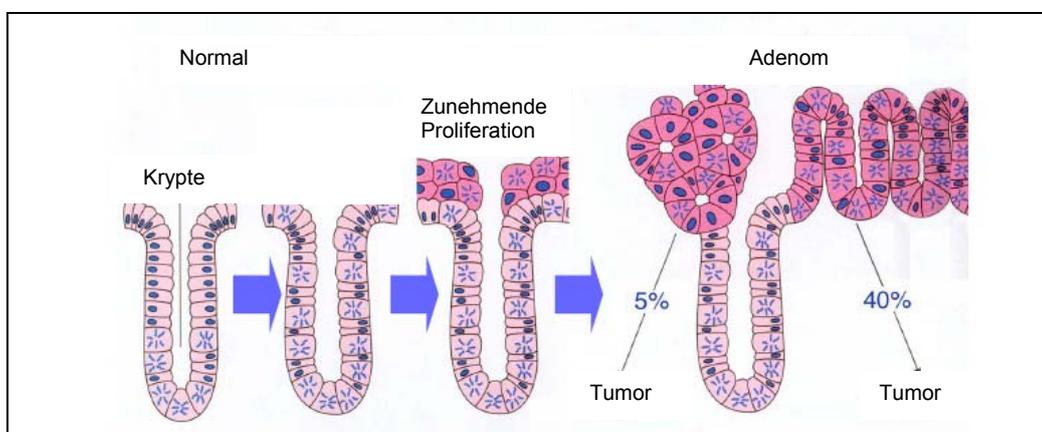


Abb.3: Entwicklung des sKRK aus einer abnormen Kolonkrypte

Nach diesem Modell sind Mutationen des APC-Gens der erste Schritt der Karzinogenese. Mutationen des K-RAS Gens folgen im Adenomstadium. Es existieren drei unterschiedliche RAS Gene. Sie werden nach ihren entsprechenden retroviralen Onkogenen bezeichnet (H-RAS, K-RAS, N-RAS). Am häufigsten mutiert das K-RAS Gen. Das K-RAS Gen besitzt vier Exons, wobei das vierte Exon zwei Alternativen aufweist. Daher kommen auch zwei Produkte des K-RAS Gens vor. Bei den Mutationen handelt es sich ausschliesslich um Punktmutationen, die das Kodon 12, 13 und 61 betreffen. Die Mutationen von RAS-Genen in sKRK haben ihre Bedeutung in der Entwicklung von kleinen zu größeren Polypen.

Das Phosphoprotein p53 ist ein zelluläres Bindungsprotein des SV40 Tumovirus. Das p53 Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 17 lokalisiert. Dieses Chromosom beinhaltet den tetrameren Transkriptionsfaktor und potenten Tumorsuppressor p53. Die Funktionen des p53 Genproduktes sind vielfältig und bestehen u.a. in der Reparatur von DNA-Schäden, der Initiierung der Apoptose und der Zellzyklus Kontrolle. Es wird daher auch als „the guardian of the genome“ bezeichnet. Die Deletion eines Allels reicht aus, um seine Funktion aufzuheben. Sie ist in 75% aller sKRK detektierbar²⁴. Das p53

Gen wird beim Übergang vom späten Adenom zum Karzinom verändert. Dies bedeutet, dass p53 Mutationen bereits im frühesten Karzinomstadium, dem Carcinoma in situ, zu detektieren sind.

Nach bisherigen Daten liegt die Häufigkeit von APC-Mutationen in sKRK bei etwa 70-80%. K-RAS-Mutationen finden sich in etwa einem Drittel der sKRK und eine Mutation des p53 Gens wird in etwa 55% der Tumoren beschrieben^{25, 26}.

Es ist davon auszugehen, dass für die Entstehung eines invasiv wachsenden sKRK mindestens drei solcher mutagener Ereignisse erforderlich sind²⁷⁻³⁵. Weitere bislang nicht identifizierte Gene scheinen an der Karzinogenese des sKRK beteiligt zu sein.

1.2.4. Klinische Charakteristika des sKRK

Klinisch präsentiert sich das KRK durch abdominelle Schmerzen, Veränderungen der Stuhlgewohnheiten, rektale Blutungen, sowie bei Fortschreiten der Erkrankung durch das Bild eines Ileus (Tab.2).

Symptome des sKRK	
Abdomineller Schmerz	40
Stuhlnregelmäßigkeiten	35
Okkulte Blutung	35
Rektale Blutung	27
Malaise	18
Ileus	15

Tab.2: *Klinische Symptome des sKRK (Häufigkeit in %)*

Häufig treten Symptome erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung auf. Etwa 40% werden erst im Stadium UICC IV entdeckt ³⁶. Behrs und Sanfelippo beschreiben eine niedrigere 5-Jahres Überlebensrate symptomatischer Patienten verglichen mit asymptomatischen Patienten (49% versus 71%) ³⁷. Sie vermuten, dass symptomatische Patienten bereits ein fortgeschritteneres Stadium erreicht haben und hieraus eine ungünstigere Prognose resultiert. Copeland et al. vergleichen in Ihrer Studie die Korrelation der Dauer der Symptome an 1084 Patienten. Patienten, deren Symptome länger als 6 Monate andauerten, hatten eine schlechtere 5-Jahres Überlebensrate. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass Patienten, bei denen ein sKRK vor dem Auftreten von Symptomen diagnostiziert wird, eine insgesamt bessere Prognose haben ³⁸.

Das sKRK ist in erster Linie eine Erkrankung des älteren Menschen. Der Manifestationsgipfel liegt im 6. und 7. Lebensjahrzehnt. Hoerner berichtete aber bereits 1958 über kolorektale Karzinome, die ein aggressiveres Verhalten mit einer schlechteren Überlebensrate haben, wenn die Diagnose vor dem vierzigsten Lebensjahr gestellt wurde ^{39, 40}. Recio und Bussey beschreiben eine steigende Anzahl aggressiver muzinöser Tumore bei jungen Patienten. In Ihrer Studie sind 53% aller Tumore in der Gruppe junger Patienten als „high grade“ klassifiziert, in der Gruppe alter Patienten lediglich 20% ⁴¹. Beim Vergleich von Patienten unter 40 versus über 40 Jahre findet Behbehani eine höhere Inzidenz an schlecht differenzierten Tumoren (21% versus 8%) sowie ein fortgeschritteneres Stadium bei Diagnose im jungen Alter. Die Überlebensrate bei jungen Patienten ist 23% versus 61% in der Vergleichsgruppe ⁴².

1.2.5. Screening-Untersuchungen beim sKRK

Dem Screening des sKRK liegen in Deutschland die sogenannten S3 Leitlinien zugrunde, die im Jahre 2004 in ihrer aktuellen Fassung publiziert sind ¹⁵⁴. Mit der Darmkrebsvorsorge für die asymptomatische Bevölkerung sollte ab dem Alter von 50 Jahren begonnen werden. Als Standardverfahren gilt die Koloskopie, sie ist der Sigmoidoskopie überlegen. Bei Personen, die sich einem Koloskopie-Screening unterziehen, erübrigt sich das FOBT-Screening. Lehnt ein Patient das Koloskopie-Screening ab, sollte eine Sigmoidoskopie alle fünf Jahre sowie ein jährlicher FOBT durchgeführt werden. Wird von einem Patienten jegliches endoskopisches Screeningverfahren abgelehnt, ist die jährliche FOBT Testung durchzuführen. Hat eine Person einen positiven FOBT Test, sollte dieser nicht kontrolliert werden, sondern eine Koloskopie folgen. Andere Screeningverfahren (CT-Kolonographie, MRT-Kolonographie) als die Koloskopie, Sigmoidoskopie und die FOBT können derzeit nicht empfohlen werden. Eine hohe Akzeptanz des Screening-Programms ist Voraussetzung für die Senkung von Inzidenz und Mortalität des kolorektalen Karzinoms. Eine obere Altersbegrenzung für das Screening kann bei steigender Lebenserwartung nicht gegeben werden. Hier erscheint eine individuelle Entscheidung unter Berücksichtigung der Begleiterkrankungen angezeigt.

Die Studie von Imperiale et al., in der zur Vorsorge eine komplette Koloskopie durchgeführt wurde, konnte zeigen, dass ein sKRK bei Menschen zwischen 40 und 49 Jahren sehr selten ist ⁴³.

Die Wertigkeit von Tumormarkern beim kolorektalen Karzinom wird seit vielen Jahren kontrovers diskutiert. Das Carcino-embryonale Antigen (CEA) ist ein komplexes Glycoprotein, welches weltweit in der Diagnostik, Nachsorge und Therapiekontrolle des sKRK angewandt wird. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität dieses Testverfahrens weder geeignet ist, eine Primärdiagnose zu stellen noch lokale Rezidive oder distante Metastasen zu detektieren ⁴⁴⁻⁵⁰. Dies unterstreicht die Notwendigkeit zur Definition neuer biologischer Marker für das sKRK.

1.3. Hereditäre Tumorsyndrome des Kolons und Rektums

Es wird angenommen, dass etwa 5-10% aller kolorektalen Karzinome auf einer erblichen Veranlagung basieren ⁵¹⁻⁵⁷. Die beiden häufigsten erblichen Tumorerkrankungen sind das HNPCC-Syndrom (**H**ereditäres **N**icht **P**olypöses **C**olon **C**arzinom) und die FAP (**F**amiliäre **A**denomatöse **P**olyposis) (Abb. 4).

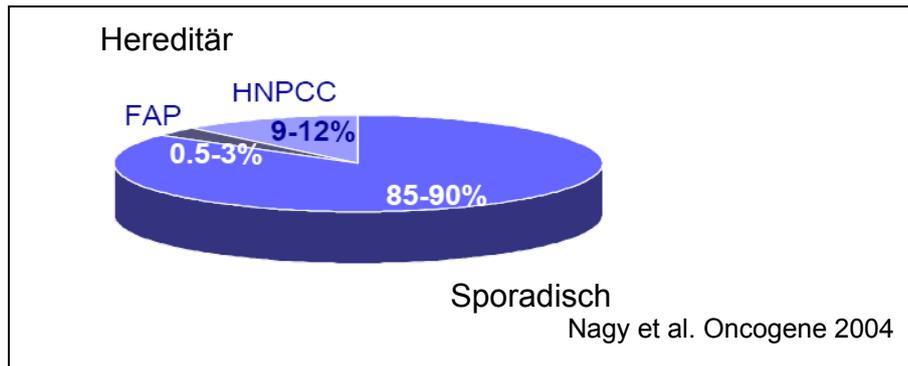


Abb.4: Häufigkeit des sKRK und der hereditären KRK ⁵⁵

1.4. Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP)

1.4.1. Epidemiologie und Pathogenese

Im Jahre 1925 stellte Lockhart-Mummery im Londoner St. Marks Hospital erstmals ein Polyposisregister auf. Er konnte bei mehreren FAP Familien nachweisen, dass viele hundert Polypen im Kolorektum in aufeinander folgenden Generationen auftraten. Er postulierte, dass diese Adenome die Vorstufe zum invasiven Karzinom darstellten. Die Betroffenen verstarben sehr häufig am frühen Krebstod. Er erkannte, dass nicht das Karzinom, sondern die Disposition zur Ausbildung des FAP Karzinoms vererbt wird ⁵⁸. Der autosomal dominante Vererbungsmechanismus wurde durch Gardner et al. und Turcot et al. in den fünfziger Jahren erstmals beschrieben ^{59, 60}. Die Häufigkeit der FAP wird mit 1:10.000 angegeben. Die Penetranz beträgt 100%. Grundsätzlich ist zwischen einer autosomal-dominanten Keimbahnmutation und der Neumutation zu unterscheiden. Beim autosomal-dominanten Vererbungsmodus haben Kinder von FAP-Patienten ein 50%iges Risiko, an FAP zu erkranken. Dabei kann die Keimbahnmutation durch die väterliche oder mütterliche Keimzelle verursacht

sein. Untersuchungen zeigten, dass zwischen 25% und 40% der FAP-Erkrankungen durch eine „de novo“ Mutation initiiert werden ⁶¹. Sowohl die Eltern als auch die Geschwister dieser FAP-Patienten haben kein erhöhtes FAP-Erkrankungsrisiko und sind klinisch unauffällig. Dies impliziert das diagnostische Dilemma der „de novo“ FAP, da hier eine „leere“ Familienanamnese vorliegt.

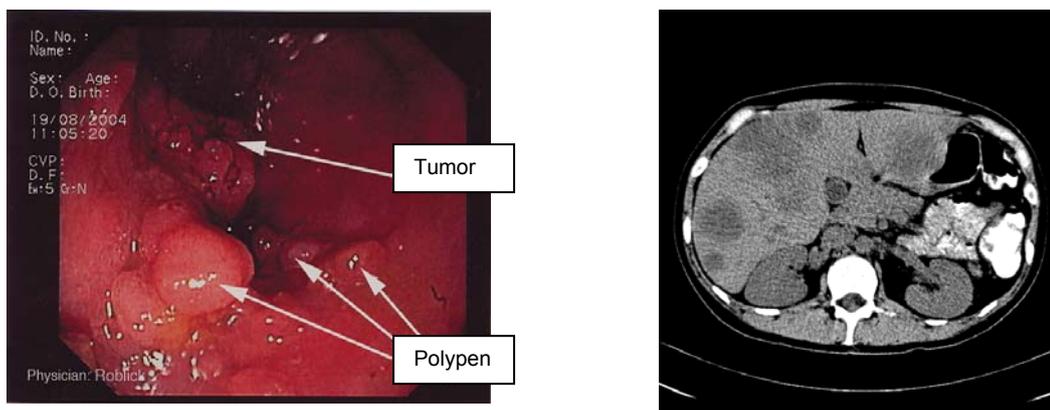


Abb. 5a + b: Endoskopisches Bild eines 27-jährigen Patienten mit drei „de novo“ FAP assoziierten KRK und diffuser Leberfilialisierung

1.4.2. Genetik

Die genetische Ursache der FAP ist eine Keimbahnmutation des *APC*-Gens (**A**denomatous **P**olyposis **C**oli Gen). Es handelt sich um ein Tumorsuppressor-Gen, welches auf dem Chromosom 5q21 lokalisiert ist. Es konnte 1991 identifiziert werden ^{62, 63}. Das Gen besteht aus 15 Exons, wobei das letzte Exon mit 6574 Basenpaaren etwa $\frac{3}{4}$ der gesamten kodierenden Sequenz ausmacht. Das APC-Gen kodiert für ein Protein, welches aus 2843 Aminosäuren zusammengesetzt ist und sich an der Regulation der Zellproliferation beteiligt. Das APC-Protein greift in die Regulierung und Steuerung der Zellteilung und Zelladhäsion einzelner Zellen sowie epithelialer Zellverbände ein. Eine von vielen wichtigen Funktionen des APC Proteins ist die Regulation von Expressionsunterschieden Kolonkarzinomen assoziierter Moleküle, wie β -Catenin, einem Mediator im wnt-Signalweg. Obwohl Dysregulationen des APC/ wnt/ β -Catenin Signalwegs in einer ganzen Reihe verschiedener Tumorentitäten auftreten, so scheint dies für die Initiierung kolorektaler Karzinome fundamental zu sein. Hierbei besitzt das APC Protein eine Region mit einer β -Catenin bindenden Domäne. β -Catenin ist ein Protein, welches

als Aktivator der T-Zell Faktor 4 (tcf-4) abhängigen Transkription zu einer gesteigerten Expression der Zellzyklusregulatoren Cyclin D, MMP-7 und c-myc führt. Die Bedeutung von β -Catenin im Rahmen der Karzinogenese und das onkogene Potential dieses Polypeptids wurde in verschiedenen „in vitro“ Modellen und tierexperimentellen Studien belegt⁶⁴⁻⁶⁶. Beim sKRK konnte eine Akkumulation von β -Catenin nach Inaktivierung des APC Gens nachgewiesen werden.

Durch Mutation im APC-Gen kommt es zur Synthese eines verkürzten APC-Proteins. Durch die Verkürzung fehlt die regulierende Domäne des β -Catenins. Der β -Cateninspiegel steigt in den Zellen an. Es kann zu einem unkontrollierten Wachstum von Epithelzellverbänden kommen, die sich klinisch als Adenome manifestieren. Mittlerweile sind über 800 solcher Mutationen des APC-Gens definiert (APC-Mutationsdatenbank: www.perso.curie.fr/Thierry.Soussi). Die häufigsten Mutationen werden für Kodon 1061 und Kodon 1309 beschrieben⁶⁷⁻⁷⁰.

Im Gegensatz zum HNPCC ist bei der FAP eine Genotyp-Phänotyp Beziehung sowohl in Bezug auf Schweregrad als auch auf Ausbildung extrakolischer Manifestationsformen nachweisbar. Bis zum Kodon 74 (Exon 1 und 2) sind bisher keine Mutationen beschrieben. Mutationen im Bereich des Kodons 77-157 führen meist zu einer abgeschwächten Form der FAP („attenuated“ FAP, s. Seite 24). Mutationen der Kodons 168-1554 determinieren das klassische Bild der FAP⁷¹. Ein besonders stark ausgeprägtes Polypenwachstum mit mehr als 5000 Darmpolypen wurde bei Patienten beobachtet, die eine Mutation im Bereich der Kodons 1250-1330 aufweisen. Bei Patienten mit Mutationen außerhalb dieses Bereichs wurden nur 1000-2000 Adenome in den Darmpräparaten gezählt⁷². Besonderer Beachtung gilt hierbei der Mutation im Kodon 1309. Sie führt zu einem besonders schweren Krankheitsverlauf. Die Polyposis manifestiert sich durchschnittlich 10 Jahre früher und betroffene Patienten erkranken konsekutiv 10 Jahre früher am FAP Karzinom⁵⁶.

1.4.3. Klinische Charakteristika der FAP

1.4.3.1. Kolische Manifestationsform

Charakteristisch ist das Auftreten von multiplen adenomatösen Polypen im Kindes- und Jugendalter, wobei es aber deutliche Unterschiede im klinischen Verlauf einzelner Familien und auch einzelner erkrankter Familienmitglieder gibt (s. P. 1.4.3.3.). Meist treten die ersten Polypen in der zweiten Lebensdekade auf und bleiben zunächst über mehrere Jahre asymptomatisch. Ein Auftreten von Polypen zum Zeitpunkt der Geburt ist bisher nicht beschrieben worden. Laut dänischem Polyposisregister wird das FAP-Karzinom bei Patienten im Durchschnitt mit 36 Jahren diagnostiziert. Bereits vier Jahre später ist die Hälfte der Patienten am Karzinom verstorben ⁷³.

Typische Symptome der kolonischen Manifestation sind unspezifische abdominelle Beschwerden, Wechsel zwischen Diarrhoen und Verstopfung, sowie Blut- oder Schleimbeimengungen im Stuhl.

Die Diagnose FAP gilt als gesichert, wenn bei einem Patienten mehr als 100 Polypen endoskopisch gesehen und diese Polypen histologisch als adenomatös klassifiziert werden ⁷⁴. Bei Kindern von FAP-Familien reicht der Nachweis von bis zu 20 Polypen zur Diagnosesicherung aus. Typischerweise kommt es zunächst zum Auftreten weniger Polypen, deren Anzahl jedoch in kurzer Zeit zunimmt. Unter dem Mikroskop imponieren die adenomatösen Polypen zumeist als tubuläre, seltener tubulo-villöse oder villöse Formen.



Abb.6: Rektum einer 21-jährigen Patientin mit FAP

1.4.3.2. Extrakolische Manifestationsform

a. Tumoren im oberen Gastrointestinaltrakt

Als extrakolische Manifestationsformen der FAP werden Tumoren im oberen Gastrointestinaltrakt, Veränderungen des retinalen Pigmentepithels, Osteome, Epidermoidzysten sowie Desmoide beschrieben.

So entwickeln etwa 90% der FAP Patienten Polypen im Bereich des Magens und Duodenums⁷⁵. Bei den Polypen des Magens handelt es sich in der Regel um hyperplastische Drüsenkörperzellen, die zumeist im Magenfundus auftreten und keine maligne Entartungstendenz zeigen. Die Polypen des Duodenums haben ein erhöhtes Entartungsrisiko. Somit lässt sich erklären, weshalb FAP-Patienten ein über 300-fach höheres Risiko haben, an einem Duodenalkarzinom zu erkranken^{76, 77}.

b. Retinaveränderungen

An der Retina kommt es bei etwa 80% der FAP-Patienten zu einer charakteristischen Hypertrophie des retinalen Pigmentepithels (CHRPE), die häufig bereits kongenital, sich also noch vor dem Auftreten der ersten Darmpolypen manifestiert⁷⁸. Somit kann die CHRPE bereits im Säuglingsalter als Marker für einen Anlageträger in FAP-Familien herangezogen werden. Unter dem Mikroskop erkennt man einschichtige hypertrophierte Pigmentepithelzellen, die mit großen runden Pigmentgranula angefüllt sind. Kleine oval pigmentierte Läsionen wie große depigmentierte Flecken können beobachtet werden. Diese Veränderungen der Retina beeinträchtigen das Sehvermögen nicht.

c. Osteome

Insgesamt 76-93% aller FAP-Patienten entwickeln während ihres Lebens ein Osteom^{79, 80}. Dies sind gutartige Knochentumoren, welche sich bevorzugt an Mandibula, Schädel, aber auch an Röhrenknochen und Becken manifestieren. Sie wachsen primär verdrängend, haben jedoch kein malignes Entartungspotential.

Sofern sie keine Symptome wie beispielsweise Nervenkompression verursachen, bedürfen sie daher auch keiner Therapie.

d. Epidermoidzysten

Die FAP manifestiert sich an der Haut durch das Auftreten von Epidermoidzysten. Es handelt sich hier um benigne subkutane Tumore, die bevorzugt im Gesicht und an den Extremitäten vorkommen. Bei Kindern aus FAP-Familien treten sie meist schon vor der Ausbildung von Darmpolypen auf, so dass sie ein Hinweis auf das Vorliegen einer FAP sein können ⁸¹.

e. Desmoide

Etwa 10% der FAP-Patienten bilden Desmoidtumoren ^{82, 83}. Dies sind niedrig maligne, fibröse Tumore, die häufig intraabdominell verdrängend wachsen, jedoch nicht metastasieren. Aufgrund ihres verdrängenden Wachstumscharakters kann es durch Obstruktionen zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie z.B. Ileus kommen ⁸⁴. Die Desmoidtumore zählen mittlerweile zu den Haupttodesursachen kolektomierter FAP-Patienten ⁸⁵ (Abb. 7).



Abb.7: Patient mit intraabdominellem Desmoid Tumor

1.4.3.3. Unterschiedliche Verlaufsformen der FAP

Neben der klassischen FAP existieren noch andere Verlaufsformen, die als „hereditary flat adenoma syndrome“ (HFAS) und „attenuated adenomatous polyposis coli“ (AAPC) bezeichnet werden. Typisch für diese Verlaufsformen sind Polypenzahlen von bis zu 100. Durchschnittlich treten diese 10 bis 15 Jahre später als bei der klassischen Form der FAP auf ⁸⁶. Die Polypen imponieren flacher und sind zumeist im rechten Hemikolon lokalisiert. Bei diesen attenuierten Verlaufsformen ist eine klinische Abgrenzung zum HNPCC-Syndrom schwierig. Das Entartungspotential ist jedoch auch bei diesen Verlaufsformen hoch.

1.4.4. Therapie der FAP

Beim Auftreten der ersten Polypen im Kolon eines FAP Patienten kann zunächst eine endoskopische Abtragung in Abhängigkeit von der Größe und dem Dysplasiegrad ausreichend sein. Der Patient muss sich jedoch in einem festgelegten Vorsorgescreening unter kompetenter ärztlicher Betreuung befinden. In mehreren Studien wurde bereits der medikamentöse Einfluss auf das Polypenwachstum untersucht. Besonders nicht steroidale Antirheumatika (NSAID) wie Acetylsalicylsäure (ASS), COX II Hemmer und Sulindac, sowie die orale Einnahme von Stärke scheinen die Polypenanzahl wie auch die Polypengröße zu reduzieren ⁸⁷⁻⁹².

