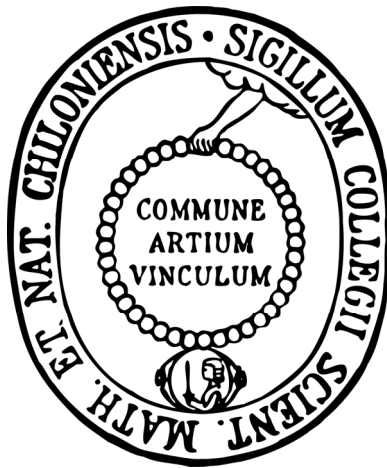


G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als prädiktive und therapeutische Zielstrukturen des Magenkarzinoms



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Eva Simon

Kiel, 2012

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch
Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med. Christoph Röcken

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2012
Zum Druck genehmigt: 14.12.2012

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Krebs in Deutschland	1
1.2	Das Magenkarzinom	3
1.2.1	Epidemiologie	3
1.2.2	Pathogenese	4
1.2.3	Pathologie	8
1.2.4	Präkanzeröse Läsion	10
1.2.5	Familiäre und hereditäre Syndrome	11
1.2.6	Prognose	11
1.2.7	Therapie	11
1.3	Stammzellen und Krebs	12
1.3.1	Stammzellen	12
1.3.2	Krebsstammzellen	13
1.3.3	Side Population und Stammzellmarker	15
1.3.4	Krebsstammzellen und die EMT	15
1.4	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	16
1.5	Wichtige Signaltransduktionswege der Tumorbilogie	19
1.5.1	Der Notch-Signalweg	20
1.5.2	Der Wnt-Signalweg	22
1.5.3	Der EGFR-Signalweg	24
1.5.4	Das Triple-membrane-passing Signal	27
1.6	Fragestellung und Ziele	29
<u>2</u>	<u>Material</u>	30
2.1	Chemikalien	30
2.2	Kits	31
2.3	Oligonukleotide	32
2.4	Enzyme	32
2.5	Antikörper	32
2.6	Bakterien und Zellen	33
2.7	Vektoren	33
2.8	Medien	33
2.9	Puffer	34
2.10	Geräte	35
2.11	Software	37

3	Methoden	38
3.1	Probenauswahl	38
3.2	Molekularbiologische Methoden	41
3.2.1	RNA-Isolation	41
3.2.2	DNase-Verdau	42
3.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung	42
3.2.4	GeneChip Analyse	42
3.2.5	cDNA-Synthese	43
3.2.6	Qualitative RT-PCR	44
3.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	46
3.2.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Gelen	47
3.2.9	Sequenzierung	47
3.2.10	Quantitative Real-time RT-PCR	48
3.2.11	DNA-Isolation	51
3.2.12	Fragmentanalyse	52
3.3	Proteinbiochemie	52
3.3.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen	52
3.3.2	Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe	52
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
3.3.4	Western-Blot-Analyse	53
3.3.5	Herstellung eines Antikörpers	55
3.3.6	Immunfluoreszenz	57
3.3.7	Immunzytochemie	58
3.3.8	Immunhistochemie	58
3.4	Klonierung eines Expressionkonstrukts für LGR5	60
3.4.1	Expressionsvektor pcDNA3.1(-)	60
3.4.2	Transformation von E. coli	61
3.4.3	Plasmidpräparation	62
3.4.4	Restriktionsverdau und Gelkontrolle	62
3.4.5	Dephosphorylierung	63
3.4.6	Vorbereitung des Inserts	63
3.4.7	Ligation	64
3.5	Zellkultur	65
3.5.1	Standardbedingungen bei der Arbeit mit Zellkulturen	65
3.5.2	Transfektion	67
3.5.3	Zellbasierte Assays	68
3.6	Statistische Auswertung	72
4	Ergebnisse	73
4.1	Suche nach differentiell exprimierten GPCRs und Stammzellmarkern im Magenkarzinom	74
4.2	Expressionsanalyse von CXCL12, CXCR4, ADAM17 und FZD7 im Magenkarzinom	81

4.2.1	CXCL12 und CXCR4 sind im Magenkarzinom differentiell exprimiert	82
4.2.2	Die Expression von ADAM17 ist im Magenkarzinom signifikant erhöht	88
4.2.3	Die FZD7-Expression korreliert mit dem Patientenüberleben	92
4.3	LGR5 in der humanen Tumorigenese	95
4.3.1	Die LGR5-Expression ist im Magenkarzinom erhöht	95
4.3.2	Die Lokalisation der LGR5-positiven Zellen verändert sich während der Tumorigenese	110
4.3.3	Die Expression von LGR5 ist in verschiedenen hepato-gastrointestinalen Karzinomen erhöht	115
4.3.4	Die funktionelle Relevanz von LGR5 im Magenkarzinom	121
<u>5</u>	<u>Diskussion</u>	<u>128</u>
5.1	Die Rolle von CXCL12 und CXCR4 im Magenkarzinom	129
5.2	Die Bedeutung von ADAM17 für das Magenkarzinom	131
5.3	Die Expression von FZD7 im Magenkarzinom	135
5.4	Die Rolle von LGR5 in der humanen Tumorigenese	137
5.4.1	Die Expression von LGR5 im Magenkarzinom	137
5.4.2	Die Charakterisierung LGR5-positiver Zellen im Magen	139
5.4.3	Die klinische Relevanz der Lokalisation von LGR5-positiven Zellen im Magenkarzinom	143
5.4.4	Die LGR5-Expression in hepato-gastrointestinalen Karzinomen	147
5.4.5	Die Funktion von LGR5 im Magenkarzinom	149
5.4.6	LGR5 im Wnt-Signalweg	154
<u>6</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>157</u>
<u>7</u>	<u>Summary</u>	<u>159</u>
<u>8</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>161</u>
<u>9</u>	<u>Anhang</u>	<u>187</u>
9.1	Abkürzungsverzeichnis	187
9.2	Abbildungsverzeichnis	189
9.3	Tabellenverzeichnis	190
9.4	Lebenslauf	191
9.5	Ethikvotum	192
<u>10</u>	<u>Publikationen</u>	<u>193</u>
<u>11</u>	<u>Danksagung</u>	<u>195</u>
<u>12</u>	<u>Erklärungen</u>	<u>196</u>

1 Einleitung

1.1 Krebs in Deutschland

Krebs ist nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit einem Anteil von ca. 29 % die zweithäufigste Krankheits- und Todesursache in Industrieländern [1]. Jährlich erkranken etwa 250.000 Männer und 220.000 Frauen in Deutschland an Krebs. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für beide Geschlechter bei circa 69 Jahren [2]. Die häufigsten Tumor-Lokalisationen des Mannes sind Prostata, Darm und Lunge, bei Frauen die Brustdrüsen und ebenfalls Darm und Lunge (Abbildung 1.1) [2]. Ursächlich für die Entstehung von Krebs sind Veränderungen im Genom von Zellen, infolgedessen Protoonkogene und Entwicklungskontrollgene aktiviert und Tumorsuppressorgene und Differenzierungsgene inaktiviert werden [3]. Mutationen in DNA-Reparaturgenen (*BRCA1*) können das Genom zusätzlich destabilisieren und eine erhöhte Mutationsrate bedingen. Letztendlich resultieren genetische Alterationen in Protoonkogenen (z. B. *Ras*, *MYC*, *Wnt*), Tumorsuppressorgenen (*p53*) und Genen, die den Zellzyklus regulieren (*p16*), in einer Störung des Gleichgewichts zwischen Wachstum, Teilung und Apoptose [3,4]. Daher sind insbesondere Einflüsse, die das Erbgut verändern, krebserregend. Als allgemeine Risikofaktoren gelten das Rauchen, Übergewicht und falsche Ernährung, chronische Infektionen, hoher Alkoholkonsum sowie Umwelteinflüsse wie UV-Licht, Feinstaub oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe [5]. Da die meisten Krebsleiden im höheren Alter auftreten, hat der veränderte Altersaufbau der Bevölkerung, insbesondere bei Männern, in den letzten Jahren zu einem Anstieg der Krebserkrankungen geführt. Laut Statistik erkranken 43 % aller Frauen und sogar jeder zweite Mann im Laufe des Lebens an Krebs [2].

Unter dem Begriff „Krebs“ werden im Allgemeinen maligne Gewebeneubildungen zusammengefasst, die sich durch unkontrolliertes Wachstum und Vermehrung von entarteten Zellen auszeichnen. Krebszellen können umliegendes Gewebe zerstören, von ihrem Ursprungsort aus über das Blut- oder Lymphsystem in andere Organe einwandern und dort Tochtergeschwülste (Metastasen) ausbilden [3]. Unbehandelt führen Krebserkrankungen oft zum Tod des Patienten. Entsprechend des Ursprungsgewebes unterscheidet man

Karzinome, Sarkome und hämatologische Neoplasien [3]. Karzinome sind maligne epitheliale Geschwülste, die aus der Haut oder Schleimhaut hervorgehen und über 80 % aller bösartigen Tumoren ausmachen. Als Sarkome werden maligne mesenchymale Tumoren, die von Stütz- und Bindegewebe ausgehen, bezeichnet. Die hämatologischen Neoplasien fassen schließlich alle Tumoren des blutbildenden und lymphatischen Gewebes zusammen [3].

Hanahan und Weinberg beschreiben acht essentielle zellphysiologische Veränderungen, die gemeinsam zu malignem Wachstum in den unterschiedlichen Krebsleiden führen. Diese Veränderungen umfassen die Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Apoptoseresistenz, unbegrenztes Replikationspotential, fortwährende Angiogenese, Gewebeinvasion und Metastasierung sowie die Umprogrammierung des Energiestoffwechsels und die Umgehung der Zerstörung durch das Immunsystem [6].

Die Karzinome des Hepato-Gastrointestinaltrakts stellen mit einem Anteil von 20-25 % und europaweit mehr als 700.000 Betroffenen allein im Jahre 2008, die größte Gruppe aller Krebsleiden dar [7]. Insbesondere mit dem Kolorektal- und dem Magenkarzinom führen sie die Liste der krebsinduzierten Tode weltweit an [5].

1.2 Das Magenkarzinom

Das Magenkarzinom ist ein maligner epithelialer Tumor der Magenschleimhaut. Er stellt mit jährlich etwa 930.000 Neuerkrankungen eines der häufigsten bösartigen Tumorleiden weltweit dar. Global betrachtet, steht das Magenkarzinom an zweiter Stelle der tumorbedingten Todesursachen und wird in seiner Mortalität nur vom Lungenkrebs übertroffen. Da viele Magenkarzinome erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit diagnostiziert werden, ist die 5-Jahres-Überlebensrate mit unter 30 % eher schlecht [5].

1.2.1 Epidemiologie

Auch in Deutschland ist das Magenkarzinom eines der meist verbreiteten Krebsleiden mit 16.400 Neuerkrankungen im Jahr 2008 (siehe Abbildung 1.1) [2]. Trotz rückläufiger Inzidenz, die vorwiegend den intestinalen Typ betrifft, ist das Magenkarzinom nach wie vor eine häufige tumorbedingte Todesursache. Männer erkranken mit etwa 9.600 Fällen jährlich und einem mittleren Erkrankungsalter von 70 Jahren deutlich öfter und auch früher am Magenkarzinom als Frauen [2].

Aufgrund von Unterschieden in der Ernährung, Lebensführung und der Häufigkeit bakterieller und viraler Infektionen, variiert die Inzidenz je nach geographischer Region. In den meisten europäischen Ländern ist die Zahl der Neuerkrankungen während der letzten 50 Jahre um 60 % gesunken.

Weltweit ist das Magenkarzinom der vierthäufigste bösartige Tumor [8]. Regionen mit der höchsten Inzidenz sind Japan, China, Osteuropa und Teile Südamerikas. Niedrige Raten haben Nordamerika, Indien, die Philippinen, viele Länder Afrikas und Westeuropas sowie Australien [5].

Das Magenkarzinom ist eine Erkrankung des Alters, es ist bei den unter 30-jährigen sehr selten, mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz jedoch rasch an und erreicht in der Altersgruppe der über 85-jährigen den Höchstwert [2,9].

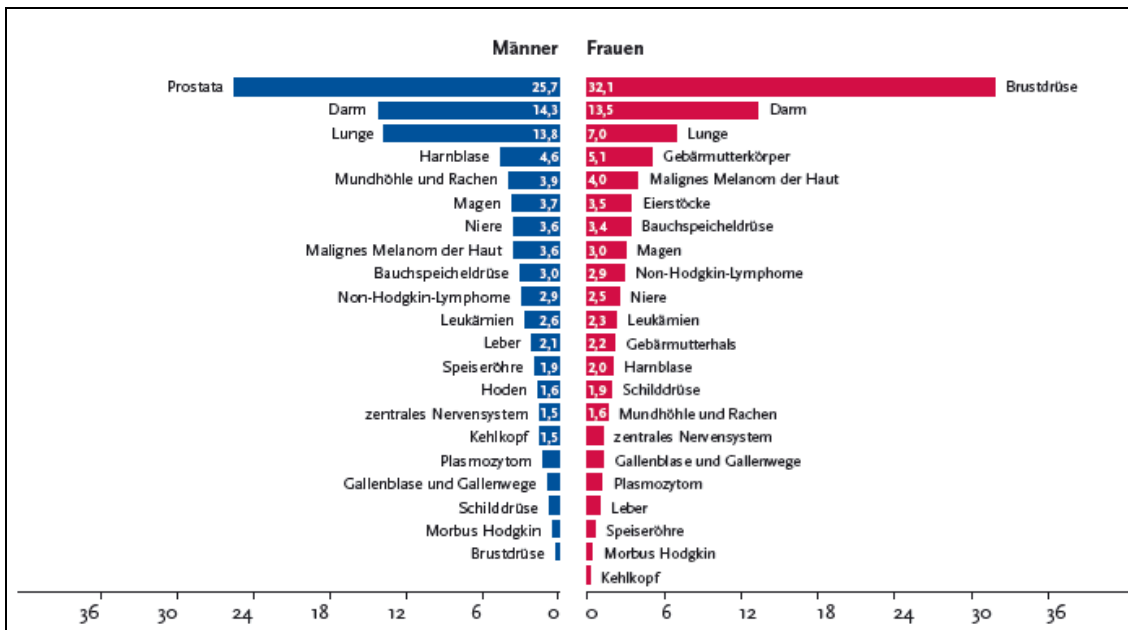


Abbildung 1.1 Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008.

Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen aller Krebsneuerkrankungen (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) in Deutschland 2008.

Quelle: Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Krebs in Deutschland 2007/2008, Robert Koch-Institut, Berlin 2012 [2].

1.2.2 Pathogenese

Die Entstehung des Magenkarzinoms wird von Correa *et al.* in seinem Modell als eine Abfolge von Veränderungen postuliert, bei denen die Magenschleimhaut, ausgehend vom gesunden Zustand, in eine chronische Gastritis übergeht. Über eine multifokale Atrophie mündet diese schließlich in einer intestinalen Metaplasie, die sich zur Dysplasie und am Ende zu einem invasiven Karzinom entwickelt (siehe Abbildung 1.2) [10]. Umstände, die eine übermäßige Zellproliferation des Magenepithels hervorrufen, erhöhen die Wahrscheinlichkeit von Fehlern bei der Replikation. Dies kann durch verschiedene Risikofaktoren wie Ernährung, chronische Infektionen, berufsbezogene, genetische oder präneoplastische Faktoren induziert werden [3].