Im weiteren Verlauf wird es jedoch zwangsläufig zu einem exponentiellen Anstieg der Polypenanzahl kommen, so dass die prophylaktische (Prokto-)Kolektomie die Therapie der Wahl ist ⁹³. Der Zeitpunkt des Eingriffs ist abhängig von Anzahl, Größe und Dysplasiegrad der Adenome, sowie von der klinischen Beschwerdesymptomatik und sollte individuell festgelegt werden. Patienten, bei denen im jungen Alter ein Defekt des APC-Gens identifiziert wurde, sollten in der Regel zwischen dem 18-22 Lebensjahr (prokto-)kolektomiert werden. Sicherlich ist zu empfehlen, einen solchen operativen Eingriff in spezialisierten chirurgischen Zentren durchführen zu lassen, da neben Erfahrung und Operationstechnik auch die Kenntnis des Krankheitsbildes und dessen spezielles Nachsorgeprogramm von entscheidender Bedeutung sind ⁹⁴⁻⁹⁶.

1.4.5. Familienberatung

Im Vordergrund der Beratung und Betreuung steht bei klinischem und endoskopischem Erkrankungsverdacht der molekulargenetische Nachweis des APC-Gen Defektes. Mutationsträgern des APC-Gens wird zunächst ein speziell konzipiertes Vorsorgeprogramm empfohlen (s. P. 1.4.6.). Nicht-Mutationsträger brauchen kein spezielles Vorsorgeprogramm. Besteht bei einem Patienten der klinische Verdacht auf eine FAP, sollte er sich mit einem spezialisierten Zentrum in Verbindung setzen. Angehörige eines FAP-Patienten, die aufgrund des autosomal-dominanten Vererbungsmechanismus als potentielle Genträger in Betracht kommen, werden als Risikopersonen bezeichnet. Etwa ab dem fünfzehnten Lebensjahr kann diesen Personen ebenfalls nach einer humangenetischen Beratung die Möglichkeit der gezielten molekulargenetischen Untersuchung angeboten werden. Bestätigt sich eine Genträgerschaft, sollte die Risikoperson mit der speziellen Vorsorge beginnen.

1.4.6. Vorsorgeprogramm FAP betroffener Familien

Ein spezielles Vorsorgeprogramm für Risikopersonen mit nachgewiesenem Gendefekt aus Familien mit klassischer FAP ist durch eine internationale Expertengruppe erarbeitet worden⁹⁷. In Deutschland richtet sich das Vorsorge-Screening nach den S3 Leitlinien aus dem Jahr 2004¹⁵⁴. Risikopersonen, bei denen die Mutation bestätigt oder nicht ausgeschlossen werden konnte, sollten spätestens ab dem 10. Lebensjahr jährlich rektosigmoidoskopiert werden. Bei Nachweis von Adenomen muss eine komplette Koloskopie erfolgen und bis zur Proktokolektomie jährlich wiederholt werden. Eine ÖGD mit besonderer Inspektion der Papillenregion sollte spätestens ab dem 30. Lebensjahr alle drei Jahre durchgeführt werden. Das Intervall sollte in Abhängigkeit vom Schweregrad vorhandener Adenome auf bis zu einem Jahr verkürzt werden. Weitere extrakolische Manifestationen müssen bei der Vorsorge beachtet werden. Es sollte daher eine jährliche Sonographie des Abdomens und der Schilddrüse ab dem 10. Lebensjahr erfolgen. Wie bereits beschrieben, manifestiert sich etwa bei 80% der FAP-Patienten eine harmlose kongenitale Hypertrophie des retinalen Pigmentepithels (CHRPE). Diese Störung liegt wegen des kongenitalen Auftretens

auch schon bei den Kindern CHRPE positiver FAP-Patienten vor, sodass als weitere Vorsorge eine einmalige Augenhintergrundspiegelung durchgeführt werden sollte. Selbstverständlich beinhaltet die Vorsorge ebenfalls eine jährliche gründliche körperliche Untersuchung.

Ein Patient mit einer attenuierten FAP sollte in Abhängigkeit von Alter, Polypenzahl und histologischem Befund therapiert werden. Bei endoskopisch nicht beherrschbarer Polyposis ist eine Kolektomie indiziert. Patienten, die nicht kolektomiert sind, müssen zeitlebens jedes Jahr koloskopiert werden. Risikopersonen aus Familien mit attenuierter FAP sollten im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung im Alter von 15 Jahren erstmals koloskopiert werden. Finden sich keine Polypen, sollten diese Personen ab dem 20. Lebensjahr jährlich koloskopiert werden.

1.5. Proteomics - neuer Ansatz zur Proteomerforschung

1.5.1. Das Humangenom-Projekt

Durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms hat die Wissenschaft einen bedeutenden Meilenstein erreicht. Die gewonnenen Daten eröffnen völlig neue Einblicke in die Organisation der genetischen Information des Menschen. Mit Hilfe des „Human Genoms“ verspricht sich die Wissenschaft auch neue Erkenntnisse über das Zusammenwirken biomolekularer Prozesse zwischen DNA, RNA und Proteinen zu gewinnen. Das menschliche Genom verrät jedoch wenig über die dynamischen Prozesse, die in der Zelle ablaufen. Welche Gene tatsächlich aktiv sind, zeigt erst eine Analyse der mRNA, die die Information des Genoms über ein reifes Transkript an die Proteinsynthesemaschinerie weiterleitet. Qualitative und quantitative Unterschiede der mRNA-Expression resultieren in der unterschiedlichen Proteinzusammensetzung verschiedener Zelltypen.

Die Anzahl möglicher molekularer Spezies ist bei den Proteinen aufgrund posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung etc. um ein Vielfaches größer als die Zahl der mRNA-Moleküle.

1.5.2. Definition des Proteoms

Die exakte Anzahl von Proteinen in einer Zelle ist nicht genau bekannt, es wird aber angenommen, dass ungefähr 60.000 Proteine durch das menschliche Genom verschlüsselt werden. Proteine sind die Moleküle, die für nahezu alle dynamischen Abläufe einer Zelle verantwortlich sind. Die phänotypischen Merkmale von Zellen, Geweben, Organen sowie des ganzen Organismus werden durch Proteine determiniert.

Die Entwicklung der zweidimensionalen Gelelektrophorese von Klose und O'Farrell eröffnete erstmals die Möglichkeit der Separation von tausenden Proteinen in einem Experiment^{98, 99}. In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, diese Technik weiterzuentwickeln. Ein neuer Begriff auf dem Gebiet der Molekularbiologie - „Das Proteom“ - wurde während einer Tagung der Electrophoresis Society in Siena 1994 erstmals beschrieben^{100, 101}. Er definiert die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt (engl.: „**Protein complement expressed by the genome**“).

Die Erforschung des Proteoms wird von vielen führenden Wissenschaftlern als konsekutiver Schritt nach der Entschlüsselung des Genoms betrachtet. Von der „Protein Structure Initiative“ des National Institute of General Medical Science wurde ein „Human Proteome Project“ initiiert. Es soll zu einem Äquivalent des Genomprojektes mit dem Endziel der Proteinanalyse aller humanen Gewebe ausgeweitet werden¹⁰².

„Cancer Proteomics“ ist der Teil dieses noch jungen Wissenschaftszweiges, der sich vor allem mit sogenannten „protein fingerprints“, d.h. tumorspezifischen Proteinexpressionsmustern, auseinandersetzt. Das unterschiedliche Expressionsniveau/ -muster von Proteinen ist die Reflexion der molekularen Veränderungen, die sich aus Veränderungen auf genomischer oder transkriptomischer Ebene konsekutiv ergeben. Mittlerweile sind mehrere Studien veröffentlicht worden, die ein spezifisches Proteinexpressionsmuster für unterschiedliche Karzinomentitäten und deren jeweiliges Normalgewebe (Ovar, Prostata, Brust, Harnblase) zeigen¹⁰³⁻¹¹³. Eine solche Charakterisierung von tumorspezifischen Polypeptidregulationen kann zu einem besseren Verständnis der Pathogenese von Karzinomen beitragen und soll in naher Zukunft neue diagnostische und therapeutische Ansätze eröffnen.

Auch wenn die Gesamtzahl an Publikationen über „Cancer Proteomics“ stetig wächst, gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit dem sporadischen KRK befassen. Proteompublikationen zum hereditären KRK liegen bislang nicht vor¹¹⁴.

2. Ziel der Arbeit

- Entwicklung repräsentativer Proteinexpressionsdatenbanken sporadischer kolorektaler Karzinome für Normalschleimhaut, Polypen, Karzinom und Metastase
- Intra- und interindividueller Vergleich der Proteinexpression von der Normalschleimhaut via Polyp zum invasiven Karzinom und zur konsekutiven Lebermetastase
- Massenspektrometrische Identifikation potentieller Markerproteine zur Differenzierung „normal versus disease“
- Vergleich der Expressionsmuster zwischen sporadischen und hereditären/FAP Geweben (normal vs. FAP normal; Polyp vs. FAP Polyp; Ca. vs. FAP Ca.)

3. Material und Methoden

3.1. Präparation und Asservierung der Proben

Der Erfolg der Proteinanalyse hängt ganz entscheidend von der Qualität der Proteinprobe ab. Die Integrität der Proteine, insbesondere die posttranslationale Modifikation, sollte unverändert erhalten bleiben. Neben der Inaktivierung von Proteasen ist die Hemmung von Phosphatasen und Glykosidasen bei der Asservierung der Proben sicherzustellen.

In der Klinik für Chirurgie, Campus Lübeck konnten mehr als 200 Proben aus Resektaten des Kolorektums und der Leber entnommen werden. Sämtliche Patienten waren am Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Lübeck operiert worden. Nach einer gründlichen mechanischen Reinigung des resezierten Darms und Spülung mit NaCl wurden unter Aufsicht eines Pathologen Gewebeproben entnommen. Dabei wurden gesunde Kolonschleimhaut (etwa 4cm²), Polypen und, wenn vorhanden, Karzinomgewebe asserviert (Abb.8)

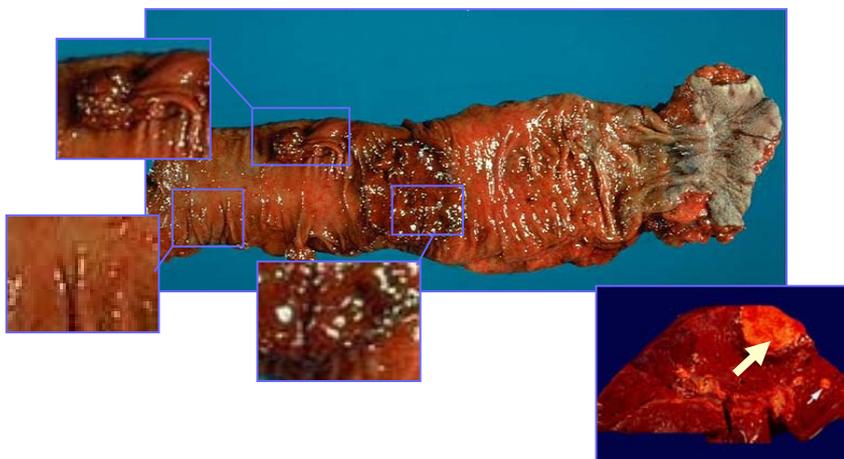


Abb.8: Probengewinnung von einem Resektat (Normalmukosa, Polyp, KRK und Metastase) zur intraindividuellen Expressionsanalyse

3.1.1. Franzén-Technik („Cell enrichment“)

Die Zellen werden durch Abkratzen („scraping“) der Mukosaoberfläche in nicht-nekrotischen Gewebearealen gewonnen und direkt in 5ml eiskalter RPMI-1640 Kulturlösung, welche mit 5% fetalem Kälberserum und 0,2nM Phenylmethylsulfonyl Fluorid / 0,83nM Benzamidin angereichert ist, gebracht. Der

Technik liegt das Prinzip der Feinnadelaspirationstechnik nach Franzén zu Grunde. Hier geht man davon aus, dass Tumorzellen leichter aus dem Gewebeverband lösbar sind als ihr mechanisch stabileres umgebendes Bindegewebe (Abb. 9a+b). Auf dieser Basis wird der Zell-Mediummix mehrmalig (10-15x) durch eine grosslumige Spritzenkanüle eingesaugt und wieder ausgepresst. Hierdurch lösen sich die Malignomzellen leicht aus dem Zellverband und werden mit der Kulturlösung vermischt.

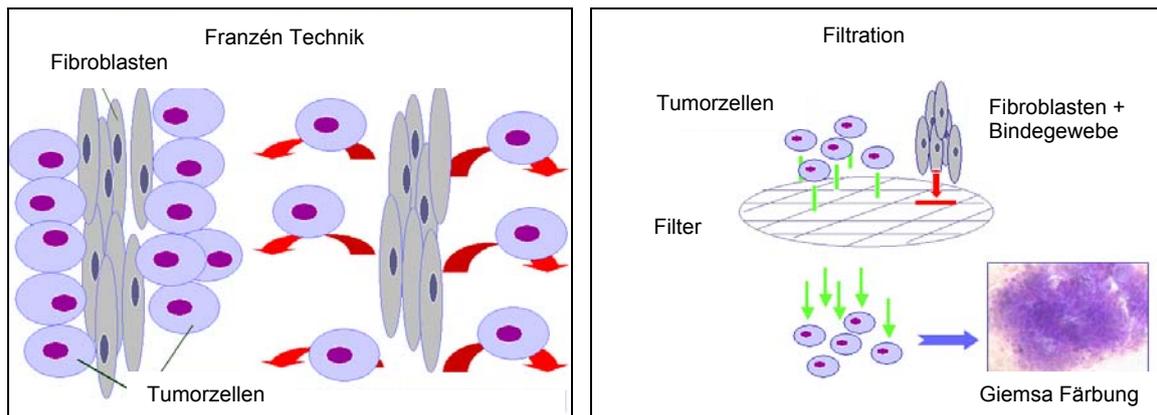


Abb.9 a + b: Franzén-Technik zur Gewinnung reiner Zellpellets („Cell enrichment“)

Anschliessend wird die Lösung mit den mechanisch dislozierten Tumorzellen und den Bindegewebsfragmenten durch ein Filtersystem bestehend aus zwei aufeinanderfolgenden Nylonfiltern mit Porengrößen von 250µm und 100µm hindurch filtriert, um die Bindegewebsfragmente von der Tumorzellsuspension zu trennen.

Unter die so gewonnene Zellsuspension werden 2ml einer eiskalter Percoll-Lösung (54,7% in PBS) gegeben und mit 2430 U/min für 10 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Das Zellpellet wird an der Trennschicht zwischen Percoll- und RPMI-Lösung gut sichtbar und kann mit einer Spritze abgesaugt werden (Abb.10).

Hiernach werden die gewonnenen Zellen zweimal mit kaltem PBS-Puffer pH 7,4 gewaschen. Diese Methode führt zu einer gereinigten Zellpopulation. Ihre Validität wird durch Ausstrich mit Giemsa-Färbung durch einen Pathologen auf Repräsentativität geprüft¹¹⁵⁻¹¹⁷. Nur solche Proben werden evaluiert, die einen Anteil an „Zielzellen“ (also Tumor-, Adenom- oder Normalzellen) von >90% aufweisen. Anschliessend wird das Probenpellet gewogen, in ein beschriftetes Röhrchen gegeben und bei -80 Grad Celsius eingefroren.

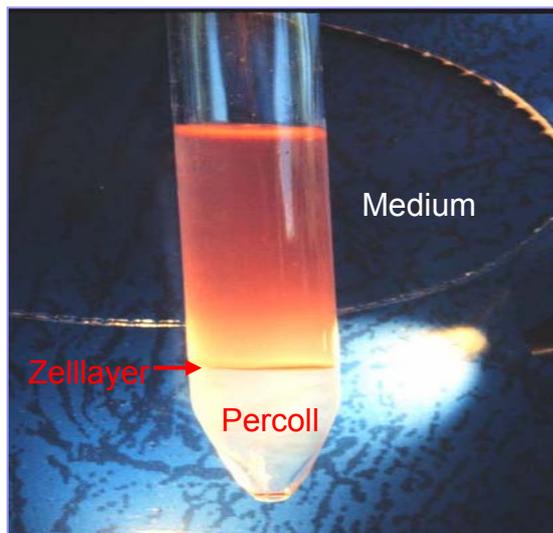


Abb.10: Zellgewinnung zur 2-DE Analyse

3.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die leistungsstärkste analytische Methode zur Trennung von mehreren tausend Proteinen ist die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE). Wie bei allen elektrophoretischen Methoden werden elektrisch geladene Teilchen (Protein-Ionen) in einem elektrischen Feld durch eine Matrix bewegt und dabei getrennt.

Alle Proteine tragen ein individuelles Muster geladener Aminosäurereste. Sie sind Polyelektrolyte. Die Ladung dieser Polyelektrolyte ist pH-abhängig und lässt sich als Zahl ausdrücken. Der so genannte pI-Wert (isoelektrischer Punkt) eines Proteins ist derjenige pH-Wert, bei dem sich die Summe an negativ und positiv geladenen Aminosäureresten des Proteins gegenseitig aufheben. Das Protein ist am pI physikalisch ungeladen, die Ladung ist null. Das Protein stellt konsequent die Wanderung im Gelstreifen ein. Diese Separation von Polypeptiden entsprechend ihrer Ladung wird als 1. Dimension bezeichnet.

In Abhängigkeit von Ihren individuellen Aminosäuresequenzen haben Proteine unterschiedliche molekulare Massen, die ebenfalls charakteristisch sind. Dies nutzen bestimmte elektrophoretische Trennmethode aus („Molekülsieb“). Die Masseunterschiede und die damit in Zusammenhang stehenden Größenunterschiede drücken sich in unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten in der Gelmatrix aus (2. Dimension) ¹¹⁷⁻¹²⁰.

3.2.1. Isoelektrische Fokussierung (IEF) mit IPG-Strips (1. Dimension)

Die Einführung von immobilisierten **pH-Gradienten** in Gelstreifen (IPG-Strips) war eine wichtige Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit und damit den Durchbruch der 2-DE basierten Proteomforschung¹²¹⁻¹²³. Die IPG-Strips werden heute in verschiedenen Längen und für unterschiedliche pH Bereiche kommerziell angeboten. In der vorliegenden Studie wurden industriell hergestellte IPG-Strips (pH 4-7, 17cm Länge) der Firma Bio-Rad[®] benutzt, da sie eine Separation von 1500-2000 Proteinen ermöglichen.

Da das Trennprinzip der 1. Dimension Ladungsunterschiede ausnutzt, müssen die Proteine zunächst löslich gemacht werden. Die komplette und gleichbleibende Löslichkeit der Proteine („Solubilisierung“) während des gesamten Vorgangs der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist die Grundvoraussetzung zur Separation¹²⁴. Hierzu wird zunächst ein Rehydrierungspuffer, bestehend aus 7M Urea, 2M Thiourea, 1% 3-(3-Chloramidopropyl) Dimethylammonio-1-propanesulfonate (CHAPS), 0,4% immobilized pH gradient IPG Puffer, 0,3% Dithiothreitol (DTT) und etwas Bromophenol Blau in jeden der gesäuberten Schächte des IPGphor Isoelectric Focusing Systems (PROTEAN IEF[®], BioRad[®]) hinzugegeben. Die IPG-Strips werden mit der Gelseite nach unten im jeweiligen Schacht plziert. Es ist darauf zu achten, dass das Gel vollständig vom Puffer umflossen wird. Die IPG-Strips werden mit Öl bedeckt und der „stripholder“ wird verschlossen. Die IPG-Streifen werden bei Raumtemperatur für 10 Stunden rehydriert.

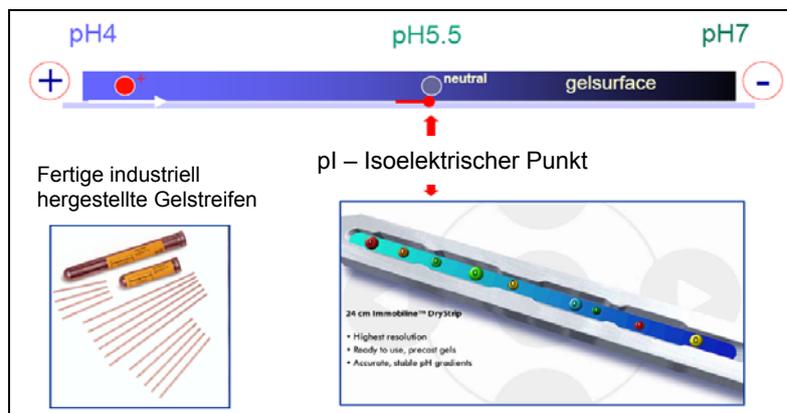


Abb.11: Schematische Darstellung der 1. Dimension; industriell hergestellte IPG-Strips (Fa. BioRad)

Im Anschluss laufen die Gele für ~52900 Vh. Nach Beendigung der IEF sind die Proteine entsprechend ihres pI aufgetrennt. Die großen Mengen an zugesetztem CHAPS zur Solubilisierung vor der IEF stören den Übertritt der Proteine in das SDS Gel der 2. Dimension und müssen entfernt werden. Deshalb werden die fokussierten IPG-Strips vor dem Auftragen auf die SDS-PAGE für 30 min equilibriert. Der Equilibrierungspuffer besteht aus 50mM Tris-HCL ($pH8.8$), 6M urea, 30% Glycerol und 2% SDS (Abb. 11).

3.2.2. SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (2.Dimension)

Die SDS-PAGE Technologie ist eine der basalen Methoden moderner Proteinanalytik. Die grundlegende Idee ist, alle Proteine nach kompletter Denaturierung in einheitliche, vollständig entfaltete Polypeptidketten mit gleichartigen Ladungseigenschaften zu überführen. SDS (Sodium-dodecylsulfat) ist ein stark denaturierendes Detergenz, welches alle nicht kovalenten Bindungen, die die Proteinstruktur bestimmen, aufhebt. Proteine mit großer Molekülmasse bilden im Gegensatz zu solchen mit kleiner Masse lange Polypeptidfäden. Längere Polypeptidfäden wandern aufgrund ihrer andersartigen Wechselwirkungen mit dem „Netzwerk“ der Gel-Matrix (z.B. Reibung) langsamer als kleine Proteine. Die SDS-PAGE trennt also Proteine nach ihrer Größe (Abb.12).

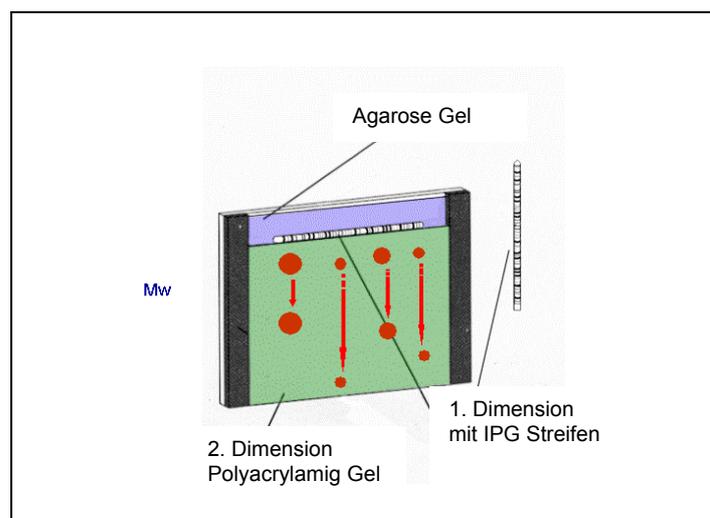


Abb.12: Schematische Darstellung der 2. Dimension

Die SDS Polyacrylamid Gele haben eine Größe von 1,5 x 200 x 230 mm. Sie bestehen aus 12,5% Polyacrylamid. Zur Herstellung eines Gels wird eine Grundlösung aus 376nM Tris Puffer (pH 8.8), 10% SDS und zweifach destilliertem Wasser benutzt. Zur Polymerisation wird 10% Ammonium Persulphat und TEMED hinzupipettiert. Nach Auffüllen der Gelkassetten müssen die Gele über mindestens 60 Minuten polymerisieren. Die equilibrierten IPG-Streifen werden am oberen Rand des jeweiligen Gels positioniert und mit flüssigem Agarosegel in ihrer Position fixiert. Dabei ist darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen dem IPG-Strips und dem Gel festsetzen, die einen Übertritt der Proteine in die SDS PAGE verhindern. Im Anschluss laufen die Gele mit 42000 Vh über Nacht. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gelkassetten geöffnet und die Gele geborgen. Hiernach ist die Visualisierung der separierten Proteinspots durch eine Vielzahl von Färbetechniken möglich. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Färbung der Proteinspots mit Silbernitrat, da dieses die höchste Sensitivität besitzt

125

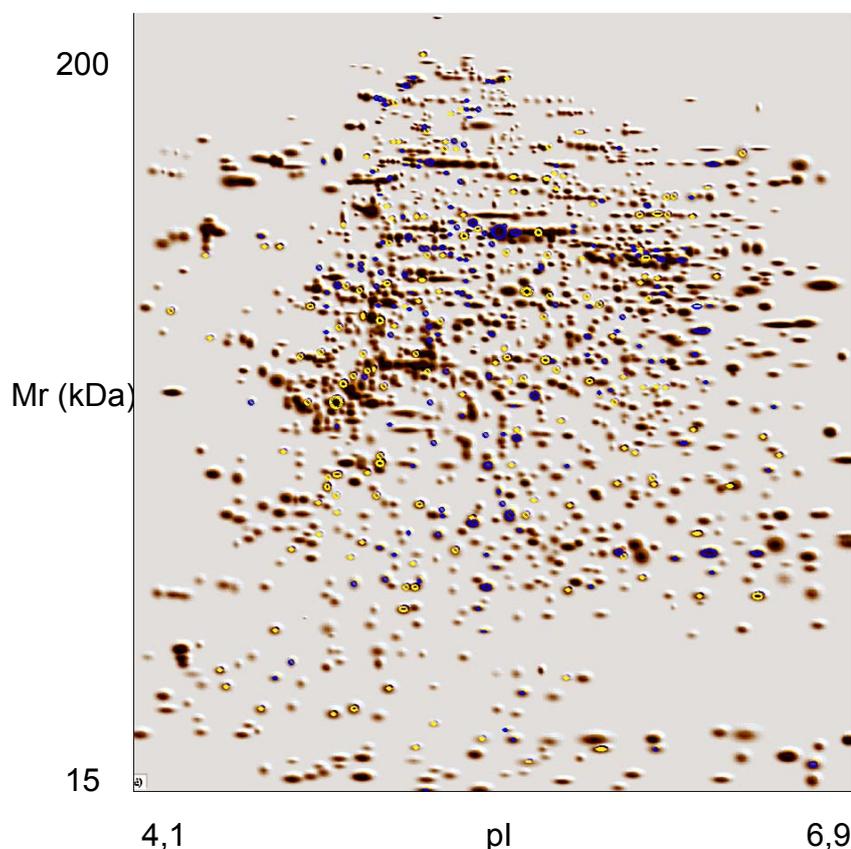


Abb.13: *Eingescanntes Gel eines Kolonkarzinoms mit bereits markierten Proteinspots*

3.3. Computergestützte Bildanalyse

Die Erfassung, Analyse und der Vergleich der Positionen von Proteinen auf dem jeweiligen Gel erfolgt mit einer leistungsstarken Software. In der vorliegenden Arbeit wurde die Software PDQuest 7.3 von Bio-Rad benutzt.

Zunächst sind die Gele mit dem GS-710 Image Densitometer (BioRad) eingescannt worden (Abb.13).

3.3.1. Detektion der Proteinspots im Gel

Das Detektieren der als Spots imponierenden Proteine respektive der Proteinisoformen („spot detection“) erfolgt software-gestützt. Über die Funktion „find spot centers“ werden die Spotzentren automatisch aufgesucht und mit einem Kreuz markiert. Gleichzeitig wird der Hintergrund subtrahiert und das sog. „streaking“ (streifenförmige Artefakte) entfernt. Die Sensitivität dieses Arbeitsschrittes kann manuell reguliert werden, bis alle (auch schwache) Proteine detektierbar sind. Die richtige Position der Kreuzmarkierungen muss für alle Spots in allen relevanten Gelen vom Untersucher manuell kontrolliert werden. Nur solche Proteinspots stehen der späteren Evaluation zur Verfügung, die in diesem Arbeitsschritt detektiert und markiert wurden. Die Funktion „Gaussian Model During Test“ erlaubt überlappende Spotcluster zu identifizieren, die Spots voneinander zu differenzieren und macht somit eine genaue Quantifizierung möglich. Die für ein spezielles Experiment optimierten Detektionsparameter können gespeichert und so auf alle Gele der Studie übertragen werden. So wird eine homogene Detektion für alle unter gleichen experimentellen Bedingungen gelaufenen Gele, die identisch gefärbt und gescannt wurden, garantiert. Die Software speichert den originären „Scan-file“ (Rohdatenfile), ein gefiltertes Image (Kopie des Originalscans mit Filterung und Detektion) und das synthetische „Gaussian Image“ mit den differenzierten Proteinspots. Jedem markierten Spot/Protein wird automatisch eine laufende Nummer („SSP number“) zugeordnet.

3.3.2. Matchset

Ist die Proteinspot-Detektion auf allen zu untersuchenden Gelen abgeschlossen, wird ein sogenanntes Matchset erstellt. Dies ist zum Vergleich der Spot Expression zwischen allen Gelen Voraussetzung. Hierzu werden die zu analysierenden Gele erwählt und dem Matchset ein Name gegeben. Ein synthetisches „Mastergel“ wird generiert, dass alle Spots von allen Gelen im Matchset enthält (Abb.14). Die PDQuest Software wählt als Vorlage für das Mastergel das Gel mit der besten Qualität. Alternativ kann der „Master“ auch willkürlich definiert werden (Wahl der Kontrolle z.B. Kolonnormalschleimhaut). Das Matchset mit allen Gelen wird auf dem Bildschirm sichtbar. Die einzelnen zu vergleichenden Gele werden in kleinen Fenstern angezeigt (Abb.15).

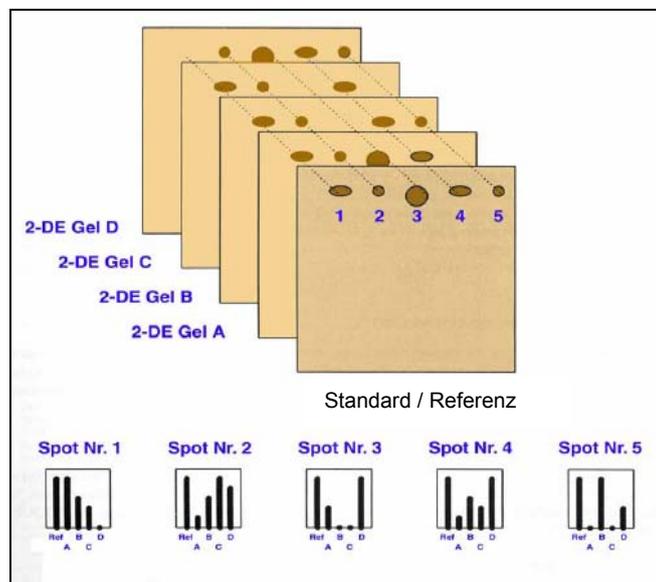


Abb.14: Schematische Darstellung eines Matchsets mit Standard/ Referenzgel

Spots, die nur in einzelnen Gelen detektiert werden, können manuell dem Mastergel zugeführt werden („add spot to master“). Durch die Struktur des Matchsets wird es möglich, alle Proteinspots im Matchset bezüglich quantitativer und qualitativer Unterschiede zu vergleichen. Die PDQuest Analyse Software besitzt hierzu eine „automated matching“ Funktion, die in exzellenter Weise für Gele von homogenen Proben (z.B. Zelllinien) funktioniert. Bei dem mehr heterogenen klinischen Material, wie in der vorliegenden Arbeit, ist diese Funktion unzureichend. Alle vom Programm „gematchten“ Spots wurden vom Untersucher nachkontrolliert.

Um ein gutes Ergebnis des automatischen Spotvergleichs zu ermöglichen, werden sogenannte „landmarks“ definiert.

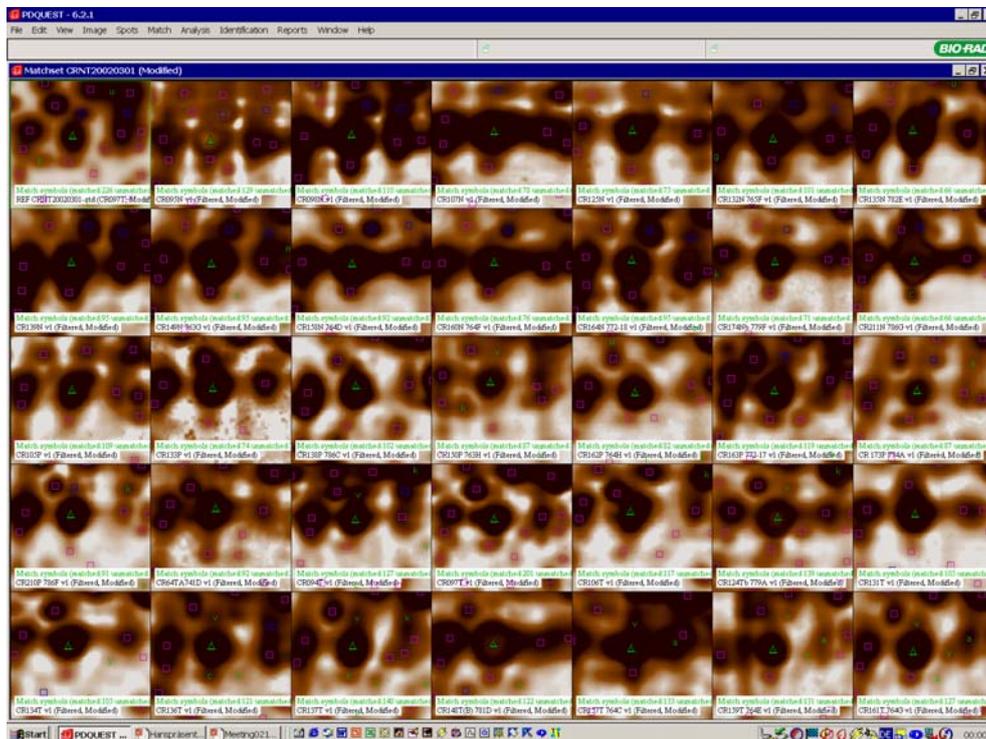


Abb.15: Matchset Kolon – Screenshot von PDQuest 7.3

Hierbei handelt es sich um prominente Spots, die in allen Gelen gut identifizierbar sind. Idealerweise werden solche Landmarken über alle Quadranten des Gels verteilt. Die Gele des Matchsets können so aneinander ausgerichtet und positioniert werden. Natürlicherweise ist die Zahl der benötigten Landmarken von der Homogenität des zugrunde liegenden Untersuchungsgutes abhängig. In der vorliegenden Untersuchung waren 25 Landmarken erforderlich, um ein gutes (jedoch immer noch korrekturbedürftiges) „automated matching“ Ergebnis zu erzielen. Mehrere Tools werden von PDQuest zur Verfügung gestellt, um das Matching zu kontrollieren. So zeigen vom Spotcenter ausgehende Vektoren („show vector offsets“) Distanz und Richtung jedes einzelnen Spots im Vergleich zum Mastergel und helfen durch Kontrolle der Ausrichtung und Distorsion eines jeden Spots sog. „missmatches“, also falsch gematchte Proteinspots, zu entdecken.

Ist das Matchset abgeschlossen, können die detektierten Spots aller Gele miteinander verglichen werden („matchset analysis“). Um die Spotexpression

statistisch vergleichbar zu machen, müssen experimentell induzierte Variationen (z.B. Pipettierunterschiede, Färbezeiten, minimale Probenverluste bei Applikation u.ä.) kompensiert werden. Dieser Arbeitsschritt wird als Normalisierung („normalization“) bezeichnet. In der vorliegenden Untersuchung wurde nach der totalen Quantität in validen Proteinspots normalisiert. Bei dieser Methode wird die Quantität der Spots aller Gele durch die Gesamtquantität aller Spots aller Gele dividiert. Diese Normalisierung geht davon aus, dass nur wenige Proteine innerhalb eines Experiments variieren und sich diese Variation innerhalb des Gels ausgleicht.

3.3.3. Analyse des Matchsets

Die Analysetools sind so programmiert, dass alle Spots im Matchset verglichen und als Datenbank organisiert werden können. Analysesets definieren Proteinspots, die statistisch und biologisch relevant sind. Es können Molekulargewichte einzelner Spots oder deren pI theoretisch/ rechnerisch ermittelt werden. Replikatgruppen (z.B. „Normal“) können definiert und so gruppenweise analysiert werden. Quantitative und qualitative Unterschiede zwischen Einzelgelen und/ oder Replikatgruppen sind definierbar. So ermittelt das qualitative Analyseset Spots, die in einer Replikatgruppe vorhanden sind, jedoch nicht in der Kontrolle (z.B. im Tumor vorhanden – im Normalgewebe nicht visualisierbar). Quantitative Analysesets fokussieren auf Spots, deren Expressionsquantität signifikant (95% Konfidenzintervall, $p=0,05$) erniedrigt oder erhöht ist (z.B. in der Tumorprobe X-fach höher exprimiert als in der Kontrolle). Hierbei beschreibt die Expressionsquantität die Signalintensität eines bestimmten Spots im Gel. Die Signalintensität wird in der PDQuest Software berechnet.

Somit ergibt sich in einmaliger Weise die Möglichkeit, z.B. potentielle Tumormarker zu entdecken. Diese sollten typischerweise in allen Tumorproben/-gelen exklusiv oder signifikant höher exprimiert sein als in der normalen Kontrolle. Um diese Signifikanz zu gewährleisten, bietet PDQuest ein entsprechend integriertes Statistikpaket an.

Steht ein sogenannter „spot picker“, also ein automatisiertes Gerät zum Herausschneiden von Spots aus dem Gel zu Verfügung, kann dieser via Matchset direkt angesteuert werden. Statistisch ermittelte selektierte Spots werden durch

Mausklick markiert, vom „spot picker“ herausgeschnitten und direkt in eine „96-well plate“ transferriert. Diese „96-well plate“ kann wiederum direkt zur „in-gel digestion“ mit Trypsin verwandt werden. Dieser geschlossene Ablauf ist umso wichtiger, als er die Kontamination auf ein Minimum zu reduzieren vermag. Hierdurch wird der Erfolg der späteren massenspektrometrischen Identifikation gewährleistet.

3.3.4. Statistische Analyse:

Die statistische Analyse wurde auf der Basis von Proteinspots respektive Replikatgruppen (Normal, Polyp, Tumor, Metastase) durchgeführt und so statistische Signifikanz mit den im folgenden genannten Tests ermittelt.

Um in PDQuest ein statistisches Analyseset zu kreieren, wird die Funktion „select statistic set“ gewählt. Die Funktion „Vergleiche Replikatgruppen“ wurde erwählt. Hiernach wurde das statistische Testverfahren ausgewählt und auf Signifikanz getestet.

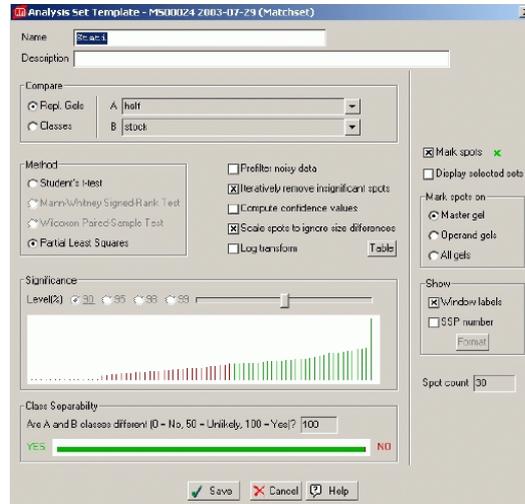


Abb.16: Statistisches Analyseset PDQuest

In unserem Fall wurde der **Mann-Whitney U Test** erwählt, da er für Replikatgruppen bei einem Minimum von vier Gelen pro Gruppe und einem Maximum von 20 Proben pro Gruppe Anwendung finden kann.

Der Mann-Whitney-Test (Mann-Whitney-U-Test) ist ein nicht-parametrischer statistischer Test. Er wurde von Mann und Whitney (1947) sowie Wilcoxon (1945) entwickelt. Der Test dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung

zweier Verteilungen, also ob zwei unabhängige Verteilungen A und B (zum Beispiel eine unbeeinflusste und eine beeinflusste) zu derselben Grundgesamtheit gehören. Der Mann-Whitney-Test gehört zu den stärksten Tests, um einen Zusammenhang zwischen zweistufigen nominalskalierten Variablen zu testen. Man hat 2 Stichproben vor sich, Stichprobe A mit n_1 Werten und Stichprobe B mit n_2 Werten. Man vergleicht jeden Wert der Stichprobe A mit jedem Wert der Stichprobe B. Es gibt also Vergleiche. Die Nullhypothese $H(0)$ besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den Verteilungen gibt, d. h. $A = B$. Der Test funktioniert einseitig oder zweiseitig. Beim einseitigen Test wird geprüft, ob $A > B$ bzw. $A < B$ ist, beim zweiseitigen Test wird geprüft, ob $A = B$ ist.

Die **False Discovery Rate (FDR)** ist ein junges Fehlerkontrollkriterium in multiplen Testsituationen. Sie wird insbesondere in Anwendungsgebieten der explorativen Datenanalyse und bei Vorliegen von sehr grossen Hypothesensystemen immer populärer. Diese statistische Evaluationsmethode findet in Genom, RNA-/Microarray Analysen und Proteomanalysen zunehmend Anwendung, um Expressionsunterschiede großer Datensätzen zu evaluieren.

Die Theorie und Anwendung der FDR hat sich in kurzer Zeit zu einem bedeutsamen Forschungsgebiet entwickelt. Die FDR, die von Benjamini und Hochberg erstmals 1995 beschrieben wurde, ist eine relativ neue statistische Strategie, um den Fehler in verschiedenen vergleichenden Berechnungen zu ermitteln¹²⁷. Die FDR ist der erwartete Anteil falscher Werte innerhalb einer Werteserie und in der Lage, die echten Unterschiede in Wertegruppen herauszuarbeiten. Werte werden als statistisch relevant angesehen, wenn die FDR unter 10% liegt.

In dieser Arbeit wurden die Proteinexpressionswerte (Densitätsniveaus) zwischen Normalgewebe, Polypen und Tumoren separat für sporadische und FAP Fälle verglichen. Die Analyse wurde auf solche Proteine limitiert, die in allen Gelen vorhanden waren. Die Proteindensitätswerte wurden für alle Berechnungen log-transformiert. Die p-Werte wurden für die Subentitäten adaptiert, indem sie in eine „False Discovery Rate“ (FDR) transformiert wurden. Die Expressionsunterschiede wurden als signifikant definiert, wenn die FDR unter 10% lag.

Die „**Principal Component Analysis**“ (PCA) (Hauptkomponentenanalyse) ist ein Verfahren der multivariaten Statistik und hilft, unterschiedliche Merkmale großer Datenmengen zu identifizieren. Sie dient dazu, umfangreiche Datensätze zu

strukturieren, zu vereinfachen bzw. zu veranschaulichen, indem eine Mehrzahl statistischer Variablen durch eine geringere Zahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen (Hauptkomponenten) genähert wird. Geometrisch interpretiert wird diejenige Basis gewählt, bei welcher die Summe der Abstände zu den Datenpunkten minimal wird. Dies erfolgt durch das Herausfinden von zwei bis drei linearen Komponenten der ursprünglichen Merkmale, die am besten die Variation in den Daten zusammenfassen. Wenn ein Großteil der Variationen durch diese bedeutenden Komponenten erfasst wird, können aus diesen Daten einzelne Gruppen mit spezifischen Eigenschaften festgestellt werden.

Der **Korrelationskoeffizient** ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs (Zusammenhangsmaße) zwischen zwei intervallskalierten Merkmalen. Er kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Bei einem Wert von $+1$ (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert 0 aufweist, hängen die beiden Merkmale überhaupt nicht voneinander ab.).

3.4. Massenspektrometrische Identifikation

Die Proteine, die statistisch signifikante Regulationsunterschiede aufwiesen und von biologischer Relevanz schienen, wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert. Hierzu war zunächst die Fragmentierung dieser Proteine nötig. Zur Digestion solcher Polypeptide wurde Trypsin angewandt. Dies spaltet ein Peptid spezifisch bei Arg-X und Lys-X Bindungen. Es wurde darauf geachtet, eine Trypsinpräparation zu verwenden, die keine chymotryptische Nebenaktivität besaß. Das pH-Optimum von Trypsin liegt zwischen 7.0 und 9.0 . Definierte gefärbte Proteinspots wurden mit Hilfe des "spot pickers" der Fa. Bio-Rad aus speziell zur Identifikation angefertigten präparativen Gelen (Gele mit Proteinloads bis zu 1mg Protein/ Gel) herausgeschnitten. Mit dem MassPREP robotic protein handling System (Micromass) wurden die Polypeptide fragmentiert ¹²⁶. Die Gelstücke wurden durch zweimaliges Waschen mit $100\mu\text{l } 50\text{mM}$ Ammoniumbicarbonat (Ambic)/ 50% Acetonitril bei 40 Grad für zehn Minuten entfärbt. Zur Reduktion wurden die Gele dann für 30 Minuten in $10\text{mM DTT} / 100\text{mM Ambic}$ gebadet und im Anschluss mit $55\text{mM} / 100\text{mM Ambic}$ für 20

Minuten alkyliert. Trypsin wurde hinzugegeben und die Lösung wurde für 4,5 h bei 40° C inkubiert. Die Peptide wurden nacheinander mit 30µl 5% Formic Acid / 2% Acetonitril und 24µl 2,5% Formic Acid / 50% Acetonitril extrahiert. Das Acetonitril verdunstete über Nacht. Zur „electrospray (ES) ionization“ MS/MS wurden die extrahierten Peptide mit C18 ZipTips (Millipore) entsalzt und jeweils zweimal mit 10µl 70% Acetonitril / 0,1% Trifluoressigsäure (TFA), 10µl 50% Acetonitril / 0,1% TFA und 10µl 0,1% TFA equilibriert. Die Proben wurden durch Pipettieren auf den ZipTip aufgetragen. Es folgte ein weiteres zweimaliges Waschen mit 10µl 0,1% TFA. Die Reste des Trypsins wurden mit 60% Acetonitril / 1% Essigsäure ausgewaschen.

Die Proteinproben, die nur in kleinen Mengen vorlagen, wurden mit der Gyrolab MALDI SP1 Workstation (Gyros AB, Uppsala Sweden) analysiert (Abb.17).