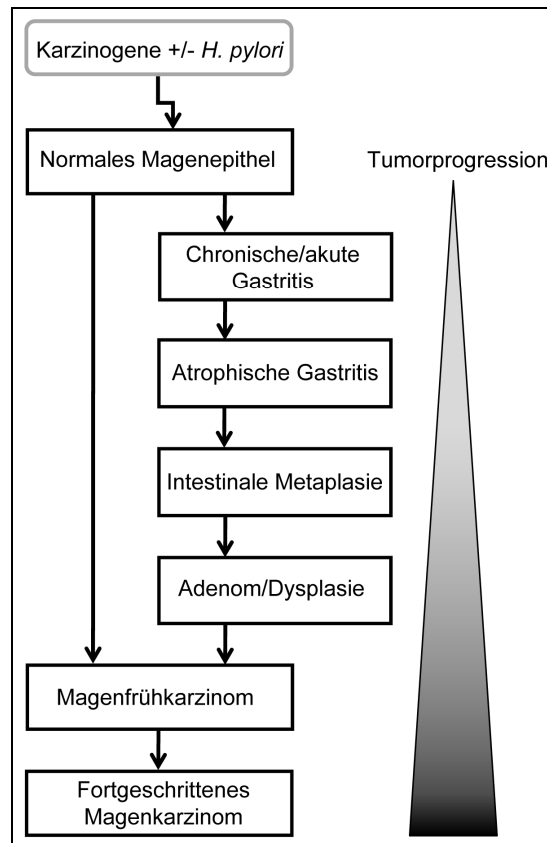


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der gastralen Karzinogenese.

Die Karzinogenese des Magens beinhaltet eine Reihe von Ereignissen, beginnend mit einer *Helicobacter pylori*-induzierten (*H. pylori*) Gastritis, die zu einer chronisch atrophischen Gastritis, intestinalen Metaplasie, Dysplasie und letztendlich zu einem Magenkarzinom voranschreitet. Formal-pathogenetisch kann das Magenkarzinom aber auch ohne erkennbare Vorläuferläsionen *de novo* entstehen. Abbildung modifiziert nach Correa [10].

1.2.2.1 Ernährung und Lebensführung

Ernährungsgewohnheiten spielen bei der Entstehung des Magenkarzinoms eine große Rolle, da Karzinogene, die mit der Nahrung aufgenommen werden oder durch deren Zubereitung entstehen, zur Entwicklung des Tumors beitragen können. Als Risikofaktor gilt der Genuss von getrockneten, geräucherten und stark gesalzenen Speisen, wie gepökeltem Fleisch oder Fisch. Die massive Aufnahme von Nitraten führt durch eine bakterielle Umwandlung in karzinogene Nitrite und Nitrosamine zu einer Schädigung der Mukosa [3]. Der Verzehr von frischem Obst und Gemüse mit hohem Antioxidantiengehalt (Vitamin A, C, E) wirkt dem entgegen. Chronisches Sodbrennen im Zuge einer gastroösophagealen Refluxkrankheit erhöht das Risiko für Tumoren im Übergangsbereich vom Magen zur Speiseröhre [2]. Insbesondere Raucher tragen ein zweifach

erhöhtes Risiko, an einem Magenkarzinom zu erkranken, da Nikotin die Proliferation von Magenkarzinomzellen sowie das Tumorwachstum beschleunigt und eine Neovaskularisierung stimuliert [11]. Auch übermäßiger Alkoholkonsum begünstigt eine chronische Entzündung mit Schleimhautveränderungen, wie z. B. eine chronisch-atrophische Gastritis oder Magengeschwüre [9].

1.2.2.2 Genetische Risikofaktoren

Neben den Ernährungs- und Lebensgewohnheiten haben auch genetische Faktoren einen Einfluss auf die Tumorigenese des Magenkarzinoms. So ist seit Jahrzehnten bekannt, dass Menschen mit der Blutgruppe A ein um etwa 20 % höheres Risiko tragen, an einem Magenkarzinom zu erkranken [9]. Perniziöse Anämie und Morbus Ménétrier stellen weitere Risikofaktoren dar. Darüber hinaus gibt es das familiäre diffuse Magenkarzinom, das auf eine Keimbahnmutation im E-Cadherin Gen (*CDH1*) zurückgeführt wird (*hereditary diffuse gastric cancer*, HDGC) [12]. Allgemein sind verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, Zellzyklusregulatoren, Zelladhäsionsmolekülen und DNA-Reparaturgenen beschrieben, die an der gastralen Karzinogenese beteiligt sind [13].

1.2.2.3 Gastritis

Unter Gastritis versteht man eine akute oder chronische Entzündung der Magenschleimhaut, die mit einer erhöhten Produktion von Oxidantien und reaktiven Stickstoff-Intermediaten wie Stickstoffmonoxid assoziiert ist. Die Gastritis und Magenschleimhautatrophie verändern die Magensäureproduktion, erhöhen den pH-Wert im Magen und verändern die Flora der Magenschleimhaut zugunsten von Anaerobiern [9].

Die **Autoimmungastritis** im Magenkorpus und -fundus ist einer der Hauptgründe für die atrophische Gastritis und geht mit der Produktion von Autoantikörpern gegen Parietalzellen und gegen den *Intrinsic Factor* einher [3]. Durch den Untergang der Parietalzellen und die fehlende Produktion des *Intrinsic Factors* kommt es zu einer Achlorhydrie und einer Störung der DNA-Synthese. Langfristig führt die chronisch atrophische Gastritis zu einem erheblich gesteigerten Magenkarzinomrisiko [13].

1.2.2.4 *Helicobacter pylori*

Eine bakterielle Infektion mit dem Magenkeim *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), führt zu einer chronischen Entzündung der Schleimhaut, vorrangig im Magen-antrum, und stellt so einen der wichtigsten Risikofaktoren für das Magenkarzinom dar. Aufgrund einer Immunreaktion gegen das bakterielle Antigen wird die Mukosa indirekt geschädigt. Die Bildung von Proteasen, Oxidasen und zytotoxischen Produkten durch das Bakterium lädiert die Epithelzellen außerdem direkt [3]. Die andauernde Infektion resultiert in einer chronischen Gastritis und ist mit einer Magenatrophie und intestinalen Metaplasie assoziiert. Epidemiologische Studien weltweit zeigen einen Zusammenhang zwischen einer *H. pylori*-Infektion und der Entwicklung von Magenkarzinomen [14,15]. Dabei vermitteln Stämme mit dem Virulenzfaktor CagA ein deutlich höheres Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms als CagA-negative Stämme [16]. Insgesamt werden etwa 63 % der Magenkarzinome auf eine Infektion mit *H. pylori* zurückgeführt [5]. Begleitend zu einer *H. pylori*-induzierten Gastritis können in 6-20 % Ulkuskrankheiten auftreten, die aber nur in 1 % der Fälle zu einem Magenkarzinom führen [17]. Eine Eradikationstherapie zur Elimination des Bakteriums kann zu einer Rückbildung früher Vorläuferläsionen führen und die Inzidenz des Magenkarzinoms reduzieren [18].

1.2.2.5 *Intestinale Metaplasie*

Als Antwort auf eine chronisch atrophische Gastritis kann es zur Umwandlung der Magenschleimhaut in eine intestinal differenzierte Schleimhaut kommen. Die intestinale Metaplasie stellt selbst keine präkanzeröse Läsion dar, ist aber ein Indikator für ein bis zu 10-fach erhöhtes Magenkarzinomrisiko [3].

1.2.2.6 *Operationen*

Durch eine Teilresektion des Magens, z. B. die Billroth II Operation, steigt das Magenkarzinomrisiko nach 5-20 Jahren ebenfalls deutlich an. Aufgrund eines verstärkten Galle-Reflux kann es zu einer chronischen Entzündung kommen, die die Inzidenz für eine Dysplasie erhöht [19].

1.2.3 Pathologie

Das Magenfrühkarzinom ist ein auf die Mukosa oder Submukosa begrenztes Adenokarzinom. Aufgrund fehlender oder nur unspezifischer Symptome, wie Dyspepsie, wird das Magenkarzinom oftmals erst sehr spät diagnostiziert [20]. Etwa 80 % der Patienten leiden bei der Erstdiagnose bereits an einem Magenkarzinom im fortgeschrittenen Stadium, da sie erst mit schwerwiegenden Symptomen wie Übelkeit und Erbrechen, Gewichtsverlust, epigastrischen Schmerzen, gastrointestinalen Blutungen oder Perforationen bei ihrem Arzt vorstellig werden [9]. Gastroskopie und Biopsie haben eine zentrale Bedeutung in der Diagnostik des Magenkarzinoms, da nur ein Pathologe anhand der Gewebeprobe eine präzise Diagnose stellen kann. Die endoskopisch sichtbaren Veränderungen der Farbe, Beschaffenheit und des Aufbaus der Magenschleimhaut ermöglichen eine makroskopische Klassifikation des Karzinoms [9]. Aufgrund der morphologischen Heterogenität gibt es eine Vielzahl von Klassifikationen, die auf dem histologischen Erscheinungsbild, dem Grad der Differenzierung, dem Wachstumsmuster und der Histogenese basieren [3].

Mit der so genannten Borrmann-Klassifikation lassen sich Adenokarzinome des Magens nach ihrer makroskopischen Wuchsform kategorisieren [3]. Eine Stadieneinteilung erfolgt nach der gängigen Tumor-Nodus-Metastasen-Klassifikation (TNM-Klassifikation), basierend auf der Größe der Primärläsion, ihrer Tiefenausdehnung (T-Kategorie), dem Ausmaß des lokalen Lymphknotenbefalls (N-Kategorie) und den Fernmetastasen (M-Kategorie). Derzeit gültig ist die 7. Auflage der *Union for International Cancer Control (UICC) TNM: Klassifikation maligner Tumoren* (siehe Tabelle 1.1) [21].

Tabelle 1.1 TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms

Primärtumor (T)	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	<i>Carcinoma in situ</i> : intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert Lamina propria, Muscularis mucosae oder Submukosa
	T1a Tumor infiltriert Lamina propria oder Muscularis mucosae
	T1b Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Subserosa
T4	Tumor perforiert Serosa (viszerales Peritoneum) oder infiltriert benachbarte Strukturen (Milz, Colon transversum, Leber, Zwerchfell, Pankreas, Bauchwand, Nebenniere, Niere, Dünndarm, Retroperitoneum)
	T4a Tumor perforiert Serosa
	T4b Tumor infiltriert benachbarte Strukturen
Regionäre Lymphknoten (N)	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 bis 2 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 3 bis 6 regionären Lymphknoten
N3	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
	N3a Metastasen in 7 bis 15 regionären Lymphknoten
	N3b Metastasen in 16 oder mehr regionären Lymphknoten
Fernmetastasen (M)	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Quelle: C. Wittekind und H. J. Meyer (2010) TNM: Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage. *Union for International Cancer Control (UICC)* [21].

Histologische Klassifikation

Die histologische Typisierung und Graduierung der Magenkarzinome erfolgt grundsätzlich nach der Klassifikation der *World Health Organisation* (WHO-Klassifikation) [22]. Im Magen überwiegt mit einem Anteil von 90 % das Adenokarzinom, seltenere Formen sind Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse und undifferenzierte Karzinome.

Weit verbreitet ist die histopathologische Einteilung des Magenkarzinoms nach der Laurén-Klassifikation [23]. Sie unterscheidet im Wesentlichen den intestinalen vom diffusen Typ. Karzinome vom intestinalen Typ machen einen Anteil von 60 % der Magenkarzinome aus. Diese Karzinome haben häufig den Hintergrund einer intestinalen Metaplasie, sind histologisch durch ein kohäsives Wachstum der Tumorzellen in neoplastischen Drüsenverbänden charakterisiert und sind meist gut differenziert. Sie bleiben eher lokal begrenzt und haben generell eine bessere Prognose. Der diffuse Subtyp enthält hingegen keine Drüsen, ist schlecht differenziert und metastasiert früher. Charakteristisch ist eine diffuse Infiltration der Magenwand durch Einzelzellen oder Zellstränge mit häufig siegelringzelliger Differenzierung [3].

1.2.4 Präkanzeröse Läsion

Für das Magenkarzinom gelten intraepitheliale Neoplasien, Adenome und Polypen als präkanzeröse Läsionen, das heißt als histopathologische Veränderungen, aus denen sich mit höherer Wahrscheinlichkeit ein Karzinom entwickeln kann [3,24]. Die Dysplasie ist eine zweifelsfrei neoplastische Läsion ohne Zeichen der Invasion und beschreibt viele zelluläre und strukturelle Atypien, die unter dem Begriff intraepitheliale Neoplasie zusammengefasst sind [24]. Als Adenom bezeichnet man eine überwiegend tubulär, selten villös aufgebaute, zunächst gutartige Geschwulst, die maligne entarten kann. Auch die hyperplastischen Polypen stellen eine präkanzeröse Läsion dar. Sie kommen typischerweise im Antrum bei einer *H. pylori*-Gastritis vor und gehen nur selten in ein Karzinom über [3,24].

1.2.5 Familiäre und hereditäre Syndrome

Obwohl das Magenkarzinom in den meisten Fällen (89 %) sporadisch auftritt, gibt es in bis zu 10 % der Fälle einen familiären und in 1 % einen hereditären Anteil. Verwandte ersten Grades haben aufgrund von Erb- und Umweltfaktoren ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko, an einem Magenkarzinom zu erkranken [2]. Beispiele für vererbare Syndrome, die häufig in ein Magenkarzinom übergehen, sind das hereditäre diffuse Magenkarzinom (HDGC), gastrointestinale Stromatumoren (GIST), das Lynch-Syndrom und das hereditäre nicht-Polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom (HNPCC), die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das Li-Fraumeni-Syndrom sowie das Polyposis-Syndrom des Magens (GAPPS, *gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach*) und das Peutz-Jaegher-Syndrom [3,25,26].

1.2.6 Prognose

Trotz enormer Verbesserungen in Diagnose- und Behandlungstechniken bleibt die Prognose des fortgeschrittenen Magenkarzinoms schlecht [13]. Aufgrund der späten klinischen Manifestation werden viele Magenkarzinome erst im Stadium T2 oder T3 entdeckt. Daher liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland unter 30 % [2].

Die Prognose korreliert mit dem Tumorstadium und verschlechtert sich mit zunehmendem Grad der Infiltration. Größte prognostische Aussagekraft haben hier die TNM-Klassifikation und insbesondere der Nachweis von Lymphknotenmetastasen. Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen reduziert die 5-Jahres-Überlebensrate von 91,5 % (N0) auf bis zu 11,8 % (N3b). Von Bedeutung ist dabei das Verhältnis von befallenen zu insgesamt resezierten Lymphknoten [27].

1.2.7 Therapie

Die Therapiemöglichkeiten des Magenkarzinoms umfassen die chirurgische Resektion des Magens, Chemo- und/oder Radiotherapie. Neue Behandlungsansätze sowie biologische Therapien und verbesserte zielgerichtete Strategien, wie beispielsweise die Verwendung des HER2/neu-Antikörpers Trastuzumab werden aktuell in klinischen Studien ausgetestet [28,29].