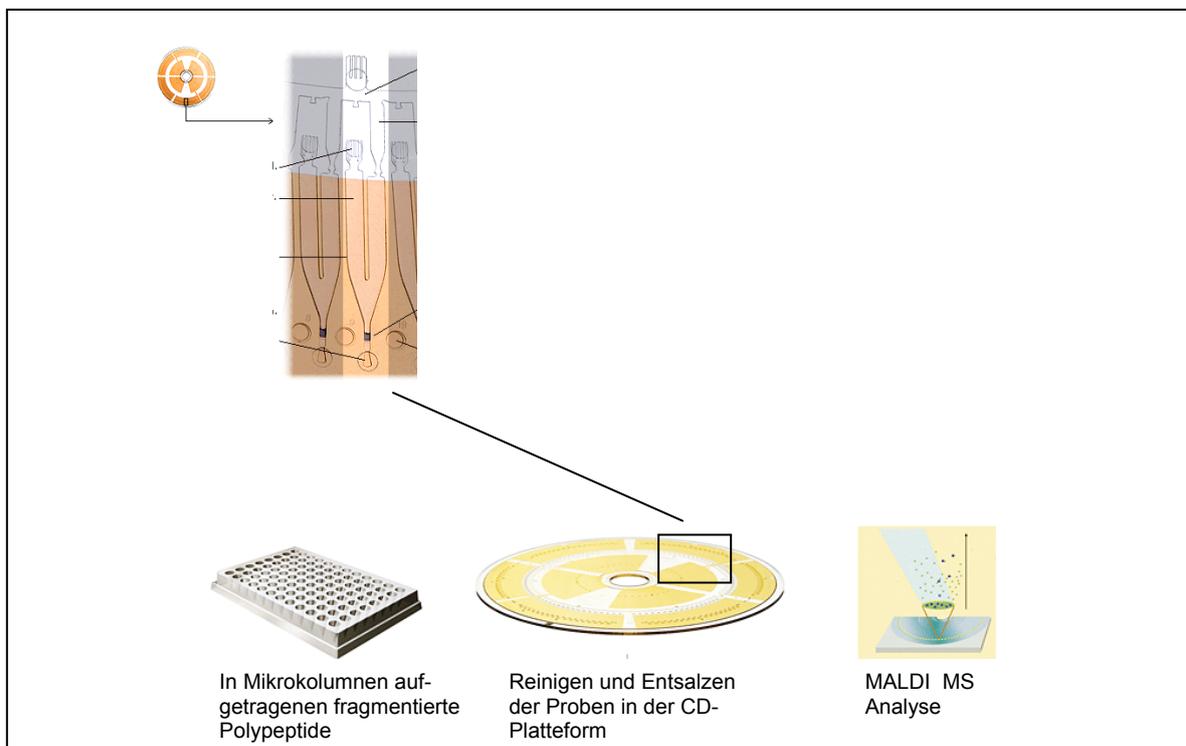


Abb.17: Gyrolab MALDI SP1 Workstation (Gyros AB, Uppsala Sweden)

Eine „96 microcolumnes plate“ wurde auf eine CD-Plattform aufgebracht und es erfolgte das Entsalzen mittels „reverse phase“ Chromatographie. In den Mikrokolumnen war 50%iges Acetonitril in Wasser gelöst. Die Proben wurden auf die Mikrokolumnen aufgetragen, und die Lösung wurde durch Zentrifugieren weiterbefördert. Die „washing solution“ (200nl 0,1% TFA) wurde entfernt. Die Peptide wurde mittels einer Lösung aus 1mg/ml alpha-cyano-4-hydroxycinamid

Säure Matrix / 200nl 50% Acetonitril herausgewaschen. Die Peptid/Matrix wurde kristallisiert. Für die „on-CD“ MALDI Analyse wurde die CD halbiert und in den Ladeschacht des MALDI Instrumentes eingespeist.

Die gewonnenen tryptischen Fragmente wurden mittels „matrix-assisted laser desorption ionization“ (MALDI) Massenspektrometrie (Voyager DE-Pro; Applied Biosystem) analysiert. Die Proben für die ES Analyse wurden mittels „gold coated nano-ES“ Nadeln (Protana) aufgetragen. Eine kapilläre Spannung von 800-1000V mit gemeinsamer Kegelspannung von 40-45V und einer Kollisionsenergie von 4,2eV wurde appliziert. Das Probenaaerosol wurde Stickstoff gelöst. Während der „collision-induced dissociation“ (CID) war die Kollisionsenergie in einem Bereich von 15-30eV mittels Argon und Kollisionsgas.

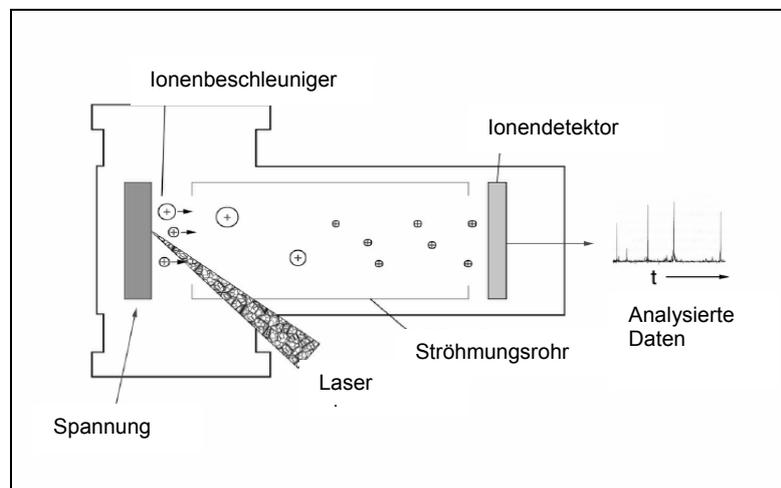


Abb.18: Schematischer Aufbau einer MALDI-TOF Massenspektrometrieinheit

Bei unklarer Proteinidentität oder in Fällen noch unbekannter Proteine kann durch „ES ionization quadrupole time-of-flight (Q-TOF) tandem MS (Micromass)“ zur Sequenzierung die Identität ermittelt werden (Abb.18). Durch das MS-Fit Suchprogramm (<http://prospector.ucsf.edu/>) konnten die entsprechenden Identitätsergebnisse gefunden und benannt werden. Nur solche Proteinidentitäten wurden als valide erachtet, die eine mindestens dreifach „gematchte“ Peptidmasse aufwiesen. Gleichzeitig mussten die Proteine menschlichen Ursprungs sein. Die theoretischen pI- und Massewerte durften nicht exzessiv von der Proteinlokalisierung im 2-DE Gel abweichen.

4. Ergebnisse

4.1. Histologie:

Alle in dieser Studie untersuchten Proben wurden mit Hilfe eines Pathologen an H&E gefärbten Schnitten kontrolliert. Die histopathologische Klassifikation erfolgte nach den WHO Kriterien (TNM Klassifikation, UICC – Stadium). Bei der mikroskopischen Untersuchung der gesunden Mukosaschnitte konnte weder bei SKRK noch bei FAP eine intraepitheliale Neoplasie festgestellt werden. Darüber hinaus wurde die Repräsentativität der mit der Franzén Technik gewonnenen Zellen an einem Giemsa Ausstrichpräparat überprüft. Ausschließlich solche Gewebeproben wurden analysiert, in denen mehr als 90% Mukosa-, Adenom- bzw. Karzinom- respektive Metastasenzellen zu sehen waren. Normalschleimhaut, Polypen, Karzinome und Lebermetastasen wurden anhand Größe, Infiltrationstiefe, Lymphknotenstatus und Differenzierungsgrad klassifiziert.

4.2. Proteinexpression in der Genese und Progression des sporadischen kolorektalen Karzinoms

Kolon-Gewebeproben von verschiedenen histologischen Subtypen (N = Normalschleimhaut, P = Adenom bzw. Polyp, C = Karzinom, M = Metastase) sind durch 2-D Gelelektrophorese, PDQuest Evaluation und Principle Component Analyse an 15 Patienten mit einem sporadischen Adenokarzinom analysiert worden. Die klinischen Daten und histopathologischen Diagnosen sind in der folgenden Tabelle abgebildet (Tab.3).

Alle acht Polypen waren als gestielte tubuläre Adenome klassifiziert. Sie fanden sich im resezierten Kolonabschnitt und konnten so für die Untersuchung vom gleichen Patienten gewonnen werden. Sämtliche Polypen hatten einen maximalen Durchmesser unter 1cm. Zwei dieser Polypen zeigten eine „high-grade“ Neoplasie. Bei den übrigen sechs Proben wurde eine „low-grade“ Neoplasie diagnostiziert.

Probe					Patient		
	Normal	Adenom	Karzinom	Metastase	Geschlecht	Alter	TNM Stadium
1			CR64T	CR65M	M	76	T3N2M1
2	CR95N		CR94T	CR96M	M	81	T3N2M1
3	CR98N		CR97T		F	78	T3N1Mx
4	CR107N	CR105P	CR106T		F	71	T3N0Mx
5	CR125N		CR124T		F	65	T3N2Mx
6	CR132N		CR131T		M	59	T3N1Mx
7	CR135N	CR133P	CR134T		M	77	T4N1Mx
8	CR139N	CR138P*	CR137T1		M	78	T4N1Mx
9	CR149N	CR150P	CR136T2		M	60	T3N0Mx
10	CR152N		CR148T		F	71	T3N0Mx
11	CR158N		CR151T		M	76	T3N1Mx
12	CR160N		CR157T		F	75	T4N1Mx
13	CR164N	CR162P1	CR159T		M	61	T3N0Mx
14	CR174N	CR163P2*	CR161T		M	74	T3N1Mx
15	CR211N	CR173P CR210P	CR172T CR209T		M	76	T3N1Mx

Tab.3: *N: gesunde Mukosa, P: Polyp, T: Karzinom, M: Metastase (Leber) von 15 Patienten. Verschlüsselt wurden sie mit CR (Colorectum), dann die fortlaufende Probennummer und Entität (N, P, T, M). Die TNM Klassifikation erfolgte gemäß WHO Kriterien. Die mit einem Stern* markierten Polypen zeigen eine „high grade“ Neoplasie und waren aneuploid.*

4.2.1. Test der Probenheterogenität bei sporadischen Tumor- und Metastasenproben

Um die Heterogenität innerhalb der Proben zu evaluieren, wurden zwei Karzinomproben (CR97T und CR151T) und zwei Metastasenproben (CR69M und CR 175M) willkürlich gewählt. Aus den Gewebestücken wurde jeweils Zellmaterial aus unterschiedlichen Regionen der jeweiligen Neoplasie asserviert (Proben A und B) und zur 2-DE Elektrophorese vorbereitet. Gele wurden angefertigt und ein Matchset erstellt. Hiernach wurden die Gele bezüglich ihrer intratumoralen und intertumoralen Heterogenität analysiert. Mehr als 93% aller Proteinspots konnten zwischen den Proben aus unterschiedlichen Tumor-/Metastasenarealen gematcht werden. Die intratumorale Heterogenitätsanalyse ergab einen durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten (s. P. 3.3.4) der Karzinomproben von 0.86. Der intratumorale Korrelationskoeffizient bei den Metastasen lag bei 0.80. Der

Korrelationskoeffizient ist hierbei ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen den beiden untersuchten Proben, was die hohe intratumorale Homogenität innerhalb der Tumore respektive der Metastasen reflektiert. In Abbildung 19 ist die Korrelation zwischen den Tumorproben CR 97T A und B exemplarisch dargestellt.

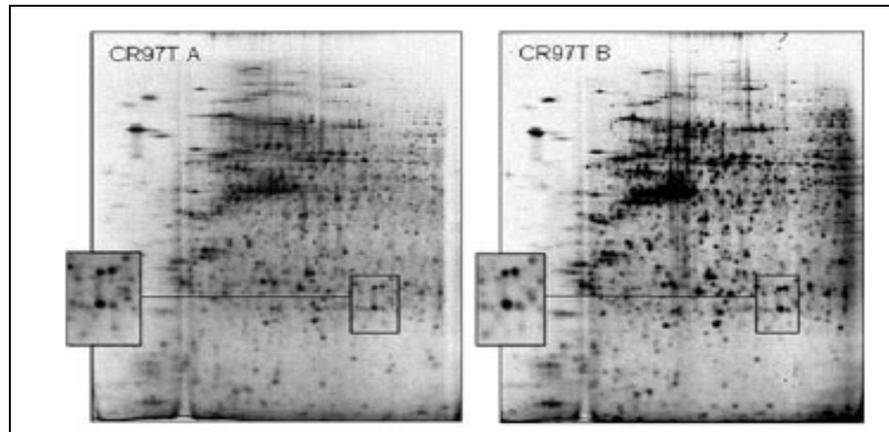


Abb.19: Vergleich zweier Proben (CR97T , A und B) unterschiedlicher Bereiche in einem Karzinom. Die Ausschnitte demonstrieren die Homogenität innerhalb des Karzinoms

Bei der paarweisen Analyse der Karzinome untereinander (intertumorale Heterogenität) ergab sich ein Korrelationskoeffizient von durchschnittlich 0.70 (0.58 – 0.73). Für die paarweise Analyse der Metastasen war der Koeffizient 0.57 (0.51 – 0.61).

4.2.2. Principle Component Analyse (PCA)

Um sogenannte „Outliers“ identifizieren zu können, wurde als erster analytischer Schritt eine PCA des ungefilterten Matchsetgesamt-Datensatzes durchgeführt. Die Daten wurden in das Softwarepackage „Spotfire“ eingelesen und analysiert. Mittels dieser multivariaten Analyse konnte das Verhältnis („Gleichheit“ und „Verschiedenheit“) aller histopathologischer Subtypen in einem dreidimensionalen PCA Blot graphisch dargestellt werden (Abb.20).

Das Diagramm zeigt ein enges Cluster der normalen Schleimhautproben (grün), was für eine hohe inter- und intraindividuelle Homogenität der Normalschleimhautproben spricht. In räumlicher Nähe clustern sechs Proben der benignen Polypen (gelb). Zwei weitere Polypen zeigen jedoch eine Nähe zum

Karzinomcluster (blau). Eine eingehende histopathologische Präparataufarbeitung dieser beiden Proben konnte jedoch kein Karzinom diagnostizieren. Im Gegensatz zu den sechs anderen Polypenproben mit „low-grade“ Neoplasie konnten bei diesen beiden eine „high-grade“ Neoplasie festgestellt werden. In einer Ploidieanalyse aller Polypenproben zeigte sich, dass sechs der Polypen die vermutete Euploidie aufwiesen. Beide Polypen mit „high-grade“ Neoplasie zeigten wie alle Malignomproben ein aneuploides DNA Verteilungsmuster. Die Karzinome erscheinen auf dem PCA Diagramm als weite Gruppierungen, ohne räumliche Verbindung zu den anderen Subtypen. Ebenso verhält es sich mit den Lebermetastasen (rot).

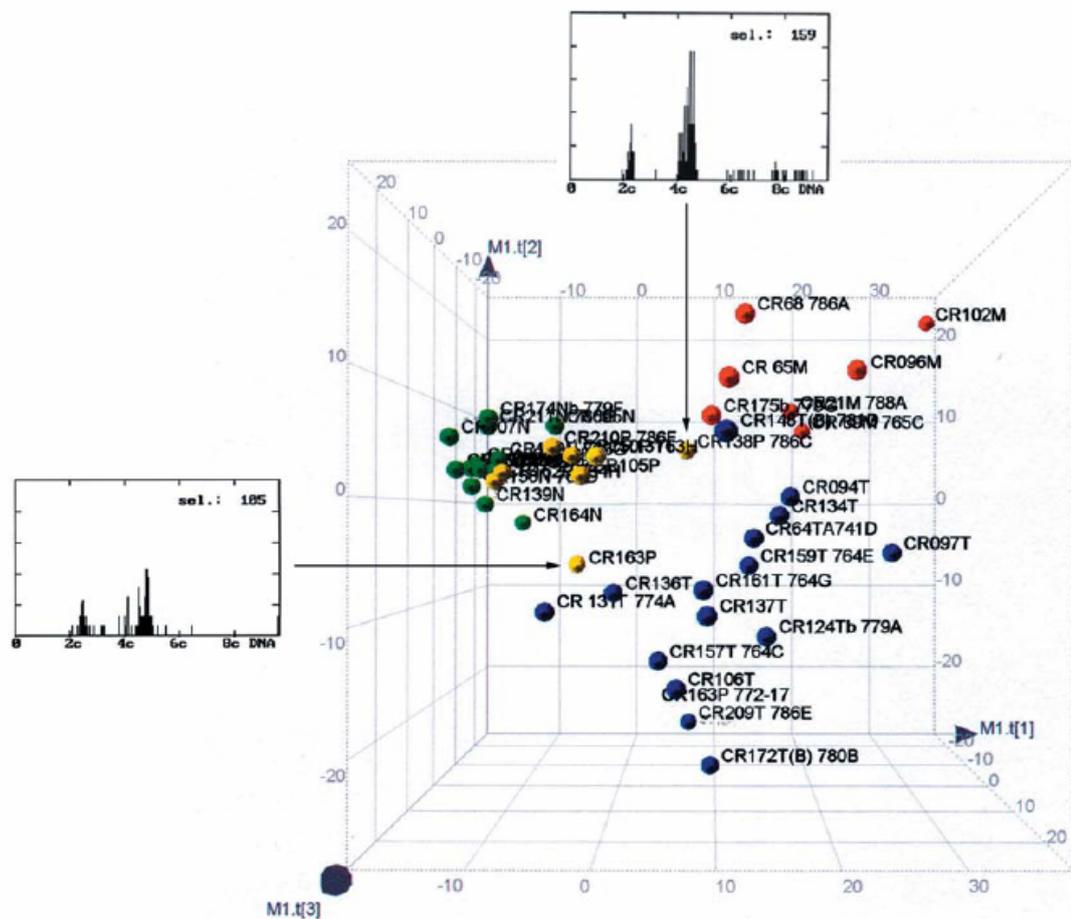


Abb.20: PCA Plot des ungefilterten Matchset-Datensatzes (jeder „Kugel“ liegt die Information von etwa 1700 Proteinspots zugrunde). Normalmukosa grün, Polyp gelb, Karzinom blau und Metastase rot. Die Pfeile zeigen die beiden „high grade“

Polypen, welche als Ausreißer eher den Tumoren zugeordnet sind mit ihren DNA Histogrammen.

4.2.3. Identifikation dysregulierter Proteine beim Vergleich Mukosa, Polyp versus Karzinom und Metastase

Durchschnittlich konnten 1675 Proteinspots (1543 – 1866 Spots pro Gel) separiert werden. Nach erfolgtem „Matching“ aller Gele galt das besondere Interesse denjenigen Proteinen, die signifikant in ihrer Expressionsintensität hoch- bzw. herunterreguliert waren (Abb.21).

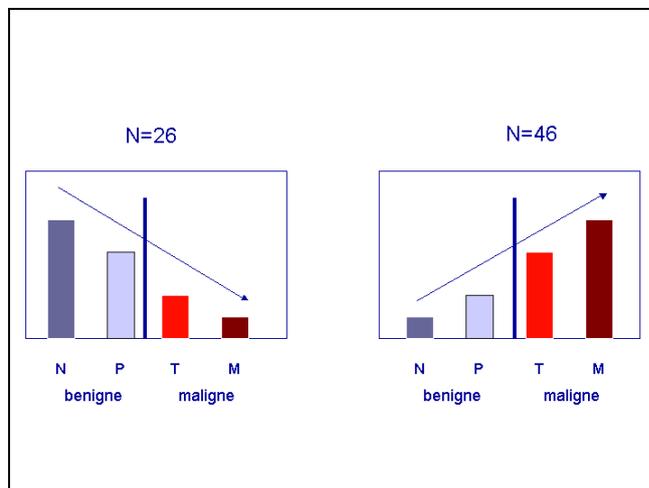


Abb.21: Dysregulierte Proteine (n=112); Identifikation von 72 Proteinen. 26 Proteine wurden im Vergleich Mukosa bis zur Metastase herunterreguliert, 46 Proteine heraufreguliert.

Spot	Protein	SPDB	Mass	pI	Coverage	MS/MS
1	keratin, type II cytoskeletal 7	P08729	51	5.5	18	
2	keratin, type I cytoskeletal 18	O75575	48	5.3	12	
3	tropomyosin 1 alpha chain	P09493	33	4.7	22	
4	tropomyosin 1 alpha chain	P09493	33	4.7	30	
5	reticulocalbin 1 precursor	P08729	39	4.9	29	
6	cytochrome b5	O43169	81	4.8	27	13–24
7	keratin, type I cytoskeletal 19	P08727	44	5	28	
8	keratin, type II cytoskeletal 7	P08729	51	5.5	24	
9	actin, cytoplasmic 1	P02570	42	5.3	27	
10	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase	P09543	48	9.2	14	
11	serum albumin precursor	P02768	69	5.9	26	
12	annexin V	P08758	36	4.9	40	227–244
13	actin, cytoplasmic 2	P02571	42	5.3	25	
14	protein disulfide isomerase	P07237	57	4.8	21	
15	keratin, type I cytoskeletal 19	P08727	44	5	56	
16	endoplasmin precursor	P14625	32	4.8	24	

Spot	Protein	SPDB	Mass	pI	Coverage	MS/MS
17	keratin, type I cytoskeletal 19	P08727	44	5	57	
18	keratin, type I cytoskeletal 19	P08727	44	5	35	
19	keratin, type I cytoskeletal 19	P08727	44	5	36	
20	ATP synthase beta chain	P06576	57	5.3	30	
21	class I beta-tubulin	P09203	50	4.8	20	
22	class I beta-tubulin	P09203	50	4.8	20	
23	keratin, type I cytoskeletal 18	P05783	48	5.3	27	
24	vimentin	P08670	54	5.1	39	
25	ATP synthase D chain	O75947	18	5.2	51	123–143
26	keratin, type I cytoskeletal 19	P08727	44	5	56	
27	actin, cytoplasmic 1	P02570	42	5.3	26	
28	actin, cytoplasmic 1	P02570	42	5.3	20	
29	keratin, type II cytoskeletal 8	P05787	54	5.3	27	
30	endoplasmic precursor	P14625	32	4.8	18	
31	heat shock cognate 71 kDa	P11142	71	5.4	17	
32	prohibitin	P35232	30	5.6	31	106–117
33	actin, cytoplasmic 2	P02571	42	5.3	22	
34	F-actin capping protein alpha-1 subunit	P52907	33	5.4	39	38–47
35	tubulin alpha-6/1 chain	Q9BQE3	50	5	27	65–79
36	78-kDa glucose-regulated protein precursor	P11021	72	5.1	30	
37	actin, cytoplasmic 1	P02570	42	5.3	25	
38	keratin, type II cytoskeletal 8	P05787	54	5.5	35	
39	keratin, type I cytoskeletal 18	P05783	48	5.3	28	
40	keratin, type II cytoskeletal 8	P05787	54	5.5	46	
41	CYPIA/PAPS synthetase-2	O95340	70	8.2	11	
42	keratin, type II cytoskeletal 8	P05787	54	5.5	39	
43	keratin, type I cytoskeletal 20	P35900	48	5.5	49	
44	lamin B2	Q03252	68	5.3	46	
45	60-kDa heat shock protein	P10809	61	5.7	30	182–493 + 430–446
46	5-lipoxygenase	P09917	78	5.5	17	
47	actin, cytoplasmic 1	P02570	42	5.3	15	
48	putative ATP-dependent Clp protease	Q16740	30	8.3	33	215–226
49	tubulin alpha-6 chain	Q9BQE3	50	5	10	65–79
50	actin, cytoplasmic 2	P02571	42	5.3	26	
51	actin, cytoplasmic 1	P02570	42	5.3	25	
52	actin, cytoplasmic 2	P02570	42	5.3	34	
53	serum albumin precursor	P02768	69	5.9	26	
54	serum albumin precursor	P02768	69	5.9	42	
55	heat shock 27 kDa	P04792	23	6	51	28–37
56	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase	P42126	39	8.8	21	271–283
57	T-complex protein 1, beta subunit	P78371	57	6	23	
58	DnaJ homolog subfamily B member 11	Q9UBS4	41	5.8	32	207–217
59	DnaJ homolog subfamily A member 2	Q60884	46	6.1	28	
60	hepatocellular carcinoma-associated antigen 66	Q9NYH9	70	7.2	21	
61	keratin, type II cytoskeletal 7	P08729	51	5.5	13	
62	proliferation-associated protein 2G4	Q9UQ80	44	6.1	37	333–344
63	succinate dehydrogenase	P31040	73	7.1	16	
64	elongation factor 1-delta	P29692	31	4.9		
65	heat shock cognate 71-kDa protein	P11142	71	5.4		
66	26s protease regulatory subunit	Q03527	49	5.7		
67	heat shock cognate 71-kDa protein	P11142	71	5.4		
68	glucose-regulated protein precursor	P11021	72	5.1		
69	eucaryotic translation initiation factor	O95065	50	5.8		
70	vimentin	P08670	54	5.1		
71	heat shock cognate 71-kDa protein	P11142	71	5.4		
72	ezrin (P81) cytovillin	P15311	70	6		

Tab.: 4: Daten der 72 identifizierten Proteinspots. Neben dem Proteinnamen ist der SwissProt Data Base Code (SPDB), das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt gelistet. 63 Proteine konnten durch MALDI identifiziert werden, 13 mittels Q-TOF tandem MS (MS/MS). Protein 64 bis 72 wurde durch Gel zu Gel matching identifiziert.

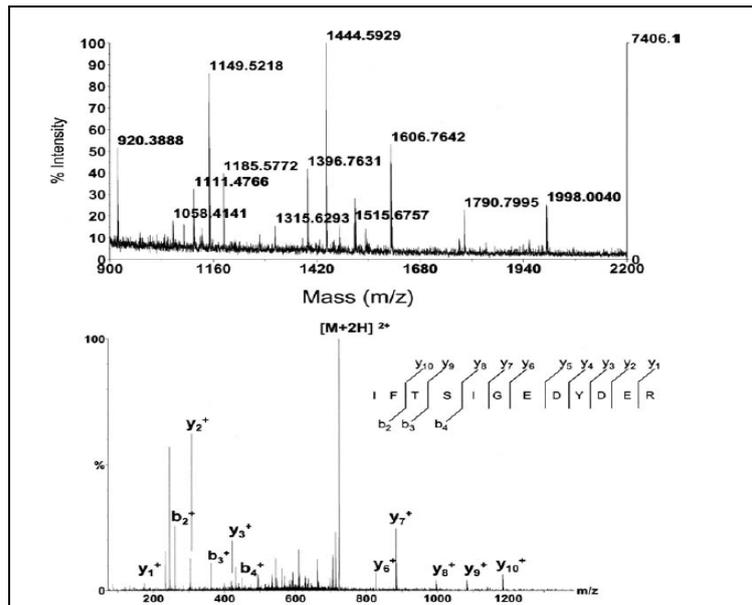


Abb.22 a+b: Massenspektrometrische Identifikation von Spot 32 (s. Tab.4). Das MALDI Spektrum ergab in der Datenbankanalyse die Identität des Proteins „Prohibitin“. Die MS/MS Evaluation der m/z Ratio konnte mittels „peptide mass fingerprinting“ das MALDI Ergebnis bestätigen.

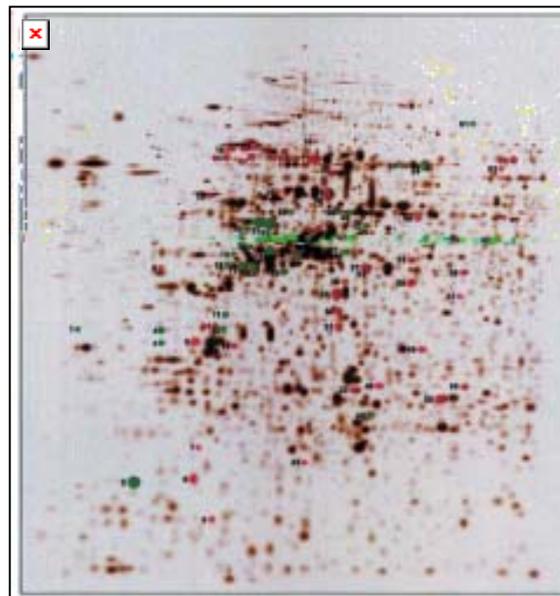


Abb.23: 2-DE Gel mit allen identifizierten Proteinspots. Grün sind die Proteine markiert, die in den benignen Subentitäten signifikant höher reguliert sind. Umgekehrt sind alle in den Malignomen höher exprimierten Proteine rot markiert. Wenige der Proteinspots zeigen vom pI abweichende Positionen, die als posttranslationale Modifikation zu sehen sind.

Durch quantitative PDQuest Analyse wurden insgesamt 112 Proteinspots definiert die statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test) im Vergleich benigne vs. maligne mindestens zweifach hoch- oder herunterreguliert waren.

Zur Spotidentifikation wurden präparative Gele angefertigt. Auf solche Gele wird bis zu 1g Proteinmix aufgetragen um möglichst viel Protein pro Spot für die Massenspektrometrie gewinnen zu können. Insgesamt 72 Spots konnten herausgeschnitten und mittels MALDI und/ oder MS/MS Massenspektrometrie identifiziert werden. Alle identifizierten silbergefärbten Proteine sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Diese Tabelle beinhaltet die „sequence coverage“ eines jeden Spots. Abbildung 22 a + b zeigt exemplarisch die Identifikation von Spot 32 durch MALDI Massenspektrometrie.

Insgesamt wurden 72 Proteine statistisch ermittelt, die ein signifikant unterschiedliches Proteinexpressionsmuster bei der Entstehung eines Karzinoms aus der Mukosa zeigten. Die 26 identifizierten Proteine (grün), die in Mukosa und Polypen höher exprimiert waren, sowie die 46 Proteine (rot), die in den Karzinomen und in den Metastasen höher exprimiert waren, sind farblich in Abbildung 23 dargestellt.

4.3. Vergleich der Proteinexpression des sKRK zur FAP

Die klinischen Daten und histopathologischen Diagnosen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Alle kolorektalen Karzinome wurden als Adenokarzinome klassifiziert. Die acht „sporadischen“ Polypen und sämtliche Polypen FAP Erkrankter waren gestielte tubuläre Adenome. Die normale Schleimhaut aller Resektate ist aus makroskopisch gesunden Arealen entnommen worden. Insgesamt sind 48 Proben (25x FAP, 23x sKRK) von 15 verschiedenen Patienten (8 x FAP, 7 x sKRK) untersucht und analysiert worden.

Probe				Patient		
	Normal	Adenom	Tumor	Geschlecht	Alter	TNM Stadium
Sporadisch						
1	CR107N	CR105P	CR106T	F	71	T3N0Mx
2	CR135N	CR133P	CR134T	M	77	T4N1Mx
3	CR139N	CR138P	CR137T1, CR136T2	M	78	T4N1Mx
4	CR149N	CR150P	CR148T	M	60	T3N0Mx
5	CR164N	CR162P1, CR163P2	CR161T	M	61	T3N0Mx
6	CR174N	CR173P	CR172T	M	74	T3N1Mx
7	CR211N	CR210P	CR209T	M	76	T3N1Mx
FAP						
1	FAP1N	FAP1P		M	30	
2	FAP2N	FAP2P1, FAP2P2		F	32	
3	FAP3N	FAP3P1, FAP3P2		M	34	
4	FAP5N	FAP5P1, FAP5P2, FAP5P3		F	22	
5	FAP6N	FAP6P1, FAP6P2, FAP6P3		M	36	
6	FAP7N	FAP7P		M	31	
7	FAP8N	FAP8P	FAP8T1, FAP8T2	M	45	T3N0Mx, T3N0Mx
8	FAP9N	FAP9P	FAP9T	F	29	T3N0Mx

Tab.5: *N: Normalmukosa, P: Polyp, T: Karzinom von insgesamt 15 Patienten (7x sKRK, 8xFAP). Nummeriert wurden sie mit CR (Colorectum) sowie FAP, dann die fortlaufende Probennummer und Entität (N, P, T, M). Des weiteren Geschlecht, Alter und TNM-Klassifikation gemäß WHO Kriterien.*

4.3.1. Quantitative Unterschiede innerhalb der verschiedenen Stadien der FAP und des sporadischen Karzinoms

Hier sind nur die Proteinspots analysiert worden, die in allen Gelen des Matchsets präsent waren. Die Densitätswerte jedes Proteinspots wurden in logarithmische Form umgewandelt, berechnet und verglichen. Dieser logarithmisch berechnete Densitätswert jedes Proteinspots für das jeweilige Stadium der Erkrankung wurde durch Umformen in die False Discovery Rate (FDR) angepasst. Informationen zur FDR wurden ausführlich von Benjamini et al beschrieben ¹²⁷. Proteine wurden als eventuelle Markerkandidaten betrachtet, wenn sie eine FDR unter 10% aufwiesen. In den sporadischen Gewebeproben sind 18 Proteine gefunden worden, die eine FDR unter 10% hatten. Beim FAP Karzinom konnten zwei Proteine mit einer FDR unter 10% nachgewiesen werden.

4.3.1.1. Quantitative Unterschiede im Vergleich zwischen normaler Schleimhaut der FAP und dem sporadischen Karzinom

In der vorliegenden Arbeit sind 280 Proteine detektiert worden, die in allen normalen Schleimhautproben der FAP Resektate als auch in der Normalmukosa des sKRK vorkamen. Von diesen haben 17 eine FDR unter 10%. Abbildung 24 zeigt exemplarisch sechs Beispiele.

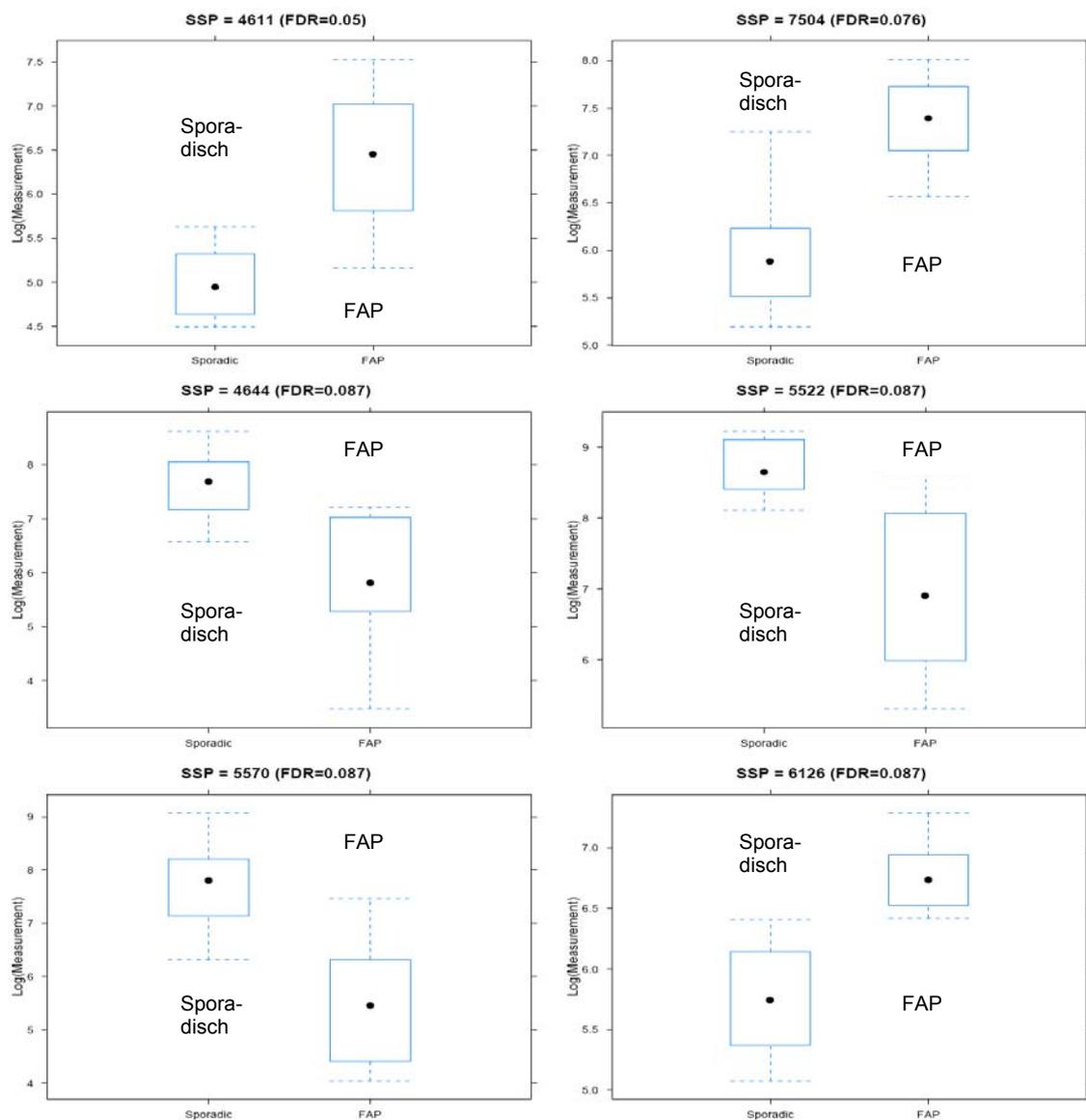


Abb.24: Signifikante, quantitative Unterschiede zwischen der normalen FAP-Mukosa und der normalen sporadischen Mukosa, gemessen anhand der FDR <10%.

4.3.2. Qualitative Unterschiede zwischen der FAP und dem sporadischen Karzinom

Die qualitative Analyse zeigt solche Proteinspots, die lediglich in einer der beiden Gruppen (FAP vs. sporadisches KRC) detektiert werden konnten. Hierfür wurden Heatmaps erstellt, die das Vorhandensein bzw. nicht Vorhandensein jedes Proteins graphisch zeigen. Auf der Ordinate der Heatmap wird jedes einzelne Protein durch einen schmalen Balken dargestellt.

4.3.2.1. Normale Schleimhaut

Die folgende Abbildung zeigt, dass bereits auf Normalschleimhaut-Niveau die FAP von den sporadischen Karzinomen einfach und sicher unterschieden werden kann (Abb. 25).

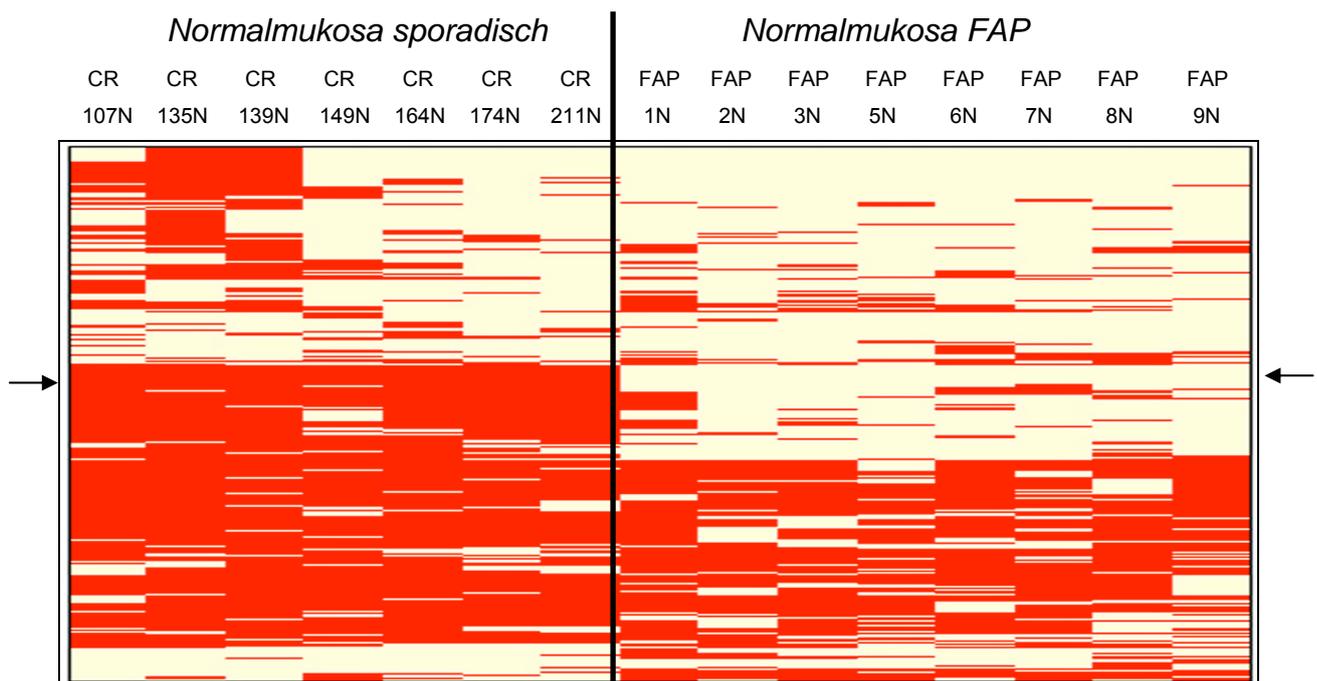


Abb. 25: Heatmap - Qualitative Unterschiede zwischen sporadischer Normalmukosa (7 Banden = 7 Patienten) und normaler FAP-Mukosa (8 Banden = 8 Patienten) (Abszisse). Auf der Ordinate wird jedes einzelne Protein als schmaler Balken farblich als vorhanden (hell) oder nicht vorhanden (dunkel) dargestellt.

Von besonderem Interesse waren Proteine, die in sämtlichen Normalschleimhaut-FAP Proben vorhanden waren und in keinem der sporadischen Normalproben nachgewiesen wurden, sowie umgekehrt. Sie sind in Abb. 25 mit Pfeilen markiert. Um nun diejenigen Proteine zu definieren, die exklusiv in einer Gruppe von Normalgewebeproben (FAP vs. sKRK) vorhanden waren (potentielle Markerproteine), wurde das Vorhandensein bzw. nicht Vorhandensein eines jeden Proteins mittels Fischer's Exact Test errechnet und in eine Tabellenform (Tab.6) gebracht.

Hieraus ergab sich, dass 47 Proteine in der normalen Schleimhaut der FAP immer vorhanden waren und nie in der normalen Schleimhaut der sporadischen Proben detektiert wurden. Abbildung 26 zeigt den Boxplot der logarithmisierten Werte für die 47 Proteine, sortiert nach Mittelwert (MW).

Protein	MW	Varkoef.	Protein	Mean	Varkoef	Protein	Mean	Varkoef
4564	8,14	0,05	7453	5,6	0,14	7443	4,79	0,19
4817	6,72	0,14	7558	5,39	0,14	3768	4,71	0,1
8634	6,57	0,11	3730	5,38	0,15	4815	4,68	0,28
1633	6,4	0,17	6562	5,36	0,15	2620	4,63	0,25
3879	6,37	0,13	4830	5,36	0,32	7325	4,32	0,2
3881	6,36	0,14	5829	5,29	0,19	5708	4,31	0,13
3854	6,29	0,18	9606	5,27	0,1	7612	4,14	0,2
3878	6,19	0,1	3736	5,23	0,1	7458	4,12	0,27
5832	6,15	0,13	8632	5,14	0,12	3322	4,02	0,25
8523	6,14	0,18	8625	5,1	0,08	6344	3,92	0,19
8627	5,88	0,12	8644	5,02	0,19	5448	3,9	0,31
6756	5,88	0,2	4827	4,96	0,16	5122	3,33	0,45
4725	5,79	0,14	4622	4,89	0,3	7158	3,32	0,37
4833	5,78	0,28	5529	4,89	0,16	8425	3,06	0,59
5630	5,62	0,13	3722	4,86	0,29			

Tab.6: In der ersten Spalte findet sich die Proteinnummer (SSP Nummer), es folgt die durchschnittliche log. Densitätsmessung des spezifischen Proteins und der jeweilige Korrelationskoeffizient. Alle diese Proteine wurden exklusiv in der normalen Mukosa der FAP Proben definiert.

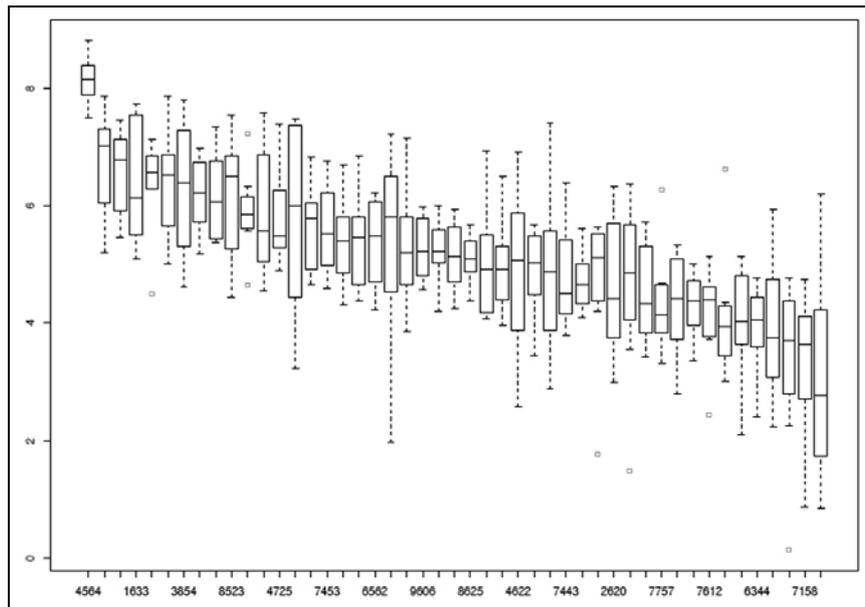


Abb. 26: *Boxplot-Darstellung der 47 Proteine, die exklusiv in der Normalschleimhaut der FAP exprimiert wurden. Die Ordinate entspricht dem jeweils errechneten log. Mittelwert, auf der Abszisse ist die jeweilige Proteinnummer (SSP) aufgelistet (s. Tab. 6).*

4.3.2.2. Polypen

Die gleiche Untersuchung der Polypen beider Gruppen ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 27).

Wiederum verdeutlicht die Heatmap, dass die sporadischen Polypen von den FAP Polypen durch das Vorhandensein bzw. nicht Vorhandensein verschiedener Proteine voneinander unterschieden werden können (s. Markierung durch Pfeile Abb. 27). Bei den Polypenproben haben wir 49 Proteine detektiert, die ausschließlich in den FAP Proben exprimiert wurden und ein Protein, welches exklusiv in allen sporadischen Proben, jedoch nie bei FAP zu sehen war. Diese sind in Tabelle 7 mit ihren SSP Nummern gelistet.

Abbildung 28 zeigt den Boxplot der Analyse FAP-Polyp vs. Polyp bei sKRC basierend auf den logarithmischen Proteindensitätsmessungen. Das blau markierte Protein ist das einzige spezifische Protein der sporadischen Proben.

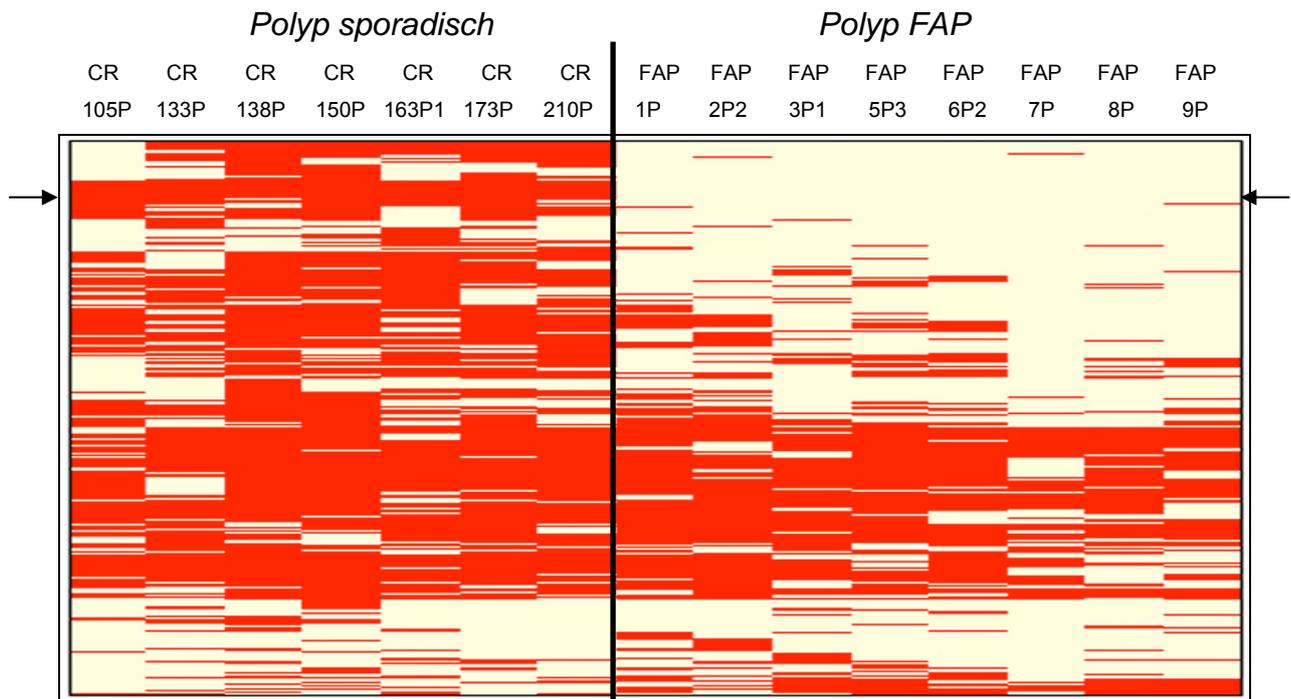


Abb. 27: Heatmap - Trennung aller sporadischen Polypen von den FAP Polypen aufgrund der unterschiedlichen Expressionsdaten. Auf der Ordinate wird jedes einzelne Protein als schmaler Balken farblich als vorhanden (hell) oder nicht vorhanden (dunkel) dargestellt.