Eine chirurgische Intervention in Form einer Gastrektomie und der Entfernung der regionären Lymphknoten stellt die Therapie der Wahl dar und kann im Frühstadium kurativ sein. Im fortgeschrittenen Stadium sind die therapeutischen Möglichkeiten inklusive Chemotherapie und Bestrahlung jedoch von begrenztem Erfolg. Für die systemische Chemotherapie stellen auf Cisplatin, 5-Fluorouracil und Doxorubicin basierende Kombinationstherapien die Basis dar [28]. Allerdings ist die Behandlung nicht bei allen Magenkarzinomen wirksam, ein wesentlicher Anteil der Patienten erlebt trotz des anfänglichen Ansprechens auf die chemotherapeutische Behandlung einen Rückfall der Erkrankung [30].

1.3 Stammzellen und Krebs

1.3.1 Stammzellen

Schon 1875 postulierte Cohnheim, dass humane Tumoren aus Stammzellen entstehen, die während der embryonalen Entwicklung übrig geblieben sind [31]. Neuere Untersuchungen bestätigen diese Theorie und zeigen, dass Stammzellen neben ihren vielseitigen positiven Eigenschaften auch den Ursprung von Krebszellen darstellen können [32]. Allgemein werden Stammzellen durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und dem Potenzial, sich in verschiedene Zelltypen und Gewebe ausdifferenzieren zu können, charakterisiert. Während sich pluripotente embryonale Stammzellen in sämtliche Zelltypen oder gar einen kompletten Embryo entwickeln können, sind adulte Stammzellen bereits auf einen Gewebetyp festgelegt [5].

Es werden zwei Arten der Stammzellteilung beschrieben. Bei der asymmetrischen Zellteilung gehen aus einer Stammzelle zwei unterschiedliche Tochterzellen hervor. Eine dieser Tochterzellen besitzt wiederum Stammzeleigenschaften und sorgt so für die Erhaltung des Stammzellpools. Die andere ist eine sogenannte Progenitorzelle, die durch Expansion und Differenzierung nur reife Zellen generiert. Durch symmetrische Zellteilung entstehen zwei gleiche Tochterzellen, die entweder beide Stammzellen oder differenziertere Progenitorzellen sind [33].

Adulte, gewebspezifische Stammzellen sind für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase essentiell und wurden in zahlreichen Organen nachgewiesen. Es wird vermutet, dass die Deregulation spezifischer

Überwachungsmechanismen zu einer abnormen Proliferation der Stammzellen führt, die nun als Krebsstammzellen den Ausgangspunkt von entarteten malignen Zellen darstellt [5,34].

1.3.2 Krebsstammzellen

Klassische Theorien der Tumorentstehung gehen von einer stufenweisen Anhäufung von Mutationen aus, die Gene für Zellwachstum, Zellvermehrung und Apoptose betreffen und eine terminal differenzierte „normale“ Zelle in maligne Abkömmlinge verwandelt [5]. Nach diesem stochastischen Modell haben alle Tumorzellen gleichermaßen die Fähigkeit Tumorstadium zu initiieren [35]. Die Krebsstammzellhypothese nimmt hingegen an, dass innerhalb eines hierarchisch gegliederten Tumors eine Subpopulation von Zellen mit Stammzeleigenschaften existiert [36]. Diese Krebsstammzellen teilen viele Eigenschaften normaler Stammzellen, wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, das Differenzierungspotential sowie die Fähigkeit der Gewebeinvasion und Gefäßneubildung. Zusätzlich sind sie zur Tumorentstehung befähigt, da sie in alle vielgestaltigen Linien von Krebszellen, aus denen ein Tumor besteht, differenzieren können [36]. Demzufolge entwickelt sich ein Tumor nicht aus den terminal differenzierten epithelialen Zellen eines Gewebes, sondern aus weniger differenzierten, möglicherweise aber schon gewebespezifischen, adulten Krebsstammzellen. In zahlreichen Studien konnte experimentell belegt werden, dass eine ausgewählte Gruppe von Tumorzellen nach Transplantation in eine immundefiziente Maus nicht nur in der Lage waren, neue Tumoren zu bilden, sondern auch die Heterogenität des gesamten Tumors wiederherzustellen [37,38].

Allgemein werden drei verschiedene Entstehungsmechanismen von Krebsstammzellen diskutiert [39]. Zum einen können sie aus normalen gewebespezifischen Stammzellen hervorgehen, deren Proliferationskontrolle durch genetische und epigenetische Veränderungen außer Kraft gesetzt wurde. Zusätzlich besteht die Möglichkeit dass Krebsstammzellen aus teilweise differenzierten Progenitorzellen (*transit-amplifying cells*) entstehen, die normalerweise nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen, durch eine onkogene Transformation ihre Stammzeleigenschaften jedoch wiedererlangen (dedifferenzieren). Weiter wird vermutet, dass Stammzellen mit verschiedenen differenzierten Zellen fusionieren können und die resultierende Hybridzelle eine Krebs-initiiierende Zelle

mit Stammzelleigenschaften darstellt. Da sich die drei Hypothesen nicht gegenseitig ausschließen, könnten auch mehrere Pfade zur Entstehung von Krebsstammzellen führen [39].

Aktuelle chemotherapeutische Behandlungsstrategien sind oft nur von geringem Erfolg und eine Vielzahl von Tumoren entwickeln nach einer für den Tumortyp charakteristischen Zeitspanne Rezidive [5]. Die Erklärung liegt vermutlich in den Krebsstammzellen. Während klassische Chemotherapeutika die schnell teilenden Krebszellen vernichten und die Tumormasse so zunächst erfolgreich reduzieren, bleiben die langsamer wachsenden therapieresistenten Krebsstammzellen verschont und können später zu einem Rückfall der Erkrankung führen (Abbildung 1.3) [5,40,41]. Diese sind dann in der Lage, den vollständigen malignen Tumor wiederherzustellen [36]. Der Fokus neuer Therapiekonzepte liegt daher auf der Identifizierung und Charakterisierung krebsstammzellenspezifischer Strukturen, um eine zielgerichtete Therapie gegen Krebsstammzellen und eine verbesserte Tumorrezidivkontrolle zu ermöglichen [5].

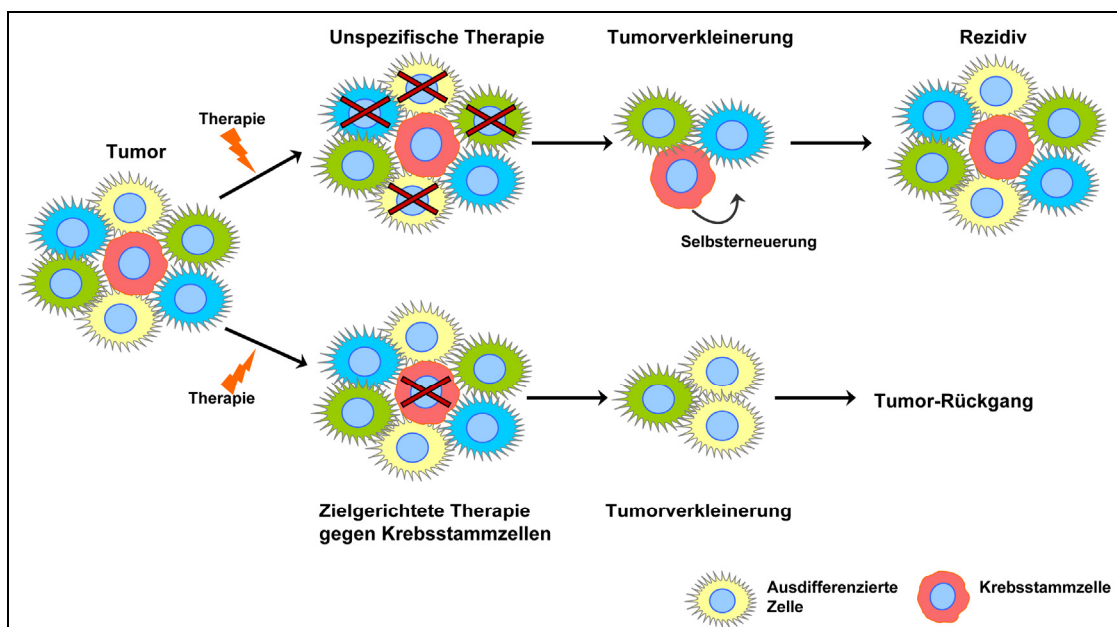


Abbildung 1.3 Krebsstammzellen in der Krebstherapie.

Konventionelle Therapieansätze vernichten die ausdifferenzierten Tumorzellen und können die Tumormasse so zunächst erfolgreich reduzieren. Die Krebsstammzellen sind weniger empfindlich gegenüber der unspezifischen Therapie und können den Tumor anschließend vollständig wiederherstellen (Rezidiv). Eine zielgerichtete Behandlung gegen Krebsstammzellen könnte diese Zellen effektiver zerstören und möglicherweise zu einer Ausheilung des Tumorleidens führen. Abbildung modifiziert nach Reya *et al.* [42].

1.3.3 Side Population und Stammzellmarker

Ein zentrales Problem der Identifikation und Charakterisierung von Stammzellen solider Tumoren ist deren Trennung aus dem Gewebeverband. Zur Identifizierung „gewebespezifischer“ Stammzellmarker und der Charakterisierung von Krebsstammzellen solider Tumoren, bedient man sich der *Side Population* (SP) von Tumorzelllinien. SP-Zellen weisen Stammzeleigenschaften auf und schleusen toxische Medikamente mittels ABC-Transporter (*ATP-binding cassette transporters*) aus der Zelle heraus [43]. Mithilfe von SP-Zellen konnten Stammzellmarker verschiedener Gewebe identifiziert werden. Im Ösophagus, Skelettmuskel, Herzmuskel, Brustdrüse und Leber repräsentierte die SP die entsprechende Stammzellpopulation [44-48]. Ihr Vorkommen konnte aber ebenso bei malignen Erkrankungen und soliden Tumoren nachgewiesen werden [49].

1.3.4 Krebsstammzellen und die EMT

Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierungsprogramms zum Erwerb von Stammzellcharakteristika in normalen und neoplastischen Zellen führt [50,51]. Dabei werden durch die Dedifferenzierung epithelialer Zellen innerhalb eines Karzinoms Krebsstammzellen generiert [52].

Allgemein beschreibt die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) den Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften und ist mit dem aggressiven Verhalten von Krebszellen assoziiert [53]. Im Zuge der EMT werden Zellkontakte aufgelöst und Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin herunterreguliert, so dass die Zellen nun migrieren und die Basalmembran passieren können. Dies stellt eine Grundvoraussetzung für die Metastasierung dar [6]. Dieser Phänotypenwechsel ist ein wesentlicher Prozess bei der Tumorphase. So geht die Entwicklung von frühen Karzinomen zu invasiven Malignomen häufig mit dem Verlust der epithelialen Differenzierung und Erlangung des mesenchymalen Phänotyps einher [53].

Folglich stellt die EMT für den Krebspatienten eine doppelte Gefahr dar: Zum einen sind die Krebszellen aufgrund ihrer mesenchymalen Eigenschaften in der Lage zu metastasieren, und gleichzeitig erlangen sie als Krebsstammzellen die Fähigkeit der Selbsterneuerung, die für die anschließende klonale Expansion am Metastasierungsort unabdingbar ist [54]. So scheint es, dass die

Unterdrückung der epithelialen Differenzierung und die Aneignung von Stammzelleigenschaften eng miteinander verbunden sein müssen [52].

Die Stammzell- und Krebsstammzellforschung stellt ein vielversprechendes Gebiet für die Weiterentwicklung neuer Behandlungsstrategien in der Krebstherapie dar. Ein besseres Verständnis der biologischen Charakteristika von Stammzellen, Krebsstammzellen und des EMT-Phänotyps könnte zur Entwicklung neuer Medikamente führen, mit denen diese Zellen selektiv vernichtet werden könnten [52,53].

1.4 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind Oberflächenrezeptoren, die Signale über G-Protein-initiierte (GTP-bindende Proteine) Second-Messenger-Kaskaden in das Zellinnere weiterleiten. Sie stellen mit etwa 900 Mitgliedern die größte transmembranäre Rezeptor-Superfamilie des Menschen dar [55]. Kennzeichnend sind ihre sieben, die Zellmembran durchspannenden Helixstrukturen, die über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. GPCRs besitzen einen extrazellulären N-Terminus für die Ligandenbindung und einen intrazellulären C-Terminus, der mit G-Proteinen oder anderen intrazellulären Signalproteinen interagiert (siehe Abbildung 1.4) [56].

GPCRs kontrollieren physiologische und pathologische Schlüsselfunktionen bei der Embryogenese, Proliferation, Angiogenese, dem Zellwachstum sowie der Entzündung, Tumorprogression und -metastasierung [57]. Zu den über 80 bereits identifizierten GPCR-Liganden zählen unter anderem Hormone, Chemokine, Lipide, Peptide, Glykoproteine, Neurotransmitter, Eikosanoide, Proteasen, Aminosäuren, Nukleotide, biogene Amine und Ionen [58,59]. Rezeptoren, für die weder ein Ligand, noch eine Funktion bekannt ist, werden als *orphan* GPCRs bezeichnet. Einige Viren wie HIV nutzen GPCRs auch als Kofaktoren für den Eintritt in die Zelle [59]. Eine Klassifizierung basierend auf phylogenetischen Untersuchungen teilt die Rezeptoren in fünf Hauptgruppen ein: die Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, Frizzled/Taste2- und Secretin-Gruppe (GRAFS-System) [60]. GPCRs zählen zu den häufigsten Zielstrukturen medikamentöser Therapien: etwa 60 % aller zugelassenen Arzneimittel wirken direkt oder indirekt auf GPCRs ein. Darunter befinden sich Betablocker, Neuroleptika,

Antihistaminika, Opoide und Sympathomimetika. Aufgrund ihrer vielseitigen Funktionen ist die GPCR-Familie eine der erfolgversprechendsten Ziele für die Krebsforschung und Therapie [59,61].

GPCRs übertragen extrazelluläre Signale über die Aktivierung von G-Proteinen in das Zellinnere. Die heterotrimeren G-Proteine bestehen aus einer Guanosindiphosphat (GDP) bindenden α -Untereinheit sowie einer β - und einer γ -Untereinheit. Sowohl die $G\alpha$ - als auch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit haben Signalfunktionen [62]. Im ersten Schritt der Signaltransduktion bindet zunächst das G-Protein an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors, während der spezifische Ligand den GPCR durch die Bindung an seine extrazelluläre, transmembranäre oder intrazelluläre Domäne aktiviert. Der so aktivierte Rezeptor ändert seine dreidimensionale Struktur und kann nun den Austausch von GDP, gebunden an die $G\alpha$ -Untereinheit, zu Guanosintriphosphat (GTP) katalysieren. Durch die Bindung des GTP wird der G-Protein-Komplex instabil, ändert seine Konformation und dissoziiert in die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit. Das G-Protein kann nun die durch Liganden übertragenen extrazellulären Signale über seine aktivierten Untereinheiten, die wiederum weitere zell- oder membranständige Proteine aktivieren oder deaktivieren, in das Zellinnere weiterleiten. Nach erfolgreicher Signaltransduktion wird GTP mithilfe der GTPase-Aktivität der α -Untereinheit in $GDP+P_i$ gespalten. Die α -Untereinheit reassoziert wieder mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit und kann erneut an einen Rezeptor binden. Mediatoren dieser Signalkaskaden sind unter anderem Adenylatzyklase, Phospholipase A₂/C β , Proteinkinase C und D, Inositol 1,4,5-Triphosphat, Ionenkanäle oder der ERK-Signalweg. Darüber hinaus haben viele GPCRs eine konstitutive, ligandenunabhängige Aktivität oder leiten Signale über alternative Signaltransduktionswege G-Protein-unabhängig in die Zelle weiter [62,63].