SSP	MW.	Varkoeff	Vorhanden	SSP	MW.	Varkoeff	Vorhanden
6445	7,13	0,13	FAP	8305	5,21	0,16	FAP
3520	6,61	0,1	FAP	5718	5,11	0,08	FAP
7561	6,61	0,08	FAP	8132	5,08	0,18	Spor. KRK
6658	6,56	0,08	FAP	4622	5,08	0,28	FAP
3678	6,52	0,1	FAP	7539	5,01	0,24	FAP
6671	6,45	0,16	FAP	4254	4,98	0,11	FAP
8634	6,38	0,11	FAP	2351	4,98	0,34	FAP
7613	6,38	0,17	FAP	2254	4,97	0,23	FAP
5576	6,34	0,1	FAP	7460	4,96	0,29	FAP
2568	6,19	0,25	FAP	8324	4,84	0,43	FAP
6359	6,19	0,12	FAP	8344	4,72	0,3	FAP
6656	6,18	0,12	FAP	4258	4,64	0,35	FAP
5414	6,18	0,07	FAP	3442	4,55	0,21	FAP
3620	6,17	0,21	FAP	7544	4,52	0,23	FAP

1254	6,08	0,1	FAP	6431	4,31	0,18	FAP
6421	5,89	0,11	FAP	5259	4,26	0,17	FAP
5258	5,87	0,14	FAP	1047	4,16	0,1	FAP
5588	5,8	0,09	FAP	3023	4,06	0,35	FAP
4652	5,74	0,17	FAP	5139	4,02	0,39	FAP
4257	5,65	0,21	FAP	7160	3,99	0,11	FAP
6458	5,61	0,11	FAP	2010	3,86	0,36	FAP
3342	5,58	0,19	FAP	3114	3,72	0,23	FAP
4650	5,55	0,27	FAP	7444	3,63	0,38	FAP
1056	5,37	0,15	FAP	1067	3,61	0,57	FAP
5202	5,36	0,38	FAP				
4136	5,32	0,16	FAP				

Tab.7: In der ersten Spalte findet sich die Protein SSP-Nummer. Es folgt die durchschnittliche log. Densitätsmessung des identifizierten spezifischen Proteins und der jeweilige Variationskoeffizient. Ein Protein wurde in allen sKRK Proben, jedoch in keiner der FAP Polypen nachgewiesen.

Weiterhin ist auffällig, dass zwei Proteine (SSPs 4622 und 8634) sowohl in der normalen Schleimhaut als auch in den Polypen der FAP gefunden wurden.

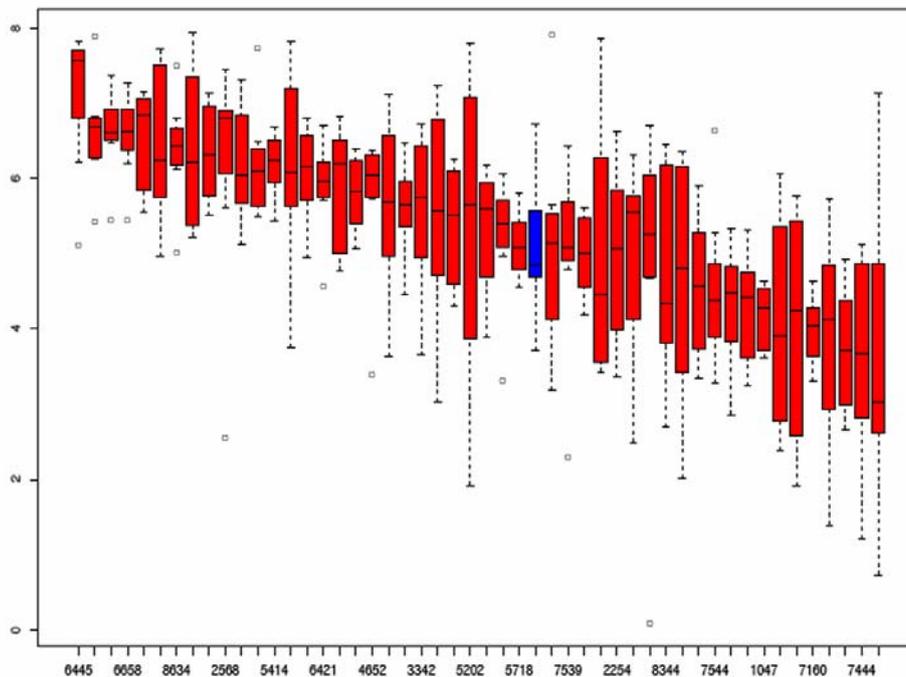


Abb. 28: Boxplot-Darstellung der 49 Proteine, die exklusiv bei FAP Polypen exprimiert wurden. Das blau markierte wurde nur in den sporadischen Proben

exprimiert. Die Ordinate entspricht dem jeweils errechneten log. Mittelwert, auf der Abszisse ist die jeweilige Proteinnummer (SSP) aufgelistet (s. Tab. 7).

4.3.2.3. Karzinom

Die Anzahl der FAP Karzinome (n=3), die zur Untersuchung zur Verfügung standen, ist zu gering, um eine statistische Berechnung zu erlauben. Dennoch wurden insgesamt 66 Proteine gefunden, die in allen FAP assoziierten Karzinomen exprimiert wurden und in keinem der sKRK detektierbar waren (Tab. 8). Von den 66 Polypeptiden waren 53 Proteine ausschließlich in den FAP Karzinomen präsent und konnten bei FAP-Polypen und FAP-Normalschleimhaut nicht gefunden werden. Bei 13 der insgesamt 66 Proteine kam es zu Überlappungen. Elf Polypeptide wurden sowohl in den FAP-Karzinomen als auch in den FAP-Polypen exprimiert. Das Protein mit der SSP Nummer 7453 wurde sowohl im FAP-Karzinom als auch in der FAP-Mukosa detektiert. Ein weiteres Protein SSP 8634 wurde in allen drei FAP-Subentitäten nachgewiesen, war jedoch in keinem der sporadischen Proben zu finden. Insgesamt acht Proteine konnten beim Vergleich FAP-Ca. versus sKRK exklusiv in den sporadischen Karzinomen nachgewiesen werden.

Das Venn-Diagramm in Abbildung 29 präsentiert diese Überlappungen der verschiedenen Subentitäten, denen die qualitative Analyse „FAP-Ca. versus sKRK“ zu Grunde liegt.

Protein	MM	Varkoef	Vorhanden	in Polypen	in Normalgewebe
3558	2,09	0,03	FAP		
5575	1,98	0,01	FAP		
7563	1,98	0,09	FAP		
4257	1,9	0,08	FAP	ja	
5264	1,89	0,03	FAP		
5353	1,89	0,05	FAP		
7676	1,88	0,02	FAP		
4588	1,85	0	FAP		
3452	1,84	0,1	FAP		
2568	1,81	0	FAP	ja	
1450	1,8	0,18	FAP		
1254	1,79	0,03	FAP	ja	
2745	1,79	0,22	FAP		
3837	1,76	0,06	FAP		
6273	1,76	0,02	FAP		
3620	1,76	0,01	FAP	ja	
3029	1,76	0,1	FAP		

4652	1,73	0,02	FAP	ja	
7672	1,73	0,14	FAP		
3616	1,73	0,25	FAP		
6458	1,73	0,07	FAP	ja	
1121	1,72	0,16	Spo		
6272	1,68	0,04	FAP		
3556	1,68	0,21	FAP		
6657	1,67	0	FAP		
6202	1,66	0,13	Spo		
5456	1,64	0,05	FAP		
6841	1,63	0,18	FAP		
8344	1,63	0,27	FAP	ja	
4441	1,63	0,08	FAP		
6574	1,63	0,07	FAP		
1056	1,62	0,01	FAP	ja	
7210	1,62	0,08	Spo		
7641	1,62	0,1	FAP		
1256	1,62	0,01	FAP		
3411	1,61	0,07	Spo		
8127	1,6	0,22	Spo		
1458	1,59	0,05	Spo		
4870	1,59	0,08	FAP		
7425	1,59	0,05	FAP		
8412	1,58	0,11	FAP		
5146	1,58	0,06	FAP		
7759	1,56	0,02	FAP		
8634	1,55	0	FAP	ja	ja
8707	1,55	0,09	FAP		
5136	1,53	0,12	FAP		
7736	1,51	0,18	FAP		
1218	1,46	0,18	Spo		
9204	1,45	0,11	FAP		
3320	1,43	0,28	FAP		
5769	1,41	0,28	FAP		
4642	1,38	0,42	FAP		
2673	1,38	0,48	FAP		
2238	1,37	0,09	FAP		
9205	1,35	0,3	FAP		
4643	1,33	0,42	FAP		
5202	1,33	0,19	FAP	ja	
3239	1,33	0,2	FAP		
5139	1,27	0,15	FAP	ja	
1358	1,26	0,32	Spo		
7453	1,09	0,34	FAP		ja
4650	0,99	1,24	FAP	ja	
3242	0,98	1,01	FAP		
4135	0,92	0,17	FAP		
1064	-0,12	-23,02	FAP		
1161	-0,21	-9,47	FAP		

Tab.8: In der ersten Spalte findet sich die Proteinnummer, es folgt die durchschnittliche log. Densitätsanalyse des identifizierten spezifischen Proteins und der jeweilige Korrelationskoeffizient. 53 Proteine wurden exklusiv in den FAP Karzinomem exprimiert, 8 ausschließlich in den sporadischen.

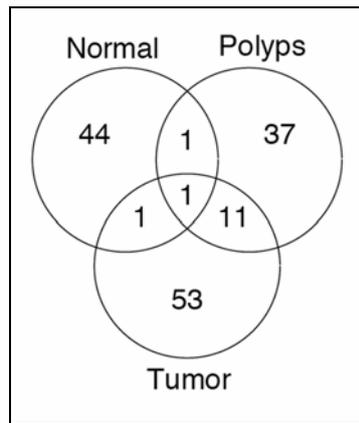


Abb. 29: Venn-Diagramm zur Darstellung der überlappenden Proteine der verschiedenen Entitäten

5. Diskussion

Die Ergebnisse des „Human Genome Projects“ haben verdeutlicht, dass sich die in dieses Projekt gesteckten Erwartungen bezüglich der Entwicklung neuer biologischer Marker, innovativer Therapiestrategien und differenzierter Prognosestellung bei malignen Erkrankungen bislang nicht in erhofftem Maße erfüllt haben.

Genetische und transkriptionale Aktivitäten sind Schlüsselfunktionen für Zellteilung und Steuerung von zellulären Pathways. Während die DNA als „Blaupause“ der Zelle angesehen werden muss, sind für die dynamischen Prozesse auf zellulärem Niveau Proteine verantwortlich. Aus den etwa 25.000 Genen einer menschlichen Zelle lassen sich unter Umständen mehr als 10 Millionen Proteine oder Proteinisoformen ableiten. Es sind etwa 300 posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Glykosylierung u.a.) bekannt. Dynamische, für die Zelle lebensnotwendige Funktionen, aber auch pathologische Zellveränderungen werden via Genregulation über Änderungen der Proteinexpression vermittelt. Dies verdeutlicht, dass Veränderungen auf Proteinniveau auf genetischer Ebene häufig nicht abgebildet sind und unterstreicht somit die herausragende Bedeutung von Proteinexpressionsanalysen.

Der Terminus „Proteomics“ wurde 1994 auf dem Electrophoresis Meeting in Siena kreiert^{100, 101}. Als Proteom wird die zum Genom komplementäre Proteinexpression einer Zelle bezeichnet (**Proteins expressed by a genome**). Dieser noch junge Zweig der experimentellen Wissenschaft hat in den letzten Jahren großes Interesse geweckt, was sich in einer sprunghaft gestiegenen Anzahl an Publikationen auf diesem Gebiet niederschlägt. Analysen des Proteoms haben große Bedeutung für die klinisch-experimentelle Forschung, insbesondere im Bereich der Onkologie. Hier besteht die Möglichkeit, krankheitsspezifische Proteine zu detektieren und zu identifizieren, die durch Evaluation entitäts-/krankheitsspezifischer Proteinexpressionsmuster neue Ansätze in der Diagnostik („disease / tumor marker“), Therapie („drug targets“) und Prognosestellung („prognostic marker“) maligner Erkrankungen bieten. So wurden in den letzten Jahren Proteomdatenbanken erarbeitet (SwissProt, Expasy, MASCOT, MOWSE, PeptideSearch, Prot-ID), in denen entitätsspezifische Expressionsmuster in einer öffentlichen Domäne gespeichert sind. Im Bereich Cancer Proteomics sind

verschiedene Gruppen darauf fokussiert, neue biologische Marker zu detektieren, um Malignome in frühen Stadien zu diagnostizieren, eine differenzierte, prognostisch wegweisende Klassifikation zu ermöglichen und eine sensitive, non-invasive Nachsorge sicherzustellen. Für das sKRK existieren bisher (ausgenommen das unspezifische CEA) noch keine sensitiven und spezifischen Biomarker, die im klinischen Alltag eingesetzt werden können. Ergebnisse, die die Polypeptidexpression bei FAP beleuchten, sind in der Literatur bisher nicht publiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen die Veränderungen der Proteinexpression des sKRK bei dessen Entstehung und Fortschreiten bis hin zur distanten Metastase untersucht, zum anderen das Proteinexpressionsmuster einer hereditären Erkrankung am Beispiel der FAP evaluiert. Im Anschluss wurde das Proteinexpressionsmuster dieser beiden Gruppen miteinander verglichen.

5.1. Das sporadische kolorektale Karzinom (sKRK)

Die Frühdiagnose des sKRK respektive der zum Malignom führenden Vorstufe ist der Schlüssel zur kurativen Therapie der Erkrankung. Screening Methoden wie Haemocult-Test und Sigmoido- bzw. Koloskopie konnten zwar zu einer Reduktion der Mortalität beitragen, doch werden nach wie vor etwa zwei Drittel der Erkrankung erst im klinischen Stadium III und IV diagnostiziert und bedingen so die schlechte Prognose ¹²⁸.

Eine Vielzahl genetischer Ereignisse sind an der Entstehung des sKRK beteiligt. Diese im sogenannten Vogelsteinmodell der Karzinogenese dargestellten genetischen Alterationen beeinflussen eine ganze Reihe von Proteinen, die mannigfaltige biologische Prozesse während der Tumorgenese bedingen. Durch die Darstellung und den Vergleich eines umfassenden Proteinexpressionsprofils für die Normalschleimhaut, Polypen, das manifeste sKRK und dessen Metastasen, konnten in der vorliegenden Arbeit Veränderungen in der Proteinexpression entsprechend der Entwicklung und des Fortschreitens des sKRK gezeigt werden. Einhergehend mit dem bereits erwähnten Tumorprogressionsmodell von Fearon und Vogelstein ist dies sowohl innerhalb eines Patienten (intraindividuell) wie auch beim Vergleich mehrerer Patienten untereinander (interindividuell) gelungen ²⁴. Auf diese Weise sind auf Proteomebene Veränderungen von 112 Proteinen

nachgewiesen und 72 dieser Polypeptide identifiziert worden, die die chronologische Sequenz ausgehend von der Normalmukosa über das Adenom und das Karzinom hin zur distanten Metastase definieren (Tab.4).

5.1.1. Intra- und interindividueller Vergleich

Zunächst wurden die quantitativen und qualitativen Daten der 2-DE analysiert, um allgemeine Informationen über die Heterogenität von primären sKRK und Metastasen zu erhalten. Proben aus zwei unterschiedlichen Arealen eines Tumors sowie einer Metastase wurden untersucht. Der durchschnittliche Korrelationskoeffizient war für die Karzinome 0,86 und für die Metastasen 0,80. Die Untersuchungen zeigten ein hohes Maß an intratumoraler Homogenität, welches den Ergebnissen einer Publikation entspricht, die Koeffizienten von 0,85 beim Ovarialkarzinom und 0,80 beim Mammakarzinom beschreiben ¹¹⁶. Da alle in dieser Arbeit untersuchten Karzinom- und Metastasenproben ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium repräsentierten, könnte diese Homogenität auf der Dominanz eines Zellklons beruhen ¹²⁹.

Mit Hilfe der Principle Component Analyse (PCA) konnten „Outlyrer“ in den vier histologischen Gruppen identifiziert werden. Das PCA Diagramm (Abb. 20) stützt die Qualität der Präparationstechnik, die anhand von Gewebeuntersuchungen an unterschiedlichen histologischen Subtypen des Mammakarzinoms validiert werden konnte ^{115, 116}. Bedenkt man, dass der PCA Analyse die Proteinexpressionsdaten von mehr als 100.000 Proteinspots zu Grunde liegen, ist die klare Unterscheidung der vier Subgruppen basierend auf den Proteinexpressionsmustern bemerkenswert. Darüber hinaus zeigen unsere Daten der Polypeptidexpression ein enges Verhältnis der benignen (Normalschleimhaut und Polypen) zu den malignen Gewebetypen (sKRK und Metastase). Interessanterweise liegen die beiden Polypen mit „high grade“ Neoplasie nicht in engem räumlichen Zusammenhang mit den benignen Gewebetypen, sondern sind, im Gegensatz zu den als „low grade“ eingestuften Polypen, näher an den Malignomen lokalisiert, was eventuell ihr malignes Potential repräsentiert.

5.1.2. Massenspektrometrische Identifikation potentieller Markerproteine zur Differenzierung „normal versus disease“

Ziel war es, diejenigen Proteine zu identifizieren, die für das gruppenspezifische Expressionsmuster verantwortlich sind. Hierbei zeigten 112 Polypeptide statistisch signifikante Expressionsunterschiede, von denen 72 mittels Massenspektrometrie erfolgreich identifiziert werden konnten. Insgesamt 46 Proteine waren isoliert und exklusiv in den Karzinomen und Metastasen überexprimiert.

Die identifizierten Proteine (Tab.4) lassen sich verschiedenen funktionellen Gruppen zuordnen. Die erste Gruppe beinhaltet den Zellzyklus regulierende Proteine, wie zum Beispiel „elongation factor 1“, „proliferation associated Protein 2G4“ und „translation initiation factor“, die allesamt den Proliferationsstatus der Neoplasien widerspiegeln.

Eine weitere Gruppe umfasst Proteine, die den zellulären Stoffwechsel beeinflussen, wie zum Beispiel „3,2-Transenoyl-CoA Isomerase“, „Succinat Dehydrogenase“ und „5-Lipooxygenase“. Sie weisen auf eine erhöhte metabolische Aktivität innerhalb maligner Zellen hin ¹¹⁶.

Eine dritte Gruppe mit erhöhtem Expressionsmuster in Karzinomen und Metastasen beinhaltet Proteine der „heat shock“ Familie (HS), beispielsweise „HS cognate 71“ und „HS Protein 27“ (HSP). HS Proteine sind intrazelluläre Polypeptide, die durch verschiedene Stressoren wie Temperatur, Infektion und Neoplasien in ihrer Expression rasch beeinflusst werden können. Ihre Freisetzung wird als mutmaßliches zelluläres Gefahrensignal betrachtet, da sie helfen, die strukturelle und metabolische Integrität der Zelle aufrecht zu erhalten. Verschiedene Berichte zum Thema Immuntherapie mittels Krebsvakzine, basierend auf den HS Proteinen sind bereits für das Nierenzellkarzinom und das Melanom veröffentlicht ¹³⁰⁻¹³³.

Eine vierte Gruppe von Polypeptiden, die in Karzinomen und Metastasen überexprimiert waren, besteht aus strukturellen Proteinen. In der vorliegenden Arbeit war eine Verlagerung in der Zytokeratinexpression von CK7, CK8, CK18 und CK19 zu beobachten. CK7, CK8, CK18 und CK19 sind in Normalschleimhaut und Polypen vermehrt vorhanden. Zytokeratin CK20 war in den Karzinomen überexprimiert. Dies steht im Einklang mit immunhistochemischen Untersuchungen, bei denen CK7 und CK20 als Marker zur Unterscheidung

zwischen dem primären Ovarialkarzinom (CK7+ / CK20-) und kolorektalen Karzinomen (CK7- / CK20+) genutzt wurden ¹³⁴. So hat CK20 als Markerprotein für kolorektale Karzinome Eingang in die klinische Routinediagnostik gefunden.

In dieser Arbeit konnte eine verminderte Expression der Proteine Actin1, Actin2 und Tropomyosin1 in den malignen Zellen nachgewiesen werden. Diese Transformation führt, übereinstimmend mit Ergebnissen an Zelllinien, zu einer Fos-induzierten Dysregulation von Genen, die für das Microfilament-assoziierte-Protein kodieren ¹³⁵. Eine Down-Regulation der Tropomyosin Isoformen 1-3 wurde ebenfalls an Mammakarzinomgewebe festgestellt ¹¹⁶.

Bezüglich der unterschiedlichen Expression von primären kolorektalen Karzinomen und kolorektalen Lebermetastasen ist in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Unterschied in der Expression des Hepatozellulären-Karzinom-assoziierten Antigens 66 detektiert worden. Dieses 70kDa Protein gehört zu einer Familie von Proteinen, die in verschiedenen anderen Karzinomentitäten wie Hodenkrebs, Bronchialkarzinom und hepatozelluläres Karzinom überexprimiert werden ¹³⁶.

Die Ergebnisse zeigen, dass die 2-DE basierte Proteomanalyse in Verbindung mit massenspektrometrischer Proteinidentifizierung ein effizientes Verfahren zur Detektion von Biomarkern an kolorektalem Karzinomgewebe darstellt und eine Reihe gut definierter Marker mit diagnostischem Potential hervorbringen kann. Obwohl diese Marker vor ihrer routinemäßigen Nutzung in der Klinik validiert werden müssen, deuten sie darauf hin, dass zelluläre Proteommuster in der Diagnostik angewendet und angepasste individuelle Therapien entworfen werden können.

5.2. Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP)

Im zweiten Teil dieser Arbeit ist das Proteinexpressionsmuster des sKRK mit dem der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) verglichen worden. Trotz des technischen Fortschrittes der Medizin werden hereditäre kolorektale Karzinome häufig erst in einem späten Krankheitsstadium entdeckt und therapiert. Besonders häufig tritt dies bei Patienten mit fehlender Familienanamnese oder misslungener genetischer Testung auf. Friedl et al. konnten an einem großen Patientengut zeigen, dass bei etwa 40% der Patienten mit klinisch manifester FAP kein

genetischer Defekt nachzuweisen ist ¹³⁷. Wenn hereditäre Erkrankungen in frühem Stadium, also vor der Entwicklung eines Karzinoms entdeckt werden, würde dies zu einer deutlich höheren Rate an kurativen Therapien führen. Diese „diagnostische Lücke“ kann durch beschriebene Proteomanalysen geschlossen werden, da die Normalschleimhaut von FAP-Patienten – unabhängig von nachgewiesenem Gendefekt – bereits ein im Vergleich zur gesunden Normalschleimhaut anderes Proteinexpressionsmuster zeigt. Dies könnte in Zukunft für den Patienten von erheblichem Nutzen sein.

5.2.1. Vergleich der Expressionsmuster zwischen sporadischem (sKRK) und hereditärem (FAP) Gewebe

Das Ziel in diesem Teil der Arbeit war es, ein Set an Gewebeproteinen zu definieren, anhand derer ein direkter Vergleich der FAP zum sKRK möglich ist. Durch die 2-DE sind im durchgeführten Matchset 1950 verschiedene Proteine aufgetrennt worden. Sowohl qualitative als auch quantitative Veränderungen im Expressionsmuster wurden auf allen drei Ebenen (Schleimhaut, Polyp, Karzinom) in beiden Krankheitsentitäten entdeckt.

Für die Diagnostik scheint der Vergleich zwischen der Normalschleimhaut der sporadischen Erkrankung und der FAP von großem Interesse, da dieser die Möglichkeit für ein Marker-Panel eröffnet, welches eine Diagnostik in Biopsien makroskopisch unauffälliger Schleimhaut möglich zu machen scheint. In der vorliegenden Arbeit wurden 17 Proteine detektiert, die eine quantitative Veränderung mit einer False Discovery Rate (FDR) von 10% zwischen der Normalschleimhaut der FAP und der Normalschleimhaut des sporadischen Karzinoms zeigten.

Mittels einer qualitativen Analyse konnten 47 Proteine identifiziert werden, die exklusiv in allen Normalschleimhautproben der FAP Patienten vorhanden waren, jedoch niemals in der Normalschleimhaut der sKRK Patienten. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass bereits in makroskopisch „gesunden“ Epithelzellen der FAP Patienten ein „FAP spezifischer Proteinfingerprint“ auf molekularer Ebene vorliegt (Tab. 6, Abb. 26 und 27).

Beim Vergleich der Polypen untereinander wurden 49 Polypeptide erfasst, die in allen FAP Proben vorhanden waren aber in sämtlichen sporadischen Polypen

nachweislich fehlten. Ein Protein ist nur in den sporadischen Polypen präsent (Tab.7, Abb. 28 und 29).

Abgesehen von der Tatsache, dass die Anzahl der FAP Karzinome (n=3) zu klein ist, um eine statistisch signifikante Aussage treffen zu können, wurden 66 Proteine identifiziert, deren Vorhandensein bzw. nicht Vorhandensein mit der entsprechenden FAP- bzw. sKRK- Gruppe übereinstimmt (58 Proteine ausschließlich in der FAP vorhanden, 8 lediglich im sKRK vorhanden).

Die gezielte Betreuung von Risikofamilien und die Möglichkeit der genetischen Testung führte insbesondere in den westlichen Ländern dazu, einen Großteil der FAP Patienten zu identifizieren. Die Tatsache jedoch, dass in dieser Arbeit an einem jungen Patientengut insgesamt drei Karzinome gesammelt worden sind, zeigt das diagnostische Dilemma und die Notwendigkeit, bessere Tests zu etablieren. Die diagnostische Lücke wurde in der Veröffentlichung von Bisgaard et al. gezeigt. Die Gruppe berichtete von etwa 22% bis 46% „de novo“ Mutationen bei FAP Patienten, bei denen eine familiäre Anamnese der Erkrankung fehlt¹³⁸. Die in der vorgelegten Studie selektierten 47 Polypeptide konnten in 100% der Fälle FAP Normalschleimhaut von sporadischen Fällen unterscheiden. Dies bedeutet, dass diese Proteine das Potential besitzen, als ein Panel biologischer Marker genutzt zu werden, um hereditäre Erkrankungen bereits im Frühstadium, also vor der Entwicklung von hunderten von Polypen bzw. Karzinomen zu diagnostizieren. Aus den unterschiedlichen Proteinexpressionsmustern der Polypen und Karzinome können hinsichtlich der Tumorbiologie der FAP im Vergleich zu der sporadischen Erkrankung neue Informationen gewonnen werden. Zweifellos sind weitere Studien notwendig, um dies an klinischen Proben zu validieren. Idealerweise sollten die Proben von gut kontrollierten Patientenpopulationen stammen, bevor diese Marker für die routinemäßige Diagnostik und gegebenenfalls auch Therapie in Betracht gezogen werden können.

Patienten mit der Verdachtsdiagnose FAP und zweifelhaftem genetischen Testergebnis könnten durch eine Proteomanalyse in Zukunft profitieren und ggf. auf ein unnötiges, lebenslanges und psychisch belastendes sowie kostenintensives Vorsorgescreening verzichten.

5.3. Ausblick: Herausforderung von Proteomics in der Zukunft

Genom- und Proteom basierte Klassifikationen verschiedener maligner Erkrankungen sowie die Erprobung biologischer Marker haben in verschiedenen Publikationen Zustimmung gefunden^{107-117, 139-151}. Roblick et al. konnten mittels Proteinexpressionsanalysen basierend auf 2-DE und Principle Component Analyse einen entdifferenzierten Tumor des kleinen Beckens, der mit allen gängigen histologischen und immunhistochemischen Methoden nicht eindeutig zu klassifizieren war, als einen vom rektosigmoidalen Übergang ausgehenden Tumor identifizieren¹⁵³.

An einer Genom-, Proteom- und Gewebe-Array Untersuchung von 60 humanen Krebszelllinien (Ovarialkarzinome und Kolonkarzinome) konnten Nishizuka et al. die Proteine Villin und Moesin nachweisen und empfahlen sie als Marker zur Differenzierung primärer Ovarialkarzinome und kolorektaler Karzinome¹⁵². Alaiya et al. und Franzen et al. konnten unterschiedliche Erkrankungsstadien basierend auf erkrankungs- und stadienspezifischen Proteinexpressionsmustern bei Protatakarzinomen, Mammakarzinomen und Ovarialkarzinomen differenzieren^{107, 108, 111-112, 151}.

Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese ist es möglich, Proteine zu identifizieren, die spezifisch in gesundem Gewebe oder in Tumorgewebe vorkommen. Anhand von Proteomdatenbanken (SwissProt, ExPasy, MASCOT, MOWSE, PeptideSearch, Prot-ID) lassen sich diese Proteine benennen und charakterisieren. Sie können als Markerproteine für Tumorentitäten dienen. Es scheint so, dass bestimmte Proteine wie HSP, Vimentin und Villin bei der Entstehung von malignen Prozessen beteiligt sind. Sie sind aber nicht spezifisch für eine Tumorentität.

Die bisher gewonnenen Daten der Proteomforschung deuten jedoch an, dass ein einzelnes Protein als Marker für eine Karzinomentität mit großer Wahrscheinlichkeit unzureichend ist. Vieles deutet darauf hin, dass die maligne Zelle kein neues einzigartiges Polypeptid synthetisiert. Vielmehr scheint die Annahme berechtigt, dass entitätsspezifische Dysregulationen von bereits vorhandenen Proteinen (z.B. Stressproteine wie heatshock, Zellzyklusregulatoren z.B. elf-1), Isoformsynthese (p53-Phosphorylierung) und die Kreation von „nonsense“ Proteinen die maligne Zelltransformation begleiten. In Zukunft werden

Testpanels mehrerer Markerproteine in der Tumordiagnostik angewandt werden. Diese werden diejenigen Proteine testen müssen, die als Resultat maligner Zellfunktionen und zellulärer Interaktionen in Gewebe- oder auch Serumproben dysreguliert nachgewiesen werden können.

Durch die Kombination der von uns identifizierten malignitätsspezifischen Gewebeproteine mit den klinisch etablierten Testverfahren (CEA etc.) sollte es möglich sein, sKRK spezifische hochsensitive Markerpanels zu erstellen, um eine frühere Diagnose, exaktere Klassifikation sowie eine Prognosestellung zu erlauben.

Sollte die weitere Aufarbeitung der FAP Präparate und die klinische Validierung ergeben, dass bereits in einer makroskopisch unveränderten Mukosa die von uns definierten FAP Marker die Erkrankung diagnostizieren lassen, so wäre eine Identifizierung auch bei „de novo“ FAP an Biopsien möglich.

Es ist davon auszugehen, dass in naher Zukunft die klinische Medizin die Ergebnisse der Proteom- und Genomforschung integrieren wird. Dieser Transfer von „bench to bedside“ wird neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten für die Pathologie, die klinische Routine und die Verlaufsbeobachtungen eröffnen sowie therapeutische Ziele neu definieren. Die Frühdiagnose von Malignomen aus Körperflüssigkeiten wird über Chip-Plattformen, neue Generationen von Massenspektrometern und Multiplex-Immunoessays möglich sein. Gewebebiopsien werden auch weiter histomorphologisch untersucht und klassifiziert werden. Darüber hinaus wird aber der Pathologe der Zukunft Genom- und Proteomtechnologien nutzen können, um Malignome zu subklassifizieren. Es wird möglich sein, ein Ansprechen des individuellen Patienten auf Radio- bzw. Chemotherapie vorherzusagen und eine individuelle Prognose zu stellen.

6. Zusammenfassung

Trotz der Weiterentwicklung chirurgischer Techniken und adjuvanten Therapieoptionen konnte die Mortalität der Patienten mit sKRK in den letzten 20 Jahren nicht signifikant gesenkt werden. Dies zeigt die Notwendigkeit, neue Biomarker (-panels) zur Diagnosesicherung im Frühstadium zu etablieren. Durch intensive Forschung auf molekularer Ebene hat es in den letzten Jahren Fortschritte beim Verständnis der Pathogenese des sKRK und der hereditären Formen wie der FAP gegeben. Auch wenn die neugewonnenen Erkenntnisse noch keinen Einfluss auf den klinischen Alltag haben, erscheinen sie vielversprechend zu sein. Wünschenswerte Kriterien für die Entwicklung eines Biomarker Panels sind minimaler Aufwand, geringe Kosten, hohe Sensitivität und Spezifität sowie hohe Akzeptanz unter den Patienten.

Im ersten Abschnitt der Arbeit sollte anhand von klinischen Proben die unterschiedliche Proteinexpressionen als Konsequenz einer genetischen Veränderung bei der Entstehung des Kolonkarzinoms gezeigt werden. Es wurden Proben von Patienten mit einem fortgeschrittenem sKRK untersucht. Mukosa, Adenom, Karzinom und ggf. Metastase sind mittels 2-DE Elektrophorese und Massenspektrometrie analysiert worden. Die Principle Component Analyse zeigt, dass die Subentitäten in allen Fällen richtig gruppiert werden konnten. Insgesamt hatten 112 Proteine eine statistische Über- bzw. Unterexpression, von denen 72 identifiziert werden konnten. 46 dieser Proteine wurden während der Karzinomentstehung heraufreguliert, 26 Proteine wurden herunterreguliert. Einige der identifizierten Polypeptide sind an spezifischen regulierenden Zellfunktionen beteiligt (Zellzyklus, Zytoskelett, metabolischer Stoffwechsel). Sie könnten in Zukunft als Panel von Markerproteinen dienen. Vor dem Einsatz in der klinischen Routine müssen diese potentiellen Marker zunächst anhand weiterer Studien validiert werden.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit ist die Proteinexpression von Patienten mit sKRK und FAP auf Mukosaebene, Polypenebene und Karzinomebene verglichen worden. Auf Polypenebene sind 49 Proteine detektiert worden, die ausschließlich in den FAP Proben exprimiert wurden und ein Protein, welches exklusiv in allen sporadischen Proben, jedoch nie bei FAP zu sehen war. Bei den Karzinomen wurden insgesamt 66 Proteine gefunden, die in allen FAP assoziierten

Karzinomen exprimiert wurden und in keinem der sKRK detektierbar waren. In der Mukosa der Patienten mit FAP sind insgesamt 47 Proteine exprimiert worden, die in keiner Mukosaprobe der Patienten mit sKRK vorkamen. Die hierarchische Clusteranalyse auf Basis dieser detektierten Proteine zeigt, dass es möglich ist, die Diagnose FAP bereits an makroskopisch gesund erscheinender Mucosa zu sichern. Bei klinischen Verdacht FAP und negativer genetischer Testung könnte mit einer einfachen Biopsie durch Proteomics und nachfolgender Clusteranalyse die Diagnose FAP gesichert werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Fenoglio-Preiser CM, Hutter RV. Colorectal polyps: pathologic diagnosis and clinical significance. *CA Cancer J Clin* 1985;**35**(6): 322-344.
2. Konishi F, Morson BC. Pathology of colorectal adenomas: a colonoscopic survey. *J Clin Pathol* 1982;**35**(8): 830-841.
3. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, Dixon MF, Fenoglio-Preiser CM, Flejou JF, Geboes K, Hattori T, Hirota T, Itabashi M, Iwafuchi M, Iwashita A, Kim YI, Kirchner T, Klimpfinger M, Koike M, Lauwers GY, Lewin KJ, Oberhuber G, Offner F, Price AB, Rubio CA, Shimizu M, Shimoda T, Sipponen P, Solcia E, Stolte M, Watanabe H, Yamabe H. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 2000;**47**(2): 251-255.
4. Bosari S, Moneghini L, Graziani D, Lee AK, Murray JJ, Coggi G, Viale G. bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1995;**26**(5): 534-540.
5. Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1990;**14**(6): 524-537.
6. Jass JR. Serrated adenoma and colorectal cancer. *J Pathol* 1999;**187**(5): 499-502.
7. Yao T, Kouzuki T, Kajiwara M, Matsui N, Oya M, Tsuneyoshi M. 'Serrated' adenoma of the colorectum, with reference to its gastric differentiation and its malignant potential. *J Pathol* 1999;**187**(5): 511-517.
8. Morson B. Polyps and cancer of the large bowel. *West J Med* 1976;**125**(2): 93-99.
9. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999;**49**(1): 33-64, 31.
10. Parker L. Social inequality and cancer deaths. *Lancet Oncol* 2001;**2**(1): 5.
11. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004;**96**(19): 1420-1425.
12. Doria-Rose VP, Levin TR, Selby JV, Newcomb PA, Richert-Boe KE, Weiss NS. The incidence of colorectal cancer following a negative screening

sigmoidoscopy: implications for screening interval. *Gastroenterology* 2004;**127**(3): 714-722.

13. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004;**54**(1): 8-29.

14. Wu X, Chen VW, Martin J, Roffers S, Groves FD, Correa CN, Hamilton-Byrd E, Jemal A. Subsite-specific colorectal cancer incidence rates and stage distributions among Asians and Pacific Islanders in the United States, 1995 to 1999. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;**13**(7): 1215-1222.

15. Andrieu N, Launoy G, Guillois R, Ory-Paoletti C, Gignoux M. Familial relative risk of colorectal cancer: a population-based study. *Eur J Cancer* 2003;**39**(13): 1904-1911.

16. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994;**331**(25): 1669-1674.

17. Guillem JG, Bastar AL, Ng J, Huhn JL, Cohen AM. Clustering of colorectal cancer in families of probands under 40 years of age. *Dis Colon Rectum* 1996;**39**(9): 1004-1007.

18. Guillem JG, Forde KA, Treat MR, Neugut AI, O'Toole KM, Diamond BE. Colonoscopic screening for neoplasms in asymptomatic first-degree relatives of colon cancer patients. A controlled, prospective study. *Dis Colon Rectum* 1992;**35**(6): 523-529.

19. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol* 2001;**96**(10): 2992-3003.

20. Rozen P, Fireman Z, Figer A, Legum C, Ron E, Lynch HT. Family history of colorectal cancer as a marker of potential malignancy within a screening program. *Cancer* 1987;**60**(2): 248-254.

21. Slattery ML, Levin TR, Ma K, Goldgar D, Holubkov R, Edwards S. Family history and colorectal cancer: predictors of risk. *Cancer Causes Control* 2003;**14**(9): 879-887.

22. Sondergaard JO, Bulow S, Lynge E. Cancer incidence among parents of patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 1991;**47**(2): 202-206.

23. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, Simmang C. Colorectal cancer screening

and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;**124**(2): 544-560.

24. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;**61**(5): 759-767.
25. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;**49**(17): 4682-4689.
26. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* 1994;**57**(1): 1-9.
27. Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, Costa A, Daidone MG, Leo E, Pilotti S, Bertario L, Pierotti MA. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004;**10**(12 Pt 1): 4015-4021.
28. Gatenby RA, Vincent TL. An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Res* 2003;**63**(19): 6212-6220.
29. Ilyas M, Tomlinson IP. Genetic pathways in colorectal cancer. *Histopathology* 1996;**28**(5): 389-399.
30. Muller H, Scott R, Weber W, Meier R. Colorectal cancer: lessons for genetic counselling and care for families. *Clin Genet* 1994;**46**(1 Spec No): 106-114.
31. Gryfe R, Swallow C, Bapat B, Redston M, Gallinger S, Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997;**21**(5): 233-300.
32. Laurent-Puig P, Blons H, Cugnenc PH. Sequence of molecular genetic events in colorectal tumorigenesis. *Eur J Cancer Prev* 1999;**8 Suppl 1**: S39-47.
33. Fearon ER. Genetic alterations underlying colorectal tumorigenesis. *Cancer Surv* 1992;**12**: 119-136.
34. Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull* 2002;**64**: 27-43.
35. Hermsen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciutto A, Roemen G, Arends JW, Williams R, Giaretti W, De Goeij A, Meijer G. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 2002;**123**(4): 1109-1119.
36. Schulmann K, Reiser M, Schmiegel W. Colonic cancer and polyps. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;**16**(1): 91-114.

37. Beahrs OH, Sanfelippo PM. Factors in prognosis of colon and rectal cancer. *Cancer* 1971;**28**(1): 213-218.
38. Copeland EM, Miller LD, Jones RS. Prognostic factors in carcinoma of the colon and rectum. *Am J Surg* 1968;**116**(6): 875-881.
39. Hoerner MT. Carcinoma of the colon and rectum; case reports in individuals under twenty years of age. *Am J Proctol* 1958;**9**(4): 277-284.
40. Hoerner MT. Carcinoma of the colon and rectum in persons under twenty years of age. *Am J Surg* 1958;**96**(1): 47-53.
41. Recio P, Bussey HJ. The pathology and prognosis of carcinoma of the rectum in the young. *Proc R Soc Med* 1965;**58**(10): 789-790.
42. Behbehani A, Sakwa M, Ehrlichman R, Maguire P, Friedman S, Steele GD, Jr., Wilson RE. Colorectal carcinoma in patients under age 40. *Ann Surg* 1985;**202**(5): 610-614.
43. Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. Results of screening colonoscopy among persons 40 to 49 years of age. *N Engl J Med* 2002;**346**(23): 1781-1785.
44. Slentz K, Senagore A, Hibbert J, Mazier WP, Talbott TM. Can preoperative and postoperative CEA predict survival after colon cancer resection? *Am Surg* 1994;**60**(7): 528-531; discussion 531-522.
45. Korenaga D, Saeki H, Mawatari K, Orita H, Maekawa S, Ikeda T, Sugimachi K. Serum carcinoembryonic antigen concentration doubling time correlates with tumor biology and life expectancy in patients with recurrent gastrointestinal carcinoma. *Arch Surg* 1997;**132**(2): 188-194.
46. Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM. Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg* 1997;**185**(1): 55-59.
47. Chapman MA, Buckley D, Henson DB, Armitage NC. Preoperative carcinoembryonic antigen is related to tumour stage and long-term survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;**78**(10): 1346-1349.
48. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen C. An evaluation of the carcinoembryonic antigen (CEA) test for monitoring patients with resected colon cancer. *Jama* 1993;**270**(8): 943-947.

49. Meyers MO, Sasson AR, Sigurdson ER. Locoregional strategies for colorectal hepatic metastases. *Clin Colorectal Cancer* 2003;**3**(1): 34-44.
50. Mori M, Tomoda H, Ishida T, Kido A, Shimono R, Matsushima T, Kuwano H, Sugimachi K. Surgical resection of pulmonary metastases from colorectal adenocarcinoma. Special reference to repeated pulmonary resections. *Arch Surg* 1991;**126**(10): 1297-1301; discussion 1302.
51. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H, Mecklin JP, de la Chapelle A. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;**338**(21): 1481-1487.
52. Cunningham C, Dunlop MG. Genetics of colorectal cancer. *Br Med Bull* 1994;**50**(3): 640-655.
53. Mecklin JP, Jarvinen HJ, Hakkiluoto A, Hallikas H, Hiltunen KM, Harkonen N, Kellokumpu I, Laitinen S, Ovaska J, Tulikoura J, et al. Frequency of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. A prospective multicenter study in Finland. *Dis Colon Rectum* 1995;**38**(6): 588-593.
54. Ponz de Leon M. Prevalence of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC). *Ann Med* 1994;**26**(3): 209-214.
55. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* 2004;**23**(38): 6445-6470.
56. Caspari R, Friedl W, Mandl M, Moslein G, Kadmon M, Knapp M, Jacobasch KH, Ecker KW, Kreissler-Haag D, Timmermanns G, et al. Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. *Lancet* 1994;**343**(8898): 629-632.
57. Friedl W, Meuschel S, Caspari R, Lamberti C, Krieger S, Sengteller M, Propping P. Attenuated familial adenomatous polyposis due to a mutation in the 3' part of the APC gene. A clue for understanding the function of the APC protein. *Hum Genet* 1996;**97**(5): 579-584.
58. Lockhart-Mummery JP. *The origin of cancer*. J. & A. Churchill: London,, 1934; ix, 150 p.
59. Gardner EJ, Stephens FE. Cancer of the lower digestive tract in one family group. *Am J Hum Genet* 1950;**2**(1): 41-48.

60. Turcot J, Despres JP, St Pierre F. Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis Colon Rectum* 1959;**2**: 465-468.
61. Ripa R, Bisgaard ML, Bulow S, Nielsen FC. De novo mutations in familial adenomatous polyposis (FAP). *Eur J Hum Genet* 2002;**10**(10): 631-637.
62. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;**66**(3): 589-600.
63. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991;**251**(4999): 1366-1370.
64. Kolligs FT, Hu G, Dang CV, Fearon ER. Neoplastic transformation of RK3E by mutant beta-catenin requires deregulation of Tcf/Lef transcription but not activation of c-myc expression. *Mol Cell Biol* 1999;**19**(8): 5696-5706.
65. Orford K, Orford CC, Byers SW. Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest. *J Cell Biol* 1999;**146**(4): 855-868.
66. Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E. De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 1998;**95**(5): 605-614.
67. Mandl M, Paffenholz R, Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Propping P. Frequency of common and novel inactivating APC mutations in 202 families with familial adenomatous polyposis. *Hum Mol Genet* 1994;**3**(1): 181-184.
68. Gebert JF, Dupon C, Kadmon M, Hahn M, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M, Schackert HK. Combined molecular and clinical approaches for the identification of families with familial adenomatous polyposis coli. *Ann Surg* 1999;**229**(3): 350-361.
69. van der Luijt RB, Khan PM, Vasen HF, Tops CM, van Leeuwen-Cornelisse IS, Wijnen JT, van der Klift HM, Plug RJ, Griffioen G, Fodde R. Molecular analysis of the APC gene in 105 Dutch kindreds with familial adenomatous polyposis: 67 germline mutations identified by DGGE, PTT, and southern analysis. *Hum Mutat* 1997;**9**(1): 7-16.

70. Wallis YL, Morton DG, McKeown CM, Macdonald F. Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition. *J Med Genet* 1999;**36**(1): 14-20.
71. Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B, et al. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993;**75**(5): 951-957.
72. Nagase H, Miyoshi Y, Horii A, Aoki T, Ogawa M, Utsunomiya J, Baba S, Sasazuki T, Nakamura Y. Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992;**52**(14): 4055-4057.
73. Bulow S. Clinical features in familial polyposis coli. Results of the Danish Polyposis Register. *Dis Colon Rectum* 1986;**29**(2): 102-107.
74. Bussey HJR. *Familial polyposis coli; family studies, histopathology, differential diagnosis, and results of treatment*. John Hopkins Univ. Press: Baltimore,, 1975; xiii, 104 p.
75. Heiskanen I, Kellokumpu I, Jarvinen H. Management of duodenal adenomas in 98 patients with familial adenomatous polyposis. *Endoscopy* 1999;**31**(6): 412-416.
76. Offerhaus GJ, Giardiello FM, Krush AJ, Booker SV, Tersmette AC, Kelley NC, Hamilton SR. The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 1992;**102**(6): 1980-1982.
77. Howe JR, Mitros FA, Summers RW. The risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis. *Ann Surg Oncol* 1998;**5**(8): 751-756.
78. Caspari R, Friedl W, Boker T, Augustin A, Mandl M, Jaeger K, Gallkowski K, Propping P. Predictive diagnosis in familial adenomatous polyposis: evaluation of molecular genetic and ophthalmologic methods. *Z Gastroenterol* 1993;**31**(11): 646-652.
79. Bulow S, Sondergaard JO, Witt I, Larsen E, Tetens G. Mandibular osteomas in familial polyposis coli. *Dis Colon Rectum* 1984;**27**(2): 105-108.
80. Utsunomiya J, Nakamura T. The occult osteomatous changes in the mandible in patients with familial polyposis coli. *Br J Surg* 1975;**62**(1): 45-51.
81. Leppard B, Bussey HJ. Epidermoid cysts, polyposis coli and Gardner's syndrome. *Br J Surg* 1975;**62**(5): 387-393.