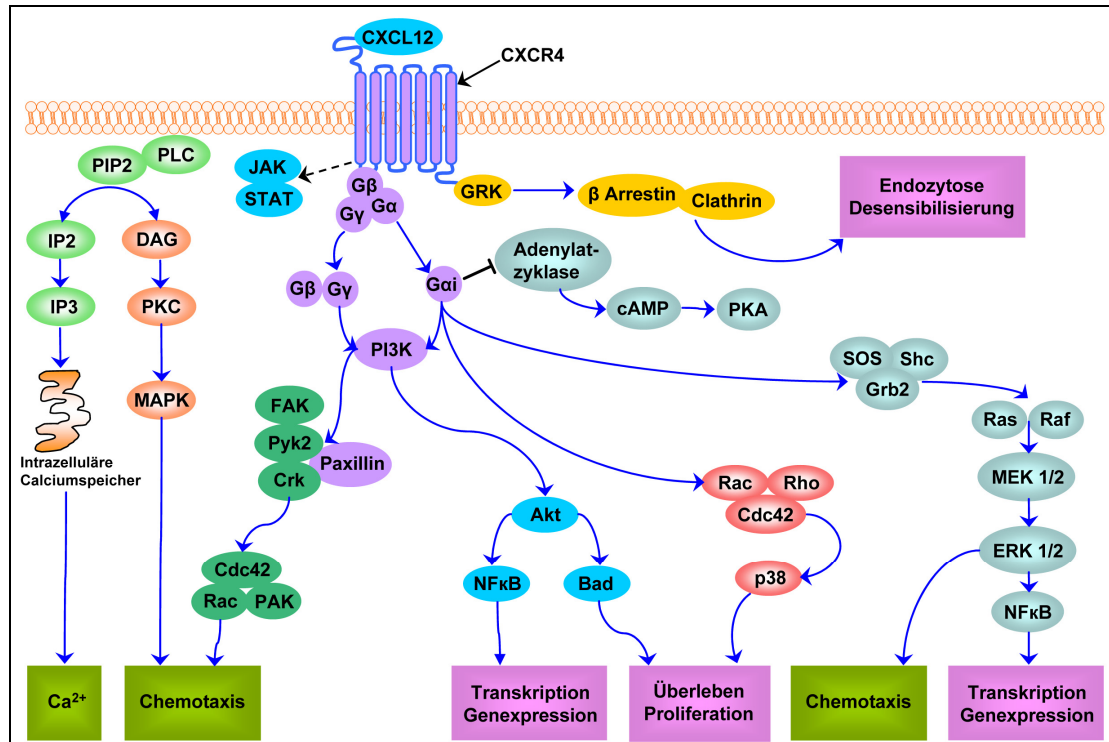


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der GPCR-Signaltransduktion.

Darstellung grundlegender, in der GPCR-Signaltransduktion involvierter Signalwege am Beispiel von CXCR4. Die Aktivierung eines GPCRs (CXCR4) durch seinen Liganden (CXCL12) kann zu einer Vielzahl von Reaktionen wie Chemotaxis, Zellüberleben und -proliferation, Gentranskription oder Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration führen. Die genaue Ausführung dieser Signalwege ist gewebeabhängig und variiert zwischen verschiedenen Zelltypen. Modifiziert nach Teicher und Fricker [64].

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Tumorbiologie

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) regulieren zahlreiche zelluläre Prozesse, einschließlich solcher, die eine wesentliche Bedeutung für die Tumorbiologie besitzen. Diese beinhalten unter anderem Proliferation, Überleben, Arzneimittelresistenz, Migration, Differenzierung, Gewebeanvasion und Angiogenese. Viele GPCR-Isoformen kommen in unterschiedlichen Tumorarten verstärkt oder fehlreguliert vor, für andere ist sogar eine onkogene Aktivität bekannt [65,66].

GPCRs, wie PAR-, Endothel-, Chemokin- oder LPA-Rezeptoren, sind in der Tumorigenese und Metastasierung vieler humaner Krebsleiden involviert. Sie können sowohl bei der frühen Tumorprogression, aber auch bei der späteren Invasion und Metastasierung eine Rolle spielen [67,68]. Tatsächlich werden konstitutiv aktive GPCRs sogar von Genomen humaner onkogener DNA-Viren

exprimiert. Beispiele hierfür sind das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV) oder das mit nasopharyngealen Karzinomen sowie dem Burkitt-Lymphom-assoziierte Epstein-Barr Virus [57].

Da GPCRs in auto- und parakrine Regelkreisläufe eingebunden sind, nutzen Tumorzellen häufig eine Überexpression tumorfördernder GPCRs oder die vermehrte Freisetzung ihrer Liganden, um entsprechende Signalnetzwerke zu stimulieren [57]. Eine deregulierte Expression des Protease-aktivierten Rezeptors PAR1 spielt beispielsweise im Brust-, Prostata- und hepatozellulären Karzinom eine Rolle [69-71]. Zum anderen sezernieren Zellen des Ovarialkarzinoms Lysophosphatidsäure (LPA) und fördern so über die Stimulation der LPA-sensitiven GPCRs das Tumorwachstum, Tumorüberleben und die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika [72].

Das onkogene Potential der GPCRs ist Resultat eines komplexen Zusammenspiels zwischen unterschiedlichen G-Proteinen. Die Überexpression konstitutiv aktiver Mutanten der G-Protein-Untereinheit $G\alpha$ hat hohes Tumorpotential und auch die Familie der $G\alpha_{12/13}$ -Proteine ist durch Überexpression des Wildtyp-Proteins an der Tumorentwicklung und -invasion beteiligt [73].

Aufgrund ihrer Eigenschaften und Funktionen stellen GPCRs geeignete Biomarker für die frühe Diagnose von Krebs dar. In der Humanmedizin existieren bereits zahlreiche Medikamente, die erfolgreich gegen GPCRs eingesetzt werden können [59]. Daher bietet die Inhibition der Rezeptoren und ihrer nachgeschalteten Zielgene Möglichkeiten für die Entwicklung neuer mechanismusbasierter Strategien für die Krebsprävention und -behandlung [57,73].

1.5 Wichtige Signaltransduktionswege der Tumorbilogie

Im Magenkarzinom sind Fehlregulationen in zahlreichen Signaltransduktionswegen beschrieben. Die Aktivierung solcher Signalkaskaden ist ursächlich für die Entstehung eines malignen Phänotyps, der mit erhöhter Zellproliferation, der Umgehung von Apoptose und einer verstärkten Invasivität des Tumors einhergeht [74]. Da der Einsatz klassischer Chemotherapeutika im Magenkarzinom nur von begrenztem Erfolg ist, sind aktuelle Studien um ein besseres Verständnis der Molekularbiologie der Karzinogenese und des Krebszell-Phänotyps bemüht [29]. Mit dem erweiterten Wissen können neue Therapiestrategien

entwickelt werden, die zielgerichtet gegen molekulare Veränderungen in Tumor-assoziierten Signaltransduktionswegen wirken. So könnte die Effizienz herkömmlicher Behandlungen gesteigert und die Entstehung von Arzneimittelresistenzen verhindert werden [29].

Die für die Studien dieser Doktorarbeit wichtigsten Signalwege werden nachfolgend kurz erläutert.

1.5.1 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg spielt sowohl in der Zell-Zell-Kommunikation, als auch bei der Erhaltung von Progenitor- bzw. Stammzellpopulationen eine entscheidende Rolle. Seine Aktivität ist zudem maßgeblich für das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Angiogenese verantwortlich. Da die Überaktivierung des Notch-Signalwegs in zahlreichen Studien und unterschiedlichen Karzinomen beschrieben wurde, bietet die Inaktivierung von Notch-Signalen neue molekulare Therapiemöglichkeiten für verschiedene Krebsleiden [75].

Die humane Notch-Familie besteht aus den vier Rezeptoren Notch 1-4 und den fünf typischen Notch Liganden DLL1, DLL3, DLL4, JAG1 und JAG2, die jeweils eine DSL-Domäne besitzen. Die zusätzlichen atypischen Notch-Liganden DNER, F3/Contactin und NB-3 besitzen keine DSL-Domäne [76]. Der auf Proteolyse basierende Signalweg wird durch die Bindung eines Liganden (Delta) von der Oberfläche einer benachbarten Zelle an den Membranrezeptor Notch initiiert. Nach seiner Aktivierung wird zunächst die extrazelluläre Domäne des Rezeptors durch eine Matrix-Metalloprotease (z. B. ADAM17) nahe der Plasmamembran gespalten. Anschließend trennt die γ -Sekretase den intrazellulären Anteil des aktivierten Notch-Rezeptors (NICD) ab, der nun in den Kern transloziert und als Transkriptionsfaktor über die Komplexbildung mit anderen Regulatorproteinen die Expression von Notch-Zielgenen reguliert [77]. Die Signaltransduktion typischer Notch-Liganden über die CSL-NICD-Mastermind Kaskade wird als kanonischer Notch-Signalweg bezeichnet (siehe Abbildung 1.5). Dieser ist beispielsweise in gastrointestinalen Epithelien aktiv und sorgt hier für die Aufrechterhaltung des Stammzellkompartiments. Zudem existieren weitere nicht-kanonische Signalwege, die über eine NF- κ B-NICD oder die CSL-NICD-Deltex Kaskade funktionieren [76].

Aberrant aktivierte Notch-Signale sorgen für eine exzessive Zellproliferation und wurden unter anderem in Tumoren des Pankreas, der Brust, Prostata, Leber, Cervix sowie dem kolorektalen Karzinom und hämatologischen Neoplasien nachgewiesen [75,78-83]. Insbesondere im Magenkarzinom korreliert die Aktivierung des Signalwegs mit dem Tumorwachstum sowie der Aggressivität und Invasivität des Karzinoms und geht mit einer schlechten Überlebensprognose einher [74,84].

Aufgrund der Interaktion des Notch-Signalwegs mit dem Wnt/ β -Catenin-, EGFR-, Hedgehog-, PI3K- oder BMP-Signalweg ist er an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt [85]. Aktivierende Notch-Signale sind beispielsweise über Bmi-1 in der Stammzellregulation [75], über EGFR in der Zellproliferation des Mammakarzinoms [86] und über NF- κ B in der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und dem Therapieversagen des Kolonkarzinoms involviert [75]. Des Weiteren kann Notch die Expression Apoptose-inhibierender Gene wie *Bcl-2*, *Bcl-XL* und *Survivin* steigern [87,88] und reguliert in Kooperation mit dem Wnt-Signalweg die Proliferation intestinaler Vorläuferzellen im Darm [89].

Durch gezielte Herunterregulation von Notch-Liganden, Notch-Rezeptoren, des NICD oder der γ -Sekretase konnten in vielen Karzinomen therapeutische Effekte beobachtet werden [75]. Insbesondere der Einsatz von γ -Sekretase-Inhibitoren lieferte vielversprechende Ergebnisse im Kolonkarzinom, zeigt bisher aber noch starke Nebenwirkungen [90].

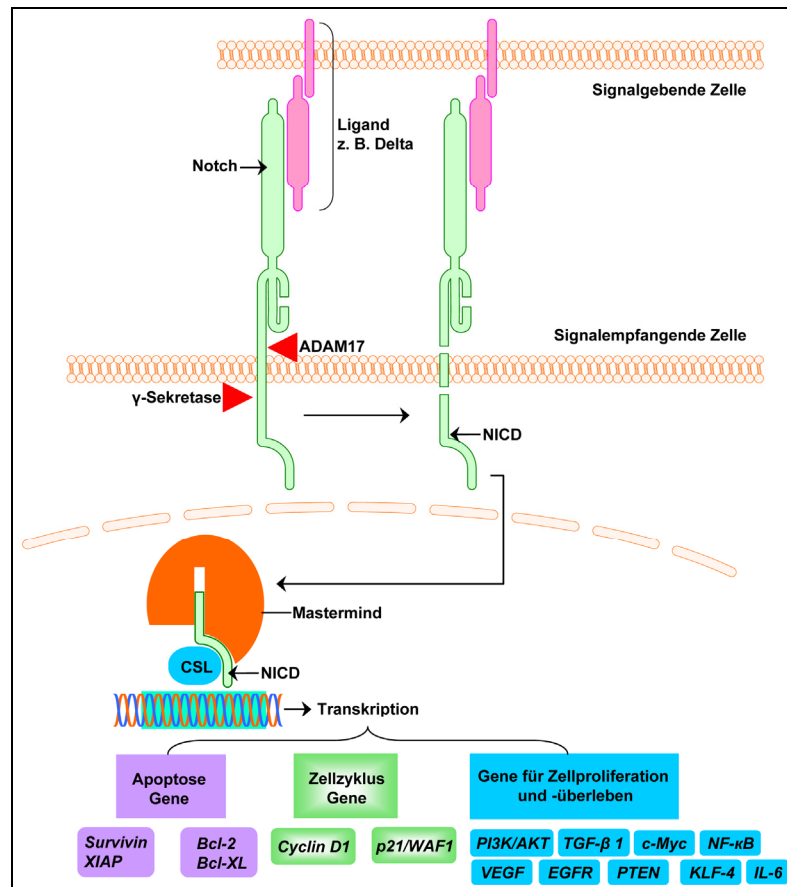


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung des kanonischen Notch-Signalwegs.

Die Notch-Liganden der signalgebenden Zelle binden an den Notch-Rezeptor der signalempfangenden Zelle. Ausgelöst durch die Ligandenbindung werden die extrazelluläre Domäne des Rezeptors durch ADAM17 und der intrazelluläre Anteil durch die γ -Sekretase abgespalten. Die freigesetzte intrazelluläre Notch-Domäne (NICD) transloziert in den Zellkern, bindet Transkriptionsfaktoren wie CSL und bildet den Mastermind-Komplex. Dieser Komplex reguliert die Transkription nachgeschalteter Zielgene. Abbildung modifiziert nach Qiao und Wong [75].

1.5.2 Der Wnt-Signalweg

Die Signaltransduktion über den Wnt-Signalweg stellt eine essentielle Voraussetzung für die Embryonalentwicklung, Differenzierung, Stammzellregulation und die adulte Gewebemöostase dar [91,92]. Seine aberrante Aktivierung führt daher zu unkontrollierbarem Wachstum und folglich zur Entstehung von Tumoren [93].

Die Wnt-Signalkaskade beginnt mit der Bindung eines Wnt-Glykoproteins an den GPCR Frizzled (FZD1-10) und seinen Korezeptor LRP5/6, was zur Aktivierung des Dishevelled-Proteins (Dvl) führt. Aktiviertes Dishevelled wirkt inhibierend auf einen Proteinkomplex bestehend aus GSK-3 β (Glykogen Synthase

Kinase-3 β), dem Tumorsuppressor APC (*adenomatous polyposis coli*), Axin-1 und CK1 (Casein-Kinase 1), der normalerweise die proteolytische Degradation von β -Catenin bewirkt. Aufgrund der Inhibition des Degradationskomplexes wird zytoplasmatisches β -Catenin stabilisiert, akkumuliert und kann in den Zellkern wandern, wo es mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancing factor*) interagiert und die Expression spezifischer Zielgene (*c-Myc*, *Axin2*, *SOX9*, *LGR5*) auslöst (siehe Abbildung 1.6) [92].

Die verschiedenen nicht-kanonischen Wnt-Signalwege werden über alternative Liganden aktiviert, sind unabhängig von β -Catenin, LRP5/6 Korezeptoren oder der Dvl-DEP Domäne und können sogar die Inhibition des kanonischen Signalwegs bewirken [94,95].

Da der Wnt-Signalweg durch seine komplexen Bestandteile und zahlreiche beteiligte Moleküle genau reguliert wird, haben Fehlregulationen und Alterationen von Wnt-Proteinen, APC, β -Catenin, Axin und TCFs drastische Effekte auf den Organismus und münden in der Entstehung von Tumoren [95,96]. Im Magenkarzinom geht die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beispielsweise mit der Tumorprogression, -invasion und einer schlechten Prognose einher [97]. Des Weiteren sind 50 % der Mammakarzinome und 90 % der Kolonkarzinome mit einer Überaktivierung des Wnt-Signalwegs assoziiert [96,98].

Aufgrund seiner Funktion im β -Catenin-Degradationskomplex führen Mutationen des Tumorsuppressorgens APC zu einer von externen Signalen unabhängigen β -Catenin-Akkumulation. Die dauerhafte Expression von Wnt-Zielgenen führt so zu exzessiver Stammzellerneuerung, unkontrollierter Zellproliferation und Tumorwachstum [93,99]. APC-Mutationen sind ursächlich für das Kolonkarzinom, spielen aber auch in einer Reihe weiterer Tumorleiden, wie dem Magenkarzinom, eine Rolle [97,100].

Aktuell beschäftigen sich zahlreiche Studien mit der Suche nach effektiven Behandlungsstrategien für Wnt-assoziierte Tumoren. Darunter befinden sich nicht-steroidale entzündungshemmende Arzneimittel (NSAID), natürliche Agonisten des Wnt-Signalwegs (sFPR, Dkk), kleine Moleküle oder monoklonale Antikörper, die jeweils gegen einzelne oder mehrere Komponenten des Wnt-Signalwegs gerichtet sind [92,95,101].

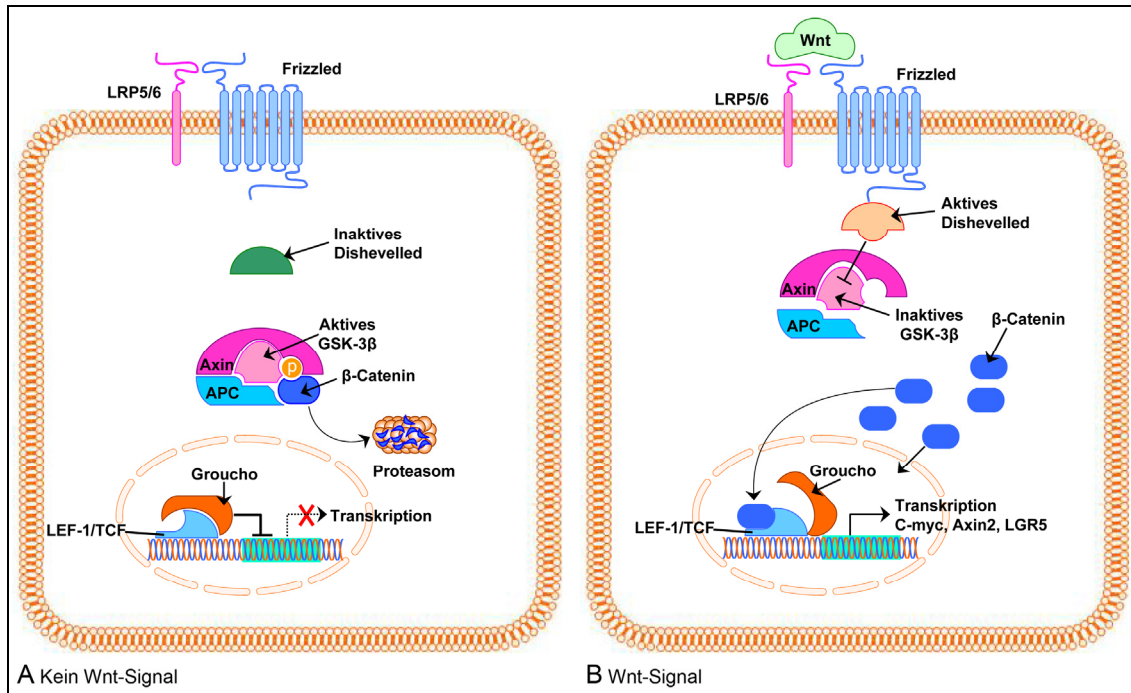


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs.

(A) In Abwesenheit eines Wnt-Liganden wird freies β -Catenin durch den Degradationskomplex (bestehend aus Axin, APC, GSK-3 β und CK1) phosphoryliert, im Ubiquitin-Proteasomen Weg abgebaut und so auf einem niedrigen zyttoplasmatischen Level gehalten. Im Zellkern sind die TCF Transkriptionsfaktoren an den Korepressor Groucho gebunden und hemmen aktiv die Transkription von Zielgenen. (B) die Bindung eines Wnt-Liganden führt über die Aktivierung des Dishevelled-Proteins zur Stabilisierung und Akkumulation von zyttoplasmatischem β -Catenin, das anschließend in den Zellkern transloziert und dort TCF in einen Transkriptionsaktivator umwandelt. Der Signalweg mündet in der Transkription spezifischer Zielgene wie *LGR5*, *C-myc* oder des negativen Wnt-Regulators *Axin2*. Abbildung modifiziert nach de Sousa *et al.* [93].

1.5.3 Der EGFR-Signalweg

Der EGFR-Signalweg unterliegt häufig Fehlregulationen und ist daher in den letzten Jahren Ziel intensiver Forschung gewesen [102]. Im Magen spielt er sowohl bei der Regulation der Magenschleimhaut-Proliferation als auch bei der Progression von Magenkarzinomen eine Rolle [74].

Der Transmembranrezeptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*, HER1 bzw. ErbB1) bildet zusammen mit den Rezeptor-Tyrosinkinase HER2/neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4) die ErbB-Familie. EGFR wird über die Bindung eines spezifischen Wachstumsfaktor-Liganden (EGF, TGF α , HB-EGF, Amphiregulin, β -Cellulin, Epiregulin, Epigen oder Crypto) aktiviert und kann anschließend Homodimere mit EGFR oder Heterodimere mit einem

anderen Mitglied der ErbB-Rezeptorfamilie bilden [103]. Stimuliert durch die Rezeptor-Dimerisierung werden nun die intrazellulären, C-terminalen Tyrosinreste von EGFR mithilfe seiner intrinsischen Protein-Tyrosinkinase-Aktivität autophosphoryliert, was zur Rekrutierung weiterer Signalmoleküle wie Akt/PKB, Ras-Raf-MEK oder JAK2-STAT3 führt [102,104]. Diese nachgeschalteten Signalproteine initiieren unter anderem den MAPK-, Akt- und JAK-Signalweg (siehe Abbildung 1.7) [29,105,106].

Mutationen, die zu einer Überexpression oder Überaktivierung von EGFR führen, wurden unter anderem im Magen-, Brust-, Lungen-, Kolon- und Pankreas-Karzinom sowie dem *Glioblastoma multiforme* identifiziert [107-112]. Sie haben meist eine unkontrollierte Zellteilung zur Folge, die in Tumorentstehung, -proliferation, -progression, einer verstärkten Metastasenbildung und geringeren Sensitivität der Zellen gegenüber Chemo- und Radiotherapie resultiert [113-115].

Etwa 30 % aller epithelialen Tumoren stehen im Zusammenhang mit Mutationen, Amplifikationen oder Fehlregulationen von EGFR und seinen Familienmitgliedern [103]. Die Rezeptor-Tyrosinkinase HER2 (ErbB-2) wird zum Beispiel über die Bildung von Heterodimeren mit EGFR oder HER3 aktiviert und überträgt anschließend entsprechende Signale mittels RAS-MAP-Kinase-Weg und den PI3K-abhängigen Signalweg [116,117]. Die HER2-Expression ist insbesondere im Mammakarzinom von großer prognostischer und diagnostischer Relevanz. Der Rezeptor wird in 20 % der invasiven Mammakarzinome, aber auch in 23 % der Magenkarzinome stark überexprimiert und geht mit einer verminderten Überlebensprognose und einem schlechteren Krankheitsverlauf einher [118-120].

Einer der EGFR/HER2-Aktivierung nachgeschalteten Effektoren ist das Ras-Signalprotein. In Karzinomen werden häufig Punktmutationen der Ras-Isoformen K-Ras, H-Ras oder N-Ras gefunden, die zu einer Akkumulation von aktivem Ras und so zu einer andauernden Wachstumsstimulation führen [121]. Die K-Ras Genmutation spielt zum Beispiel im intestinalen Magenkarzinom sowie Kolorektal- und Pankreaskarzinom eine bedeutende Rolle [110,111,122].

Die Identifizierung von EGFR als Onkogen führte zur Entwicklung neuartiger Krebstherapeutika, die EGFR-Signale gezielt unterbinden, um so das Tumorstadium einzudämmen [29,102]. Darunter befinden sich monoklonale

Antikörper (wie z. B. Cetuximab) die durch Blockierung der EGFR-Ligandenbindungsstelle die Aktivierung und das nachgeschaltete Signaltransduktionssystem des Rezeptors hemmen [29]. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Tyrosinkinase-Inhibitoren (Gefitinib, Erlotinib und Lapatinib), kleinen Molekülen, die auf der zytoplasmatischen Seite des EGFRs die Kinaseaktivität hemmen, wodurch der Rezeptor nicht mehr in der Lage ist, sich selbst zu aktivieren [29,102]. In Abhängigkeit des EGFR-Mutationsstatus (EGFR-positiv oder -negativ) kann die Verabreichung von Trastuzumab (ein monoklonaler Anti-HER2-Antikörper) Patienten mit HER2-positiven Mamma- oder Magenkarzinomen einen Überlebensvorteil bieten [120,123]. Ebenso profitieren EGFR-positive Lungenkarzinom-Patienten von einer Therapie mit niedermolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren [124].

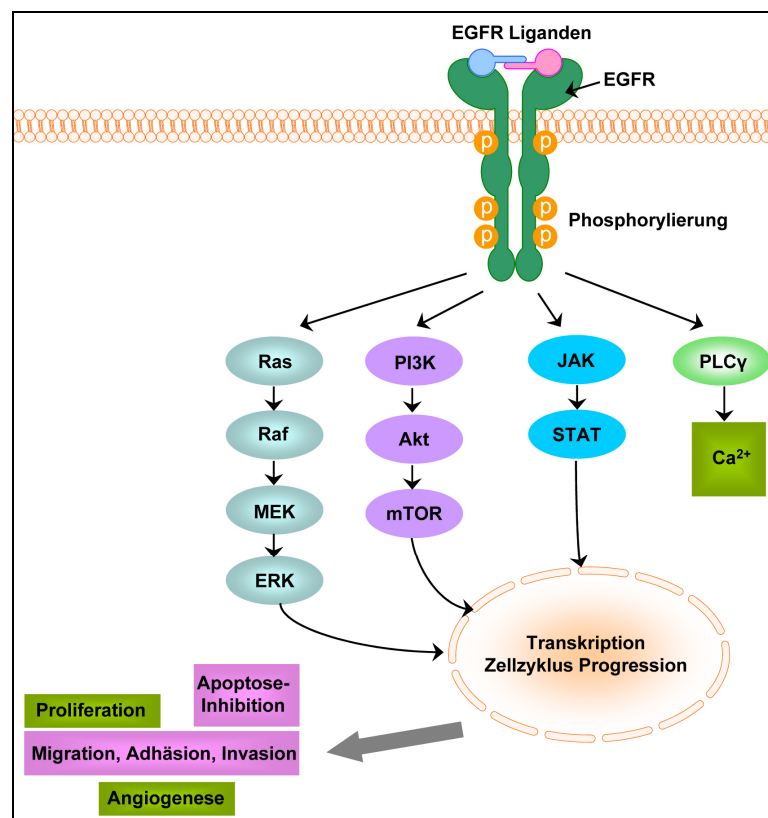


Abbildung 1.7 Schematische Darstellung des EGFR-Signalwegs.

Die Aktivierung der EGFR-Signaltransduktion stimuliert verschiedene nachgeschaltete Signalkaskaden, wie den MAPK-, STAT-, PLC- γ - und PI3K/Akt-Signalweg. Die Aktivierung dieser Signalkaskaden begünstigt die Proliferation, Migration, Adhäsion und Invasion sowie die Angiogenese und Apoptose-Inhibition. Abbildung modifiziert nach Wu *et al.* [74].

1.5.4 Das Triple-membrane-passing Signal

Das Modell des *triple-membrane-passing* Signals (TMPS) vereint die Komponenten der vorher erläuterten Signaltransduktionswege zu einem alternativen EGFR-Aktivierungsweg. Daub und Kollegen beschrieben 1996 erstmals, dass GPCRs in der Lage sind, mitogene Signale über die Transaktivierung des EGF-Rezeptors zu erzeugen [125]. Dies hat sich inzwischen als generelles Konzept für eine Vielzahl von Zelltypen herausgestellt. Die Kopplung der beiden Signalwege kombiniert die große Vielfalt der GPCR-Familie mit der Signalleistung des EGFRs [126,127].

Nach dem TMPS-Modell führt die Stimulation eines GPCRs zunächst zur Aktivierung einer Metalloprotease (z. B. ADAM17), die den jeweiligen proEGF-like Liganden (proHB-EGF, proAmphiregulin, proTGF- α) prozessiert und freisetzt. Die Freisetzung des reifen Wachstumsfaktors (HB-EGF, Amphiregulin, TGF- α) bedingt in der Folge die Aktivierung des EGF-Rezeptors und seiner typischen intrazellulären Signalwege (MAPK, PI3K/Akt, STAT, PLC- γ) (siehe Abbildung 1.8) [127,128]. Da das ursprüngliche, vom GPCR-Liganden ausgehende Signal insgesamt dreimal über die Zellmembran geleitet wird, spricht man von einem *triple-membrane-passing* Signal [126].

Untersuchungen der GPCR-induzierten EGFR-Aktivierung in mehr als 60 verschiedenen Karzinomzelllinien belegt die universale Bedeutung dieses Signalmechanismus in humanen Tumoren [126]. Beispielsweise steht die *H. pylori*-induzierte Entzündung und Karzinogenese humaner Magenkarzinomzellen in Verbindung mit einer HB-EGF-abhängigen EGFR-Signaltransaktivierung [129]. Das TMPS-Modell zeigt neue Wege der GPCR-induzierten Krebsentstehung und -progression auf, die wiederum als Angriffspunkte neuer Therapieformen dienen könnten.