82. Kadmon M, Moslein G, Buhr HJ, Herfarth C. [Desmoid tumors in patients with familial adenomatous polyposis (FAP). Clinical and therapeutic observations from the Heidelberg polyposis register]. *Chirurg* 1995;**66**(10): 997-1005.
83. Lotfi AM, Dozois RR, Gordon H, Hruska LS, Weiland LH, Carryer PW, Hurt RD. Mesenteric fibromatosis complicating familial adenomatous polyposis: predisposing factors and results of treatment. *Int J Colorectal Dis* 1989;**4**(1): 30-36.
84. Clark SK, Neale KF, Landgrebe JC, Phillips RK. Desmoid tumours complicating familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 1999;**86**(9): 1185-1189.
85. Bertario L, Russo A, Sala P, Eboli M, Giarola M, D'Amico F, Gismondi V, Varesco L, Pierotti MA, Radice P. Genotype and phenotype factors as determinants of desmoid tumors in patients with familial adenomatous polyposis. *Int J Cancer* 2001;**95**(2): 102-107.
86. Leppert M, Burt R, Hughes JP, Samowitz W, Nakamura Y, Woodward S, Gardner E, Lalouel JM, White R. Genetic analysis of an inherited predisposition to colon cancer in a family with a variable number of adenomatous polyps. *N Engl J Med* 1990;**322**(13): 904-908.
87. Nugent KP, Farmer KC, Spigelman AD, Williams CB, Phillips RK. Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 1993;**80**(12): 1618-1619.
88. Winde G, Schmid KW, Schlegel W, Fischer R, Osswald H, Bunte H. Complete reversion and prevention of rectal adenomas in colectomized patients with familial adenomatous polyposis by rectal low-dose sulindac maintenance treatment. Advantages of a low-dose nonsteroidal anti-inflammatory drug regimen in reversing adenomas exceeding 33 months. *Dis Colon Rectum* 1995;**38**(8): 813-830.
89. Tonelli F, Valanzano R, Messerini L, Ficari F. Long-term treatment with sulindac in familial adenomatous polyposis: is there an actual efficacy in prevention of rectal cancer? *J Surg Oncol* 2000;**74**(1): 15-20.
90. Stoner GD, Budd GT, Ganapathi R, DeYoung B, Kresty LA, Nitert M, Fryer B, Church JM, Provencher K, Pamukcu R, Piazza G, Hawk E, Kelloff G, Elson P, van Stolk RU. Sulindac sulfone induced regression of rectal polyps in patients with familial adenomatous polyposis. *Adv Exp Med Biol* 1999;**470**: 45-53.

91. Cruz-Correa M, Hylind LM, Romans KE, Booker SV, Giardiello FM. Long-term treatment with sulindac in familial adenomatous polyposis: a prospective cohort study. *Gastroenterology* 2002;**122**(3): 641-645.
92. Fournier DB, Gordon GB. COX-2 and colon cancer: potential targets for chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl* 2000;**34**: 97-102.
93. Senninger N, Bruwer M. [Indications for restorative proctocolectomy in systemic colorectal diseases (ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis coli)]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998;**115**: 468-471.
94. Tandara A, Kadmon M, Stern J, Herfarth C. [Heidelberg polyposis register. Experiences with ileoanal pouch in familial adenomatous polyposis coli (FAP): the ileoanal anastomosis problem zone]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998;**115**: 1411-1413.
95. Church JM, Fazio VW, Lavery IC, Oakley JR, Milsom J, McGannon E. Quality of life after prophylactic colectomy and ileorectal anastomosis in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1996;**39**(12): 1404-1408.
96. Heuschen UA, Heuschen G, Lucas M, Hinz U, Stern J, Herfarth C. [Pre- and postoperative quality of life of patients with ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis with ileoanal pouch operation]. *Chirurg* 1998;**69**(12): 1329-1333.
97. Bulow S, Burn J, Neale K, Northover J, Vasen H. The establishment of a polyposis register. *Int J Colorectal Dis* 1993;**8**(1): 34-38.
98. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 1975;**26**(3): 231-243.
99. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;**250**(10): 4007-4021.
100. Wilkins MR, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Bairoch A, Appel RD. Integrating two-dimensional gel databases using the Melanie II software. *Trends Biochem Sci* 1996;**21**(12): 496-497.
101. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 1996;**14**(1): 61-65.

102. Omenn GS, States DJ, Adamski M, Blackwell TW, Menon R, Hermjakob H, Apweiler R, Haab BB, Simpson RJ, Eddes JS, Kapp EA, Moritz RL, Chan DW, Rai AJ, Admon A, Aebersold R, Eng J, Hancock WS, Hefta SA, Meyer H, Paik YK, Yoo JS, Ping P, Pounds J, Adkins J, Qian X, Wang R, Wasinger V, Wu CY, Zhao X, Zeng R, Archakov A, Tsugita A, Beer I, Pandey A, Pisano M, Andrews P, Tammen H, Speicher DW, Hanash SM. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 2005;**5**(13): 3226-3245.
103. Juan HF, Chen JH, Hsu WT, Huang SC, Chen ST, Yi-Chung Lin J, Chang YW, Chiang CY, Wen LL, Chan DC, Liu YC, Chen YJ. Identification of tumor-associated plasma biomarkers using proteomic techniques: from mouse to human. *Proteomics* 2004;**4**(9): 2766-2775.
104. Ornstein DK, Rayford W, Fusaro VA, Conrads TP, Ross SJ, Hitt BA, Wiggins WW, Veenstra TD, Liotta LA, Petricoin EF, 3rd. Serum proteomic profiling can discriminate prostate cancer from benign prostates in men with total prostate specific antigen levels between 2.5 and 15.0 ng/ml. *J Urol* 2004;**172**(4 Pt 1): 1302-1305.
105. Veenstra TD, Prieto DA, Conrads TP. Proteomic patterns for early cancer detection. *Drug Discov Today* 2004;**9**(20): 889-897.
106. Kuruma H, Egawa S, Oh-Ishi M, Kodera Y, Maeda T. Proteome analysis of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2005;**8**(1): 14-21.
107. Franzen B, Linder S, Alaiya AA, Eriksson E, Fujioka K, Bergman AC, Jornvall H, Auer G. Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions. *Electrophoresis* 1997;**18**(3-4): 582-587.
108. Alaiya AA, Franzen B, Fujioka K, Moberger B, Schedvins K, Silfversvard C, Linder S, Auer G. Phenotypic analysis of ovarian carcinoma: polypeptide expression in benign, borderline and malignant tumors. *Int J Cancer* 1997;**73**(5): 678-683.
109. Alaiya AA, Franzen B, Moberger B, Silfversward C, Linder S, Auer G. Two-dimensional gel analysis of protein expression in ovarian tumors shows a low degree of intratumoral heterogeneity. *Electrophoresis* 1999;**20**(4-5): 1039-1046.

110. Alaiya AA, Franzen B, Auer G, Linder S. Cancer proteomics: from identification of novel markers to creation of artificial learning models for tumor classification. *Electrophoresis* 2000;**21**(6): 1210-1217.
111. Alaiya A, Roblick U, Egevad L, Carlsson A, Franzen B, Volz D, Huwendiek S, Linder S, Auer G. Polypeptide expression in prostate hyperplasia and prostate adenocarcinoma. *Anal Cell Pathol* 2000;**21**(1): 1-9.
112. Alaiya AA, Franzen B, Hagman A, Dysvik B, Roblick UJ, Becker S, Moberger B, Auer G, Linder S. Molecular classification of borderline ovarian tumors using hierarchical cluster analysis of protein expression profiles. *Int J Cancer* 2002;**98**(6): 895-899.
113. Alaiya AA, Roblick UJ, Franzen B, Bruch HP, Auer G. Protein expression profiling in human lung, breast, bladder, renal, colorectal and ovarian cancers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;**787**(1): 207-222.
114. Stulik J, Hernychova L, Porkertova S, Knizek J, Macela A, Bures J, Jandik P, Langridge JI, Jungblut PR. Proteome study of colorectal carcinogenesis. *Electrophoresis* 2001;**22**(14): 3019-3025.
115. Franzen B, Linder S, Okuzawa K, Kato H, Auer G. Nonenzymatic extraction of cells from clinical tumor material for analysis of gene expression by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1993;**14**(10): 1045-1053.
116. Franzen B, Linder S, Alaiya AA, Eriksson E, Uruy K, Hirano T, Okuzawa K, Auer G. Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: down-regulation of cytokeratins. *Br J Cancer* 1996;**74**(10): 1632-1638.
117. Franzen B, Auer G, Alaiya AA, Eriksson E, Uryu K, Hirano T, Okuzawa K, Kato H, Linder S. Assessment of homogeneity in polypeptide expression in breast carcinomas shows widely variable expression in highly malignant tumors. *Int J Cancer* 1996;**69**(5): 408-414.
118. Dunbar BS, Kimura H, Timmons TM. Protein analysis using high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1990;**182**: 441-459.
119. Celis JE. *Cell biology : a laboratory handbook*. Academic Press: San Diego, 1994.
120. Celis JE, Bravo R. *Two-dimensional gel electrophoresis of proteins : methods and applications*. Academic Press: Orlando, 1984; xvi, 487 p.

121. Gorg A, Postel W, Gunther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1988;**9**(9): 531-546.
122. Gorg A, Boguth G, Obermaier C, Posch A, Weiss W. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* 1995;**16**(7): 1079-1086.
123. Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Csordas A, Diaz JJ, Madjar JJ. Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis* 1997;**18**(3-4): 328-337.
124. Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 1997;**18**(3-4): 307-316.
125. Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence JJ. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 1994;**40**(1): 57-75.
126. Oppermann M, Cols N, Nyman T, Helin J, Saarinen J, Byman I, Toran N, Alaiya AA, Bergman T, Kalkkinen N, Gonzalez-Duarte R, Jornvall H. Identification of foetal brain proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry comparison of samples from individuals with or without chromosome 21 trisomy. *Eur J Biochem* 2000;**267**(15): 4713-4719.
127. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *JRSS B*. 1995; 57: 289-300.
128. Fleischer DE JDasoccJ-. JAMA. Detection and surveillance of colorectal cancer. 1989 Jan 27;**261**(4):580-5
129. Ponten F, Berg C, Ahmadian A, Ren ZP, Nister M, Lundeberg J, Uhlen M, Ponten J. Molecular pathology in basal cell cancer with p53 as a genetic marker. *Oncogene* 1997;**15**(9): 1059-1067.
130. Chiosis G, Lucas B, Shtil A, Huezio H, Rosen N. Development of a purine-scaffold novel class of Hsp90 binders that inhibit the proliferation of cancer cells and induce the degradation of Her2 tyrosine kinase. *Bioorg Med Chem* 2002;**10**(11): 3555-3564.
131. Nawrocki S, Murawa P, Malicki J, Karcinska M, Gryska K, Izycki D, Kaczmarek A, Laciak M, Czapczyk A, Karczewska A, Rose-John S, Mackiewicz A.

- Genetically modified tumour vaccines (GMTV) in melanoma clinical trials. *Immunol Lett* 2000;**74**(1): 81-86.
132. Nicchitta CV. Re-evaluating the role of heat-shock protein-peptide interactions in tumour immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**(5): 427-432.
133. Rakonczay Z, Jr., Takacs T, Boros I, Lonovics J. Heat shock proteins and the pancreas. *J Cell Physiol* 2003;**195**(3): 383-391.
134. Berezowski K, Stastny JF, Kornstein MJ. Cytokeratins 7 and 20 and carcinoembryonic antigen in ovarian and colonic carcinoma. *Mod Pathol* 1996;**9**(4): 426-429.
135. Jooss KU, Muller R. Deregulation of genes encoding microfilament-associated proteins during Fos-induced morphological transformation. *Oncogene* 1995;**10**(3): 603-608.
136. Wang Y, Han KJ, Pang XW, Vaughan HA, Qu W, Dong XY, Peng JR, Zhao HT, Rui JA, Leng XS, Cebon J, Burgess AW, Chen WF. Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J Immunol* 2002;**169**(2): 1102-1109.
137. Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C, Jungck M, Kadmon M, Wolf M, Fahnenstich J, Gebert J, Moslein G, Mangold E, Propping P. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* 2001;**48**(4): 515-521.
138. Bisgaard ML, Fenger K, Bulow S, Niebuhr E, Mohr J. Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum Mutat* 1994;**3**(2): 121-125.
139. Maher ER, Barton DE, Slatter R, Koch DJ, Jones MH, Nagase H, Payne SJ, Charles SJ, Moore AT, Nakamura Y, et al. Evaluation of molecular genetic diagnosis in the management of familial adenomatous polyposis coli: a population based study. *J Med Genet* 1993;**30**(8): 675-678.
140. Seliger B, Lichtenfels R, Kellner R. Detection of renal cell carcinoma-associated markers via proteome- and other 'ome'-based analyses. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2003;**2**(3): 194-212.
141. Shau H, Chandler GS, Whitelegge JP, Gornbein JA, Faull KF, Chang HR. Proteomic profiling of cancer biomarkers. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2003;**2**(2): 147-158.

142. Cui JF, Liu YK, Pan BS, Song HY, Zhang Y, Sun RX, Chen J, Feng JT, Tang ZY, Yu YL, Shen HL, Yang PY. Differential proteomic analysis of human hepatocellular carcinoma cell line metastasis-associated proteins. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;**130**(10): 615-622.
143. Petricoin EF, Ornstein DK, Liotta LA. Clinical proteomics: Applications for prostate cancer biomarker discovery and detection. *Urol Oncol* 2004;**22**(4): 322-328.
144. Duggan B, Williamson K. Molecular markers for predicting recurrence, progression and outcomes of bladder cancer (do the poster boys need new posters?). *Curr Opin Urol* 2004;**14**(5): 277-286.
145. Troyer DA, Mubiru J, Leach RJ, Naylor SL. Promise and challenge: Markers of prostate cancer detection, diagnosis and prognosis. *Dis Markers* 2004;**20**(2): 117-128.
146. Huang CM, Elmets CA, van Kampen KR, Desilva TS, Barnes S, Kim H, Tang DC. Prospective highlights of functional skin proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2005;**24**(5): 647-660.
147. Joubert-Caron R, Caron M. Proteome analysis in the study of lymphoma cells. *Mass Spectrom Rev* 2005;**24**(4): 455-468.
148. Chen J, Kahne T, Rocken C, Gotze T, Yu J, Sung JJ, Chen M, Hu P, Malfertheiner P, Ebert MP. Proteome analysis of gastric cancer metastasis by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of metastasis-related proteins. *J Proteome Res* 2004;**3**(5): 1009-1016.
149. Hu W, Wu W, Kobayashi R, Kavanagh JJ. Proteomics in cancer screening and management in gynecologic cancer. *Curr Oncol Rep* 2004;**6**(6): 456-462.
150. Alaiya AA, Franzen B, Hagman A, Silfversward C, Moberger B, Linder S, Auer G. Classification of human ovarian tumors using multivariate data analysis of polypeptide expression patterns. *Int J Cancer* 2000;**86**(5): 731-736.
151. Franzen B, Linder S, Uryu K, Alaiya AA, Hirano T, Kato H, Auer G. Expression of tropomyosin isoforms in benign and malignant human breast lesions. *British journal of cancer* 1996;**73**(7): 909-913.
152. Nishizuka S, Chen ST, Gwadry FG, Alexander J, Major SM, Scherf U, Reinhold WC, Waltham M, Charboneau L, Young L, Bussey KJ, Kim S, Lababidi S, Lee JK, Pittaluga S, Scudiero DA, Sausville EA, Munson PJ, Petricoin EF, 3rd,

Liotta LA, Hewitt SM, Raffeld M, Weinstein JN. Diagnostic markers that distinguish colon and ovarian adenocarcinomas: identification by genomic, proteomic, and tissue array profiling. *Cancer Res* 2003;**63**(17): 5243-5250.

153. Roblick UJ: Undifferentiated Pelvic Adenocarcinoma: Diagnostic Potential of Protein Profiling and Principal Component Analysis. In Press

154. Schmiegel W, Pox C, Adler G, Fleig W, Fölsch UR, Frühmorgen P, Graeven U, Hohenberger W, Holstege A, Junginger T, Kühlbacher T, Porschen R, Propping P, Riemann JF, Sauer R, Sauerbruch T, Schmoll HJ, Zeitz M, Selbmann HK; Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten: [S3-Guidelines Conference "Colorectal Carcinoma" 2004] *Z Gastroenterol.* 2004 Oct;42(10):1129-77.

Anhang

Reagenzien:

Franzen Technik

1. 5ml RPMI-1640
(angereichert mit 5% fetales Kälberserum + 0,2nM Phenylmethylsulfonyl Fluorid / 0,83nM Benzamidin)
2. Percoll Lösung (54,7% PBS)
3. PBS Puffer pH 7,4

1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung

1. 7M UREA
2. 2M Thiourea
3. 1% 3-(3-Chloramidopropyl) Dimethylammonio-1-propanesulfonate (CHAPS)
4. 0,4% IPG Puffer
5. 0,3% Dithiothreitol (DTT)

2. Dimension: SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

1. 376nM Tris Puffer 8pH 8,8)
2. 10% Natrium-dodecylsulfat (SDS)
3. 10% Ammonium Persulphat + TEMED (Polymerisation)

Proteinfragmentierung zur Massenspektrometrischen Identifikation

1. 100µl 50nM Ammoniumbicarbonat/ 50% Acetonitril
2. 10mM DTT
3. 30µl 5% Formic Acid/ 2% Acetonitril
4. 24µl 2,5% Formic Acid/ 50% Acetonitril

Entsalzen der extrahierten Proteine

1. 10µl 70% Acetonitril/ 0,1% Trifluoressigsäure
2. 10µl 50% Acetonitril/ 0,1% Trifluoressigsäure
3. 10µl 0,1% Trifluoressigsäure

Danksagung:

Herrn Professor Dr. H.-P. Bruch danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation an der Klinik für Chirurgie des UK-SH Campus Lübeck zu erarbeiten.

Herrn PD Dr. Conny Bürk gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas. Seine wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung waren mir jederzeit eine große Hilfe.

Herrn Dr. Dr. U. J. Roblick danke ich für seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Seine Fähigkeit, genauestens in der Materie orientiert zu sein, und ständig neue Ideen und Vorschläge zu entwickeln, hat mich während meiner Arbeit sehr motiviert. Gleichzeitig habe ich durch Ihn die phantastische Stadt Stockholm kennengelernt.

Herrn Professor Dr. G. Auer danke ich für die Möglichkeit, Teile der Dissertation im Labor der Unit of Cancer Proteomics, Div. of Cellular and Molecular Tumor Pathology, Department of Oncology and Pathology, Cancer Center Karolinska, Karolinska Institute and Hospital, Stockholm, Schweden erstellen zu können.

Herrn Professor Dr. H. Jörnvall, Sekretär des Nobelkomitees für Physiologie und Medizin, der mir die massenspektrometrische Analyse zur Identifikation der detektierten Proteine in seinem Institut für Biophysik am Karolinska Institut in Stockholm möglich machte, gilt mein besonderer Dank.

Frau Professor Dr. G. Möslein, die mein klinisches und wissenschaftliches Interesse für hereditäre Karzinome in jeder Hinsicht stets konstruktiv gefördert hat.

Ich danke Herrn Dr. Alexander Ploner, der die statistische Auswertung der gewonnenen Daten übernommen hat.

Des weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern im Labor der Unit of Cancer Proteomics, Cancer Center Karolinska, Karolinska Institute and Hospital, Stockholm, Schweden, insbesondere Frau Susanne Becker sowie Frau Vera Grobleben im Labor der Klinik für Chirurgie des UK-SH Campus Lübeck. Sie haben mich mit viel Zeit, Geduld und Engagement in die Materie eingearbeitet und haben wesentlichen Anteil daran, dass ich mit Freude an der Sache zur Arbeit gekommen bin.

Letztendlich danke ich meiner Familie, die mich jederzeit bei der Fertigstellung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Veröffentlichungen:

Originalarbeiten:

1. Roblick UJ, **Unger A**, Bader F, Bruch HP, Becker S, Auer G, Habermann J. Comparing the protein profiles of hereditary FAP and sporadic colorectal cancer – a multiproteomic analysis. Clinical Proteomics (submitted)
2. Roblick UJ, Lenander C, Bader FG, **Unger A**, Zimmermann K, Hellman U, Becker S, Ost Å, Alaiya A, Bruch HP, Auer G, Habermann J (2007) Undifferentiated Pelvic Adenocarcinomas: Diagnostik potential of Protein Profiling and Multivariate Analysis. International J Colorectal Dis. Accepted for publication
3. **Unger A***, Bader F*, Bruch HP, Becker S, Auer G, Habermann J., Roblick UJ Protein fingerprinting of Familial Adenomatous Polyposis Coli. Oncogene (submitted)
*geteilte Erstautorenschaft

Vorträge:

1. **Unger A**, Zimmermann K, Bruch HP, Jörnvall H, Auer G, Möslein G, Roblick UJ (2004) Vergleich der Proteinexpression der familiären Adenomatosis Polyposis (FAP) zum sporadischen Kolonkarzinom – eine Multiproteomanalyse. CAMO Mannheim (2004)
2. Zimmermann K, **Unger A**, Bruch HP, Auer G, Roblick UJ (2004) p53 targets identified by protein expression profiling after hypoxia treatment. Westerbänder Physiologische Gespräche, Sylt (2004)
3. **Unger A**, Zimmermann K, Bruch HP, Jörnvall H, Auer G, Möslein G, Roblick UJ Proteinexpression der familiären Adenomatosis Polyposis (FAP) München 2005. DGCH Jahreskongress
4. Roblick UJ, **Unger A**, Habermann J. Proteinexpression in human colorectal cancer. Chirurgisches Forum. 2006 DGCH Jahreskongress Berlin
5. Roblick UJ, **Unger A**, Habermann J., Auer G. Proteome Analysis in Cancer. European Proteome Works Seminar Stockholm 2006
6. Roblick UJ, **Unger A**, Habermann J., Auer G. Expression Profiling in Human Malignancies Stockholm 2007

Lebenslauf:



Persönliche Daten:

Name:	Unger, Andreas
Geburtsdatum, -ort:	31.12.1970 in Bensheim
Familienstand:	ledig
Eltern:	Dr. med. Christoph Unger Karin Olga Felicitas Unger

Schulbildung:

1977-1981	Dr. Weiß Grundschule, Eberbach
1981-1990	Hohen-Staufen-Gymnasium, Eberbach

Wehrdienst:

07/1990-06/1991	Gebirgsjägerbataillon 4/232 in Berchtesgaden
-----------------	--

Hochschulbildung:

1991 – 1994	Vorklinischer Abschnitt an der Ludwig Maximilian Universität München
1994 – 1995	Klinischer Abschnitt an der Freien Universität Berlin
1995 – 1998	Klinischer Abschnitt an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

1994	Physikum
1995	Erstes Staatsexamen
1997	Zweites Staatsexamen
1998	Drittes Staatsexamen

Arzt im Praktikum:

01.01.1999-31.01.2000	Chirurgische Klinik, Rotes Kreuz Krankenhaus Kassel, Lehrkrankenhaus der Universität Marburg
01.02.2000-30.06.2000	Klinik für Allgemeine- und Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Assistenzarzt:

01.07.2000-31.03.2004	Klinik für Allgemeine- und Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf
01.04.2004-31.01.2006	Klinik für Visceral-, Thorax-, und Gefäßchirurgie, UK-SH Campus Lübeck
seit 24.08.2005	Facharzt für Chirurgie
seit 01.02.2006	Klinik für Unfallchirurgie, UK-SH Campus Lübeck
seit 01.05.2006	tätig als Notarzt am UK-SH Campus Lübeck