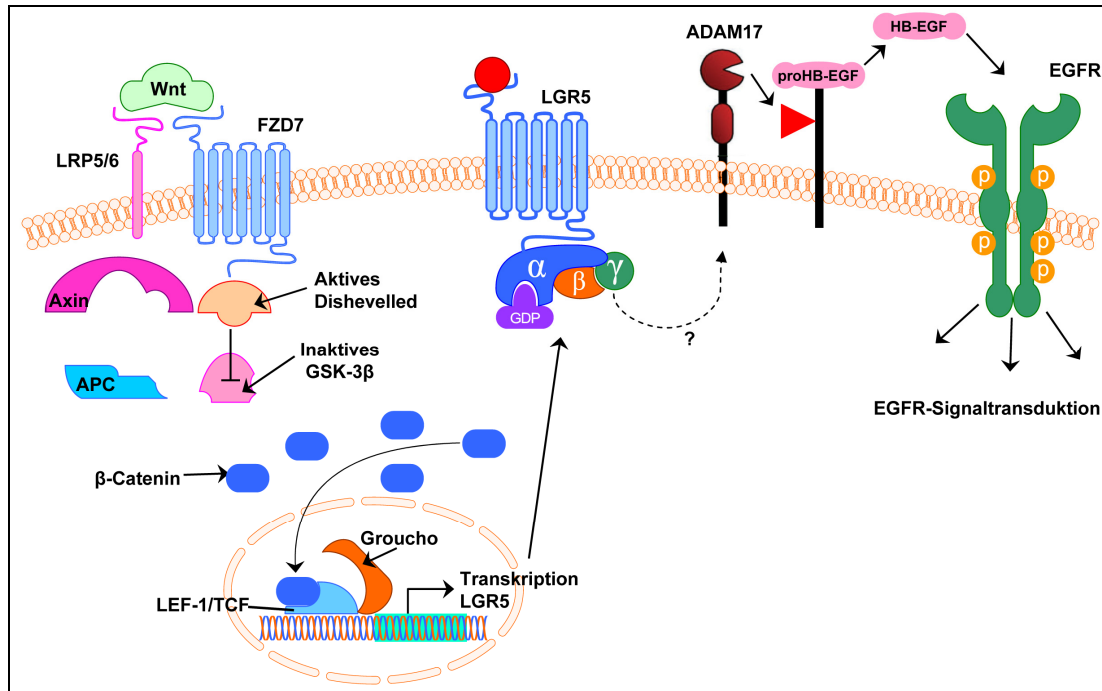


Abbildung 1.8 Schema des TMPS-Mechanismus zur EGFR-Transaktivierung.

LGR5 wird als Zielgen des klassischen Wnt-Signalwegs transkribiert und bindet an der Zelloberfläche seinen spezifischen Liganden. Die Stimulation von LGR5 führt zur Aktivierung der Metalloprotease ADAM17, die den proEGF-like Liganden (proHB-EGF) spaltet. Die Freisetzung des reifen Wachstumsfaktors (HB-EGF) stimuliert die EGFR-Kinaseaktivität und leitet die GPCR-Signale in das Zellinnere, um die charakteristischen EGFR-Signalwege zu aktivieren. Abbildung modifiziert nach Fischer *et al.* [126].

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll die tumorbiologische Bedeutung von GPCRs und GPCR-bezogenen Proteinen im Magenkarzinom untersucht werden, die insbesondere im Notch-, Wnt- und über das *triple-membrane-passing* Signal auch im EGFR-Signalweg involviert sind und die Identifizierung und Charakterisierung von Stammzellen und Krebsstammzellen ermöglichen könnten.

1.6 Fragestellung und Ziele

Mit jährlich etwa 930.000 Neuerkrankungen ist das Magenkarzinom der vierthäufigste maligne Tumor und die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache weltweit [5,8]. Sowohl die Metastasierung, als auch die häufige Rezidivierung des Magenkarzinoms nach Resektion und Chemotherapie bedingen seine schlechte Prognose und können vermutlich auf Krebsstammzellen zurückgeführt werden [130]. Da es zurzeit keinen prädiktiven Biomarker im klinischen Einsatz gibt, ist die Suche nach neuen prognostischen und diagnostischen Zielstrukturen dringend erforderlich.

Die Studien dieser Doktorarbeit basieren auf der Hypothese, dass die große Gruppe der GPCRs, deren Mitglieder an zahlreichen zellphysiologischen und -pathologischen Prozessen beteiligt sind [57], einen oder mehrere Rezeptoren beherbergt, die in der Tumorpathologie des Magenkarzinoms eine Rolle spielen und die Identifizierung und Charakterisierung von Krebsstammzellen ermöglichen. Ziel dieser Arbeit ist daher die Validierung und Charakterisierung differentiell exprimierter GPCRs und GPCR-bezogener Proteine, die als neue potentielle Zielstrukturen für die Behandlung des Magenkarzinoms in Frage kommen.

Durch eine Expressionsanalyse mit der Technik der Real-time RT-PCR soll die differentielle Expression der Zielgene *CXCL12*, *CXCR4*, *ADAM17*, *FZD7* und *LGR5* im Vergleich zwischen Gewebeproben von Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen sowie zwischen Tumor- und Normalgewebe eines Patienten verifiziert werden. Ihre klinisch-pathologische Bedeutung für das Magenkarzinom soll anschließend immunhistochemisch an einem umfassenden Patientenkollektiv überprüft werden. Die Expression des Kandidaten, der in diesen und auch anderen wissenschaftlichen Studien die höchste Relevanz für die Tumorbiologie des Menschen zeigt, soll dann eingehender charakterisiert, an einem Spektrum hepato-gastrointestinaler Tumoren analysiert und seine zellbiologische Funktion schließlich im Zellkultursystem untersucht werden.

Die so gewonnenen Erkenntnisse sollen zum molekularen Verständnis der Tumorpathologie des Magenkarzinoms beitragen und helfen, neue potentielle Therapieziele für die Behandlung des Magenkarzinoms zu finden, die sich die zellbiologischen Prozesse der Tumorstammzelle zu Nutze machen und zur Rezidivprophylaxe und Dauertherapie eingesetzt werden können.

2 Material

Nachfolgend werden in tabellarischer Form alle verwendeten Materialien und Geräte aufgeführt.

2.1 Chemikalien

Aceton	J.T. Barker, Griesheim
Acid-Phenol:Chloroform	Ambion Life Technologies, Darmstadt
Acrylamid Rotiphorese Gel 40	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose Low Melting Point	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Agatabs	Eurogentec, Köln
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Antibody Diluent	Zytemed Systems GmbH, Berlin
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
ColorBurst Electrophoresis Marker	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Complete, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Eosin G	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol absolut	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Geneticin Gibco	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Glycine Calbiochem	EMD Millipore Bioscience, Billerica, MA, USA
Größenstandard SmartLadder MW-1700-10	Eurogentec, Köln
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co KG, Leipzig
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hematoxylin Gill 3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Hochreines Wasser	Merck KGaA, Darmstadt
Hydrogen Peroxide Block	Thermo Scientific GmbH, Schwerte
Immu-Mount Eindeckmedium	Thermo Scientific GmbH, Schwerte
IPTG	Ambion Life Technologies, Darmstadt
Längenstandard GS500-LIZ	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Lipofectamine LTX Transfection Reagent	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt

Magnesiumchlorid (MgCl₂, 25 mM)	Qiagen, Hilden
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Mitomycin C	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumazid (NaN₃)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhypochloritlösung (12 % Cl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Nuclease freies Wasser	Ambion Life Technologies, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Peroxidase Substrat DAB	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Rnase Away	Molecular BioProducts, Inc., San Diego, CA, USA
RNAse H	Roche Diagnostics, Mannheim
RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
SuperScript Transkriptase	Life Technologies Inc., Carlsbad, USA
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma Base (Tris)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypton	Becton, Dickinson and Company, Bedford, MA, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ultra V Block	Thermo Scientific GmbH, Schwerte
VECTASHIELD Hard-Set including DAPI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Wasser	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Wasser (RNase-frei)	Qiagen, Hilden
X-Gal	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Xylol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen

2.2 Kits

ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Version 2.0	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare, München
AmpFISTR Identifiler PCR Amplification Kit	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega GmbH, Mannheim
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Deoxyribonuclease I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
GeneChip RNA transcript labeling Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
LightCycler 480 Probes Master	Roche Diagnostics, Mannheim
mirVana miRNA Isolation Kit	Ambion Life Technologies, Darmstadt

n-Histofine Simple Stain MAX PO System	Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren
ProteoJET Cell Lysis Reagent	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini und Midi Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
SIGMAFAST Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
TURBO DNA-free	Ambion Life Technologies, Darmstadt
UltraVision AP Polymer Detection System	Thermo Scientific GmbH, Schwerte
VECTASHIELD Hard-Set including DAPI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA

2.3 Oligonukleotide

Human Universal Reference Total RNA	Clontech, Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Oligo(dT)15 Primer C110A	Promega GmbH, Mannheim
Oligo(dT)24 Primer	TIBMOL Biol, Berlin
Primer	Biomers.net, Ulm
Primer	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
Primer	BioTeZ, Berlin
Universal Probe Library Probes	Roche Diagnostics, Mannheim

2.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase 1 U/µl calf intestine	Roche Diagnostics, Mannheim
BamHI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
EcoRI	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Nhe I	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Pfu Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4-Ligase 100 U (1 U/µl)	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

2.5 Antikörper

ADAM17	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CD34	Dako, Carpinteria, CA, USA
CD34	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CD44	Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, England
c-Myc	Clontech, Mountain View, CA, USA

CXCL12	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
CXCR4	Stefan Schulz [131]
FZD7	Aviva Systems Biology Corp., San Diego, CA, USA
Ki67	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
LGR5^{com}	Abcam, Inc., Cambridge, MA, USA
Musashi-1	Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA
Synaptophysin	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
β-Actin, Klon AC-15	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-mouse AlexaFluor 555	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Anti-rabbit Alexa Fluor 488	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Mouse-IgG und rabbit-IgG Kontrolle	ZYTOMED Systems, Berlin
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulin/HRP	Dako, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin/HRP	Dako, Glostrup, Dänemark

2.6 Bakterien und Zellen

kompetente <i>E. coli</i> 5-alpha	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
HEK293 EBNA	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
MKN45	Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
MKN74	Japan Health Science Research Resource Bank, Osaka, Japan

2.7 Vektoren

pcDNA3.1(-)	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
--------------------	--

2.8 Medien

DMEM high Glucose mit L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich						
Fetal Bovine Serum "Gold"	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich						
Matrigel Basalmembranmatrix	BD Bioscience, Heidelberg						
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich						
SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA						
LB Flüssigmedium	<table> <tr> <td>Trypton</td> <td>10 g/l</td> </tr> <tr> <td>Hefeextrakt</td> <td>5 g/l</td> </tr> <tr> <td>NaCl</td> <td>5 g/l</td> </tr> </table>	Trypton	10 g/l	Hefeextrakt	5 g/l	NaCl	5 g/l
Trypton	10 g/l						
Hefeextrakt	5 g/l						
NaCl	5 g/l						
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} auf 1l, autoklavieren						

LB Platten	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	Agar-Agar	15 g/l
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} auf 1l, autoklavieren	

2.9 Puffer

Agarosegel-Probenpuffer (2x/5x)	Eurogentec, Köln	
Blotting Puffer Western Blot	Trizma Base	3,03 g
	Glycine	14,40 g
	Methanol	200 ml
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} auf 1l	
Dulbecco´s Phosphate-Buffered Saline (DPBS) (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	
Elektrophoresepuffer (10x)	Trizma Base	30,28 g
	Glycine	144,00 g
	SDS	10,00 g
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} auf 1l, pH 8,3	
Entfärberlösung	Methanol	300 ml
	Essigsäure	100 ml
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} auf 1l	
5x Laemmli-Puffer	1,5M Tris-Cl pH 6,8	4 ml
	Glycerin	10 ml
	β-Mercaptoethanol	5 ml
	SDS	2 g
	Bromphenolblau	1 ml
SDS-Gelpuffer für Western Blot	Trizma Base	90,70 g
	SDS	0,75 g
	auf 250 ml mit H ₂ O _{bidest} auffüllen, mit HCl pH 8,45 einstellen	
TAE- Agarosegelpuffer (10x)	Trizma Base	48,40 g
	0,5 M Na ₂ EDTA	20 ml
	Essigsäure	11,42 ml
	Auffüllen mit H ₂ O _{bidest} auf 1l	

TBS-Puffer für die Immunhistochemie	Trizma Base	60,57 g
	NaCl	87,66 g
	in 1 l H ₂ O _{bidest} lösen, mit HCl pH 7,4 einstellen	
TBS-Puffer für Western Blot	Trizma Base	9,00 g
	Tris-HCl	68,50 g
	NaCl	87,80 g
	in 1 l H ₂ O _{bidest} lösen	

2.10 Geräte

ABI PRISM Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
ÄKTAprime Flüssigchromatographiesystem	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Analysewaage (Pro 200g)	Ohaus Scout, Pine Brook, NJ, USA
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator 135T	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Autoklav VX-75	Systemc GmbH, Wettengel
BioRad Molecular Imager ChemiDoc XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BioRad Molecular Imager Gel Doc XR+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Brutschrank/Inkubator Bakterienlabor	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Deutschland
CO₂-Inkubator HERAcell 150i	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Eisbereiter Scotsman AF200	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA
Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Gefrierschrank MediLine -20 °C	Liebherr AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank VIP Series -86 °C	SANYO Biomedical, Wood Dale, IL, USA
Gelelektrophoresekammer	i-Mupid, Toronto, Canada VWR International GmbH, Darmstadt
GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
3500 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Heizblock Digital Heatblock	VWR International GmbH, Darmstadt
Heraeus Begasungsbrutschrank	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Homogenisator T10 basic ULTRA-TURRAX	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Inkubationsschüttler Infors HT Ecotron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Inverses Labormikroskop DM IL LED	Leica Microsystems, Wetzlar
Inverses Mikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Kamera ProgRes C10Plus	Jenoptik, Jena
Kühlschrank 6 °C	Siemens AG, München
Kühlzentrifuge Biofuge stratos Heraeus Sepatech	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Kühlzentrifuge Rotanta 46R	Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R Heraeus Sepatech	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

LabChip (2100 Bioanalyzer-RNA Solutions)	AGILENT Technologies, Santa Clara, CA, USA
Labor Reinigungsautomat G7883 CD	Miele Professional, Gütersloh
LightCycler 480	Roche Diagnostics, Mannheim
Luminometer Tecan infinite M200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Magnetrührer IKA color squid	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroplatten Mixer Microplate Genie	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA
Mikrowelle GRILL	Panasonic, Hamburg
Mikrozentrifuge Heraeus Biofuge Pico	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Mikrozentrifuge Perfect Spin 24	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Minizentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nitrocellulose Blotmembran	Amersham, Freiburg
Paraffin-Streckbad TFB 45	Medite Service AG, Dietikon, Schweiz
PCR Workstation	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Messgerät S20 Seven Easy pH	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Pipetten (2,5, 10, 20, 200, 1000, 5000 µl)	eppendorf AG, Hamburg
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Rotationsmikrotom RM 2245	Leica Microsystems, Wetzlar
Sicherheitswerkbank 8511 Zellkultur	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Slidescanner SCN400	Leica Microsystems, Wetzlar
Spannungsgeber Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SpectraMax 250 Microplate Reader	Molecular Devices, Wokingham, Großbritannien
Spektralphotometer Nanodrop 2000c	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Stanzgerät TMA	Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA
Systemmikroskop DM 1000	Leica Microsystems, Wetzlar
THERMO HYBAID PCR Express Thermal Cycler	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler peqSTAR 96 Universal Gradient	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer compact	eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
UV-Platz	Syngene, Cambridge, UK
Vakuum-Sicherheits-Absaugpumpe	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ventana Benchmark XT automated staining system	Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA
Vortexer	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Zellzähler ViCell XR	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

2.11 Software

AxioSet Version 1.4 Software	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
BioEdit Version 7.0.9.0	Hall, T.A., Department of Microbiology, Raleigh, NC, USA
Data Mining Tool 3.0	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
FinchTV Version 1.4.0	Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA
GCOS 1.4 (GeneChip Operating Software)	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
GeneSpring 7.2 Software	Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA
geNorm Visual Basic Application (VBA)	Vandesompele <i>et al.</i> 2002
GraphPad Prism Version 4 Software	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
i-control Microplate Reader Software	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
ImageJ 1.44p	Rasband,W., N.I.H., Bethesda, MD, USA
LightCycler 480 Software 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim
Microsoft Office 2003 und 2007	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Nanodrop 2000/2000c Software	Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA
PASW Statistics 18	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
Photoshop CS2	Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA
Power Point Toolkit	Motifolio Inc, Ellicott City, MD, USA
Quantity One 1-D Analysis Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reference Manager 11	Thomson ISI ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA
SerialCloner 2.1	SerialBasics
Slidescanner Leica SCN400 Software	Leica Microsystems, Wetzlar
SoftMax Pro Version 4.8 Software	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
ViCell XR Software	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Windows XP Professional	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

3 Methoden

3.1 Probenauswahl

Unfixiertes, kryokonserviertes Tumorgewebe von Patienten mit einem intestinal differenzierten Magenkarzinom des Magenantrums bzw. -korpus diente als Studienkollektiv zur Transkriptomanalyse auf dem GeneChip Array. Das Kollektiv bestand aus sechs Patienten mit einem Magenkarzinom im Stadium T2b, Mx und G2, von denen drei der Patienten Lymphknotenmetastasen aufwiesen (N1) und drei keine Lymphknotenmetastasen (N0) hatten. Weitere 62 Fälle mit einem Magenkarzinom vom intestinalen Typ (Kardia, Antrum oder Korpus) wurden als unabhängiges Validierungskollektiv für die qualitative und quantitative Analyse ausgewählt. Von 46 Patienten dieses Kollektivs war auch an den Tumor angrenzendes nicht-neoplastisches Gewebe (Nicht-Tumorproben) vorhanden, das unter Umständen auch Entzündungszellen enthalten kann. Zusätzlich stand unfixiertes, kryokonserviertes Tumor- und dazugehöriges Normalgewebe von 105 Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen des Ösophagus, Magen, Kolon, Rektum und der Leber zur Verfügung.

Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Tumor- und dazugehörige Nicht-Tumorproben waren von 127 Patienten aus sechs verschiedenen Bereichen des Hepato-Gastrointestinaltrakts (Ösophagus, Magen, Leber, Pankreas, Kolon und Rektum) vorhanden. Zusätzlich wurde eine unabhängige Serie von 487 Magenkarzinomen von Patienten zusammengestellt, die sich einer totalen oder partialen Gastrektomie aufgrund eines Adenokarzinoms des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs unterzogen hatten.

Alle Gewebeproben stammen aus den Archiven der Institute für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und der Charité Berlin Mitte. Die Patienten wurden entweder am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (1997-2009) oder am Universitätsklinikum der Charité in Berlin (1995-2008) operiert. Das Frischgewebe für die mRNA-Analysen wurde unmittelbar nach der Operation bei -80 °C tiefgefroren. Alle entnommenen Proben wurden durch einen erfahrenen Pathologen histologisch untersucht.

Informationen zum weiteren Krankheitsverlauf (*follow-up*) wurden aus Klinikaufzeichnungen und durch Kontaktaufnahme zum behandelnden Arzt eingeholt.

Mithilfe der *Registerstelle des Krebsregisters Schleswig-Holstein* konnte das Überleben und Versterben von Patienten exakt ermittelt werden.

Diese Studie ist von der lokalen Ethikkommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel genehmigt worden (Referenz-Nr. D 453/10, Kopie siehe Anhang 9.5). Die Patientencharakteristika der genannten Kollektive sind in Tabelle 3.1 und 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.1 Patientencharakteristika für die mRNA-Analyse.

Kollektive Real-time RT-PCR			
Studienkollektiv	n	Alter (MW ± SA); Spannweite in Jahren	M : F
Gesamt	6	63 ± 24; 25-83	4 : 2
N0	3	65 ± 21; 41-83	2 : 1
N1	3	61 ± 31; 25-80	2 : 1
Validierungskollektiv	n	Alter (MW ± SA); Spannweite in Jahren	M : F
Gesamt	62	67 ± 11; 41-87	33 : 29
N0	25	66 ± 12; 41-87	14 : 11
N1	37	67 ± 10; 45-85	19 : 18
Hepato-gastro- intestinales Kollektiv	n	Alter (MW ± SA); Spannweite in Jahren	M : F
Gesamt	105	67 ± 11; 40-85	58 : 47
Ösophagus AK	9	63 ± 7; 51-74	4 : 5
Ösophagus SCC	7	64 ± 9; 48-73	4 : 3
Magen intestinal	19	69 ± 9; 54-85	13 : 6
Magen diffuse	21	68 ± 11; 43-82	11 : 10
HCC	4	62 ± 13; 43-73	4 : 0
CC	6	63 ± 13; 46-77	4 : 2
Kolon	19	70 ± 11; 45-85	9 : 10
Rektum	20	64 ± 12; 40-84	9 : 11

Verteilung von Alter und Geschlecht im Studien- und Validierungskollektiv zwischen N0 und N1. AK = Adenokarzinom; SCC = Plattenepithelkarzinom (*squamous cell carcinoma*); HCC = hepatozelluläres Karzinom (*hepatocellular carcinoma*), CC = Cholangiokarzinom (*cholangiocarcinoma*); n = Anzahl; MW = Mittelwert; SA = Standardabweichung; M = Männer; F = Frauen

Tabelle 3.2 Patientencharakteristika für die Immunhistochemie.

Kollektive Immunhistochemie			
Hepato-gastro-intestinales Kollektiv	n	Alter (MW ± SA); Spannweite in Jahren	M : F
Gesamt	127	66 ± 12; 17-89	64 : 63
Ösophagus AK	8	64 ± 9; 51-78	5 : 3
Ösophagus SCC	6	66 ± 9; 48-73	4 : 2
Magen intestinal	13	67 ± 9; 54-85	8 : 5
Magen diffus	19	69 ± 10; 55-82	9 : 10
HCC	16	59 ± 17; 17-82	8 : 8
CC	8	64 ± 12; 46-77	4 : 4
Pankreas	17	62 ± 9; 50-78	7 : 10
Kolon	20	74 ± 11; 45-89	9 : 11
Rektum	20	64 ± 12; 40-84	10 : 10
TMA Kollektiv	n	Alter (MW ± SA); Spannweite in Jahren	M : F
Gesamt	487	68 ± 11; 33-92	304 : 183
Intestinal	242	70 ± 10; 33-92	171 : 71
Diffus	146	64 ± 11; 35-89	61 : 85
Mischtyp	28	69 ± 11; 45-92	22 : 6
Unklassifiziert	52	65 ± 12; 34-89	33 : 19
Großflächenschnitte aus dem TMA Kollektiv	n	Alter (MW ± SA); Spannweite in Jahren	M : F
Gesamt	100	70 ± 11; 33-88	73 : 27

Verteilung von Alter und Geschlecht in den Kollektiven der TMA (Tissue Microarray) und Großflächenschnitte. AK = Adenokarzinom; SCC = Plattenepithelkarzinom (*squamous cell carcinoma*); HCC = hepatozelluläres Karzinom (*hepatocellular carcinoma*), CC = Cholangiokarzinom (*cholangiocarcinoma*); n = Anzahl; MW = Mittelwert; SA = Standardabweichung; M = Männer; F = Frauen

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolation

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus pulverisiertem, kryokonserviertem Tumor- und Nicht-Tumorgewebe sowie aus humanen Zellen erfolgte mit dem mirVana miRNA Isolation Kit von Ambion gemäß der Anleitung des Herstellers. Das Verfahren beruht auf der Phenol:Chloroform-Methode, bei der eine Säulenaufreinigung nachgestellt ist.

Unter Stickstoffkühlung wurden jeweils etwa 30 mg Gewebe mit einem sauberen Hammer abgetrennt und pulverisiert. Das zertrümmerte Gewebe wurde in 300 µl denaturierendem Lysispuffer aufgenommen und durch Auf- und Abziehen mit einer sterilen 20-Gauge-Kanüle (20 G, 0,9 mm) homogenisiert.

Für die Isolation von RNA aus vitalen Zellkulturen wurde das Medium abgenommen und die Kultur mit PBS gespült. Die Zellen wurden nun in 1 ml frischem PBS mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bei 2.500 x g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl Lysispuffer resuspendiert.

Anschließend wurde der Gewebe- bzw. Zellansatz nach Zugabe von 30 µl miRNA Homogenate Additive einige Minuten auf Eis inkubiert und das Lysat mit 300 µl Phenol:Chloroform extrahiert. Bei dieser ersten Aufreinigung wurde ein Großteil störender zellulärer Komponenten, wie auch der größte Teil der DNA, entfernt, RNasen inaktiviert und die RNA von anderen Biomolekülen gereinigt. Die Probe wurde durch 30-sekündiges Vortexen gut mit Phenol:Chloroform durchmischt. Anschließend wurden die wässrige und die organische Phase durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g getrennt. Aus der oberen wässrigen Phase wurden etwa 200 µl entnommen, mit 250 µl 96 %igem Ethanol gefällt und auf dem Glasfaser-Filter immobilisiert. Nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten wurde die RNA mit 80 µl 95 °C warmem, Nuclease-freien Wasser eluiert. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80 °C.

3.2.2 DNase-Verdau

Um eine Verunreinigung mit DNA ausschließen zu können, wurde routinemäßig ein DNase-Verdau der RNA mit dem Turbo DNasefree Kit von Ambion gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 80 µl der eluierten RNA verwendet und mit 8 µl des 10x DNase I Puffers versetzt. Der Verdau erfolgte für 30 min bei 37 °C nach Zugabe von 2 µl rDNase I. Anschließend wurde der Enzymverdau mit 9 µl resuspendiertem Inaktivationsreagenz gestoppt, das Reagenz durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß übergeführt. Abschließend konnte die Konzentration der verdauten RNA am Nanodrop Spektralphotometer (Abschnitt 3.2.3) bestimmt werden. Die RNA wurde bis zur Synthese in cDNA bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von RNA, Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurde das Nanodrop Spektralphotometer 2000c (Thermo Scientific) und die dazugehörige Analysesoftware verwendet. Bei diesem Gerät wurden jeweils 2 µl einer unverdünnten Probe direkt auf die Messoberfläche pipettiert und gegen den Leerwert einer Referenzlösung gemessen. Bei der Referenzlösung handelte es sich um den Puffer, in dem die zu messende Probe vorlag, z. B. Nuklease-freies Wasser oder TE-Puffer. Die Nukleinsäure-Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm automatisch von dem Gerät bestimmt. Eine Absorptionseinheit A₂₆₀ entspricht: 40 ng ssRNA/µl, 33 ng ssDNA/µl und 50 ng dsDNA/µl. Durch die zusätzliche Bestimmung der Extinktion bei 280 nm konnte aus dem Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm eine Aussage über die Reinheit der gemessenen Probe getroffen werden. Werte unter 1,8 deuten auf Phenol- oder Proteinkontaminationen hin.

3.2.4 GeneChip Analyse

Mit dem GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) ist die Analyse von über 47.000 Transkripten und Varianten, inklusive 38.500 gut charakterisierten menschlichen Genen in einem Array möglich. Die Methode wird an anderer Stelle ausführlich beschrieben [132,133].

Eine Qualitätskontrolle der RNA sowie die Amplifikation und Markierung der RNA-Proben wurde im Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité Berlin von Dr. Ute Ungethüm durchgeführt.

Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit der Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS 1.4) unter Berücksichtigung des statistischen Expressionsalgorithmus. Dabei bestimmte ein p-Wert von 0,05 ob das Transkript zuverlässig detektierbar ($p < 0,05$, *present*) oder nicht detektierbar (*absent*) war. Um die verschiedenen Chips untereinander vergleichen zu können, wurde das Ziel-signal auf 500 gesetzt. Die Normalisierung umfasste drei Schritte: zunächst wurden Signale kleiner als 300 auf 300 gesetzt, jeder Chip wurde auf die 50. Perzentile des jeweiligen Chips normalisiert und jedes Gen auf den Median der Messung des Gens normalisiert. Die bioinformatische Auswertung des GeneChip Arrays wurde in Vorarbeiten von Dr. Ralf-Jürgen Kuban im Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité Berlin vorgenommen. Diese Daten stellen den Ausgangspunkt für alle nachfolgenden Studien dar.

Unter den identifizierten Genen wurde nun gezielt nach differentiell exprimierten GPCR- und GPCR-assoziierten Genen gesucht, die einen Änderungsfaktor der Expression (*fold change*) größer als 1,5 aufwiesen. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden diese Gene *in silico* in der ENTREZ Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) auf ihre Plausibilität hin überprüft. Mithilfe der Genbezeichnung wurde gezielt nach Veröffentlichungen gesucht, die den Rezeptor in einen Zusammenhang mit humanen Krankheitsbildern, Tumorigenese und Metastasierungsprozessen oder Stammzelleigenschaften bringen konnten.

3.2.5 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription von Gesamt-RNA in einzelsträngige cDNA erfolgte mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit von Roche. Es wurden jeweils 2 µg RNA im doppelten Ansatz mit 2 µl Oligo(dT)₁₈ Primern (50 pmol/µl) und 4 µl Random Hexamer Primern (600 pmol/µl) gemischt, mit Nuclease-freiem Wasser auf 26 µl aufgefüllt und bei 65 °C für 10 min denaturiert. Anschließend wurden 8 µl des 5x Reaktionspuffers, 1 µl Protector RNase Inhibitor (40 U/µl), 4 µl Deoxynucleotide Mix (je 10 mM) und 1 µl Transcriptor Reverse Transkriptase (20 U/µl) hinzugefügt. Das Mischen der Reagenzien erfolgte auf Eis, um eine frühzeitige cDNA-Synthese zu verhindern und das Risiko einer

RNA-Degradation zu minimieren. Die parallel pipettierte Negativkontrolle enthielt keine Reverse Transkriptase (-RT).

Die Umschreibung erfolgte mittels eines selbst generierten Temperatur-Programms im THERMO HYBAID PCR Express Thermal Cycler und bestand aus einer 10-minütigen Inkubation bei 25 °C, der Reversen Transkription für 60 min bei 50 °C und der Inaktivierung des Enzyms für 5 min bei 85 °C. Die Ansätze wurden anschließend auf 8 °C herunter gekühlt und bei -20 °C gelagert. Die erfolgreiche cDNA-Synthese wurde anhand einer PCR für das *Housekeeping* Gen ACTB (β -Aktin) überprüft.

3.2.6 Qualitative RT-PCR

In der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) wurden humane Primer für die Quantifizierung von mRNA in der Real-time RT-PCR etabliert, die cDNA-Synthese überprüft oder DNA für Klonierungsexperimente amplifiziert. Diente cDNA aus Patientengewebe oder Zelllinien als *Template*, so wurden die Primer mit dem Online-Programm der *Universal Probe Library* (Roche) Intron-überspannend entworfen, um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA ausschließen zu können (siehe Tabelle 3.3).

Die qualitativen RT-PCRs wurden mit dem Taq PCR Core Kit (Qiagen) auf dem Thermocycler peqSTAR 96 Universal Gradient von PEQLAB durchgeführt. Ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 μ l setzte sich standardmäßig aus 2 μ l des cDNA-*Templates*, 2 μ l 10x CoralLoad PCR Puffer (enthält 1,5 mM $MgCl_2$), 0,4 μ l dNTP-Mix (0,2 mM je dNTP), je 0,6 μ l Primer (0,3 μ M vorwärts und rückwärts), 0,1 μ l Taq DNA Polymerase (0,5 Units) und 14,3 μ l RNase-freiem Wasser zusammen. Für die Negativkontrolle wurde anstelle des *Templates* 2 μ l RNase-freies Wasser pipettiert. Die Hybridisierungstemperatur war für jedes Primerpaar individuell und wurde zunächst durch eine Gradienten-PCR mit verschiedenen Annealing-Temperaturen ermittelt. Das typische PCR-Programm setzte sich zusammen aus einer einmaligen Initialisierung von 3 min bei 94 °C und einer anschließenden zyklischen Wiederholung (35-40 mal) von Denaturierung für 1 min bei 94 °C, Annealing für 30 s bei der Primer-spezifischen Hybridisierungstemperatur (siehe Tabelle 3.4) und der Elongation (Amplifikation) bei 72 °C. Die PCR-Reaktion schloss mit einer finalen Elongation bei

72 °C für 10 min ab und der Ansatz wurde dann auf 8 °C herunter gekühlt. Etwa 10 µl des PCR-Produkts wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel überprüft.

Tabelle 3.3 Primer Details für die qualitative PCR und die Real-time RT-PCR.

	Vorwärts (5' → 3')	Rückwärts (5' → 3')	Länge (bp)	Referenzsequenz	Sonde LC480
BioTeZ Berlin-Buch GmbH					
β-Actin	CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC	CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT	250	NM_001101.3	
B2M	ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA	ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG	114	NM_004048.2	
CXCL12	CGA TTC TTC GAA AGC CAT GT	CAC TTG TCT GTT GTT GTT CTT CAG	114	NM_199168.2	
CXCR4	CAG CAG GTA GCA AAG TGA CG CAG GTA GCA AAG TGA CG	CAG GGT TCC TTC ATG GAG TC	156	NM_003467.2	
Biomers.net					
ADAM17	TCC TGG CAT GTA TCT GAA C	GCA AGG ACT GTT CCT GTC ACT	94	NM_003183.4	62
CAPN2	CGC TGA CCC CCA GTT TAT C	TCA AGG TGA GGG AGG CAA T	104	NM_001748.4	25
CYCC	GGA AAA GTC ATT GAT GGG ATG	CAA AAG GCG TTT TCA CGT CTA	127	NM_000943.4	59
FZD7	AAG CGG TTT GGA TGA GA	GAT TCA CAT CGC CGT TAT CA	68	NM_003507.1	4
LGR5	AAT TTG CGA AGC CTT CAA TC	GGG ATT TCT GTT AAC GCA TTG	128	NM_003667.2	5
SDHA	ATT TGG TGG ACA GAG CCT CA	CTG GTA TCA TAT CGC AGA GAC CT	126	NM_004168.2	5

LC480 = LightCycler 480 Real-time RT-PCR. Quelle: BioTeZ Berlin-Buch GmbH; Biomers.net; *Universal Probe Library*, Roche

Tabelle 3.4 PCR Bedingungen in der qualitativen PCR und der Real-time RT-PCR.

Primer	Qualitative RT-PCR			Real-time RT-PCR		
	Annealing t ₁ T ₂	Zyklen	Konzentration	Annealing t ₁ T ₂	Zyklen	MgCl ₂
ACTB	30 s, 62 °C	35	0,5 µM	20 s, 60 °C	45	/
ADAM17	30 s, 60 °C	40	0,3 µM	30 s, 60 °C	45	/
BGH/T7	30 s, 60 °C	40	0,3 µM	30 s, 60 °C	45	/
B2M	30 s, 60 °C	35	0,5 µM	20 s, 57 °C	45	/
CAPN2	30 s, 57 °C	40	0,5 µM	30 s, 60 °C	45	4 mM
CXCL12	30 s, 57 °C	35	0,5 µM	20 s, 60 °C	45	/
CXCR4	30 s, 57 °C	35	0,3 µM	20 s, 60 °C	45	/
CYCC	30 s, 60 °C	40	0,5 µM	30 s, 60 °C	45	4 mM
FZD7	30 s, 60 °C	40	0,5 µM	30 s, 60 °C	45	/
LGR5	30 s, 60 °C	45	0,6 µM	30 s, 60 °C	45	/
SDHA	30 s, 60 °C	35	0,3 µM	30 s, 60 °C	45	2 mM

¹ Zeit² Temperatur

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese konnten PCR-Produkte, RNA oder DNA ihrer Fragmentlänge nach aufgetrennt, mit Ethidiumbromid unter kurzweiligem UV-Licht detektiert und anhand eines Größenstandards identifiziert werden. Je kleiner das nachzuweisende DNA-Molekül war, desto höher konzentriert und somit engmaschiger wurde das Agarosegel angesetzt.

Für die Herstellung eines 1,5 %igen Agarosegels wurden 3 Agatabs (0,5g/Tab) in 100 ml 1x TAE-Puffer quellen gelassen und in der Mikrowelle aufgekocht. Das flüssige Gel wurde im Verhältnis 1/10 mit Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und anschließend in einer Gelform auspolymerisiert. PCR-Produkte des Taq PCR Core Kits konnten direkt auf das Gel geladen werden, alle anderen Proben wurden zuvor mit Loading Dye versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Um die Identifizierung der Fragmente zu ermöglichen, liefen in der ersten Tasche 5 µl eines Größenstandards (SmartLadder MW-1700-10, Eurogentec oder GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific) mit. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 Volt in 0,5x TAE Laufpuffer. Da Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren interkaliert und unter UV-Licht bei 254 nm fluoresziert, konnte das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese im Geldokumentationssystem GelDoc XR (BioRad) analysiert und fotografiert werden.

3.2.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Gelen

Der NucleoSpin Extract II Kit von Macherey-Nagel wurde zur Aufreinigung von PCR-Produkten und anderen DNA-Fragmenten aus Agarosegelen eingesetzt. Es wurden zunächst etwa 20 bis 50 µl einer Probe elektrophoretisch aufgetrennt und das betreffende Fragment am UV-Platz von Syngene anhand eines Größenstandards im Gel identifiziert. Die spezifische Bande wurde mit einem Skalpell exakt ausgeschnitten und entsprechend seiner Größe in 200 µl NT Binding Puffer pro 100 mg Gel bei 50 °C vollständig gelöst. Diese Lösung wurde anschließend auf eine NucleoSpin Extract II Säule aufgetragen und durch Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g an die Silizium-Membran gebunden. Die Säule wurde durch Zugabe von 600 µl ethanolhaltigem NT3 Puffer gewaschen, getrocknet und das DNA-Fragment abschließend mit 30 µl Nuclease-freiem Wasser eluiert.

Die Aufreinigung diente der Entfernung störender Komponenten, wie Primer-Rückständen, PCR-Reagenzien oder Enzymen aus der DNA, so dass diese für weitere Reaktionen eingesetzt werden konnte. Für jedes verwendete Primerpaar wurde ein aufgereinigtes PCR-Produkt sequenziert.

3.2.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden wurde mit dem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Version 2.0 (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchmethode unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten dNTPs. Pro Sequenzieransatz wurden etwa 400 ng DNA eingesetzt und mit 1 µl eines Sequenzierprimers (10 µM), 4 µl Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix und Nuclease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem peqstar 96 Gradient Thermocycler nach folgendem Temperaturprotokoll durchgeführt: einmalig 95 °C für 5 min, dann 30 Zyklen 96 °C, 20 s; 50 °C, 10 s; 60 °C, 4 min und abschließend Kühlung auf 4 °C. Der Reaktionsansatz wurde nachfolgend über NucleoSeq-Säulchen (Macherey-Nagel) aufgereinigt und auf dem ABI PRISM Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ausgelesen.

3.2.10 Quantitative Real-time RT-PCR

Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression wurde mit den LightCycler Systemen in der quantitativen Real-time RT-PCR nach dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt.

Zu Beginn des Projekts wurde mit dem kapillarbasierten LightCycler 1.5 unter Verwendung des QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) gearbeitet. Später erfolgte die Messung im 96-well-Format durch das LightCycler 480 System, den LightCycler 480 Probes Master Mix, zusammen mit den *Universal Probe Library* Probes von Roche.

3.2.10.1 Quantifizierung mit der SYBR Green Methode

Das Prinzip des QuantiTect SYBR Green PCR Kits (Qiagen) beruht auf dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I, der in doppelsträngige DNA interkaliert [134]. Die Quantifizierung des PCR-Produkts erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR durch einzelne Fluoreszenzmessungen jeweils am Ende der Elongation. Der sogenannte Crossing Point (Cp-Wert) markiert den Zeitpunkt, an dem die exponentielle Phase des PCR-Produkts beginnt und die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt und detektiert wird. Dieser korreliert mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA und kann deshalb zur Quantifizierung der Transkripte herangezogen werden. Da SYBR Green I sequenzunspezifisch an jede doppelsträngige DNA bindet, kann auch von jedem doppelsträngigen PCR-Artefakt (z. B. Primer-Dimere) ein positives Fluoreszenzsignal ausgehen. Die Spezifität der detektierten Produkte wurde daher im Anschluss an die letzte Elongation der PCR anhand ihrer Schmelzpunkte in einer Schmelzkurvenanalyse bestimmt. Dieser hängt von der Fragmentlänge und dem GC-Gehalt des Produkts ab und ist somit für jedes Amplifikat charakteristisch.

In einem typischen Reaktionsansatz wurden 2 µl cDNA *Template* eingesetzt und bei individuell optimierten PCR-Bedingungen (Tabelle 3.4) quantifiziert. Ein Lauf bestand aus neun Proben, sechs seriellen Verdünnungsstufen und einer *no template control* (NTC), jeweils als Duplikate.

Durch Hinzuziehen des Threshold Cycles (Ct-Wert) konnte die mRNA-Kopienzahl aus der Standardkurve mithilfe der LightCycler Software Version 3.5

von Roche berechnet werden. Die erhaltenen Werte entsprachen der Menge des Transkripts bzw. der Kopienanzahl.

3.2.10.2 Quantifizierung mit dem sondenbasierten System

Für die Messung im LightCycler 480 System wurde ein 20 µl Ansatz aus 10 µl 2x LightCycler 480 Probes Master, 100-200 nM *Universal Probe Library* Probe, jeweils 0,2 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (200-400 nM) mit Nuclease-freiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Zu dem Mastermix wurden 5 µl des 1:50 vorverdünnten cDNA-*Templates* pipettiert. Eine 96-well Platte war mit 10 verschiedenen Proben, dem Kalibrator (einer Referenz-RNA) und einer *no template control* (NTC), jeweils in Duplikaten bestückt. Diese wurden auf einer Platte für drei Referenzgene und ein Zielgen mit folgendem Temperaturprogramm quantifiziert: einmalige Denaturierung für 10 min bei 95 °C; 45 Zyklen Amplifikation aus: Denaturierung für 10 s bei 95 °C, Annealing für 30 s bei 60 °C, Elongation für 1 s bei 72 °C und abschließende Kühlung auf 40 °C.

Die *Universal Probe Library* umfasst 165 unterschiedliche Hydrolyse-Sonden, die aufgrund ihrer Länge von nur 8-9 Nukleotiden für den Nachweis mehrerer Transkripte verwendet werden können (7000 Transkripte pro Sonde). Durch die Wahl des passenden Primerpaares ist die Amplifikation hoch spezifisch und es wird jeweils nur ein Transkript in einem PCR-Ansatz detektiert. Die Sonden sind am 5'-Ende mit dem Fluoreszein-Reporter FAM und am 3'-Ende mit einem Dark Quencher versehen. Während der Annealing-Phase der PCR binden Primer und Sonde spezifisch an die Zielsequenz. Die Taq-Polymerase, die außerdem eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, baut die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende ab. Dadurch entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Die Messung findet in jedem Zyklus am Ende der Elongation statt [135].

Die Bindungsaffinität und biologische Stabilität der Sonde werden durch sogenannte *Locked Nucleid Acids* (LNA) gewährleistet. Dabei handelt es sich um Ribonukleoside, die zwischen dem 2'-Sauerstoffatom und dem 4'-Kohlenstoffatom eine Methylenbrücke enthalten und dadurch eine bizyklische Struktur ausbilden [136]. Da durch den Einsatz des sondenbasierten Verfahrens viel Etablierungsarbeit überflüssig wurde, war dies fortan die Methode der Wahl.

3.2.10.3 Bestimmung der PCR-Effizienz

Um mithilfe der gemessenen Ct-Werte eine Quantifizierung der Proben vornehmen zu können, ist die Bestimmung der PCR-Effizienz von großer Bedeutung. Diese ist abhängig von der Kinetik der PCR-Reaktion und wurde im sondenbasierten System aus einer Verdünnungsreihe für die drei Referenzgene und ein Zielgen gemessen und abgespeichert. Im SYBR Green I Format am LightCycler 1.5 wurde die Verdünnungsreihe in jedem PCR-Lauf mitgemessen. Die Verdünnungsreihe wurde durch sequenzielle Verdünnung einer Referenz-RNA (bestehend aus einer Sammlung verschiedener RNAs adulter humaner Gewebe) über sechs Zehnerpotenzen hergestellt. Anhand ihrer Ct-Werte wurde eine Standardkurve erstellt und die PCR-Effizienz anhand der Steigung der Geraden berechnet: $E = 10^{(-1/\text{Steigung der Geraden})}$. Im Idealfall beträgt die Steigung der Geraden -3,322 und entspricht einer Effizienz von $2 = 100\%$. Für jedes Ziel- und Referenzgen wurde die Standardkurve individuell berechnet.

3.2.10.4 Normalisierung

Die Normalisierung der ermittelten Expressionsdaten erfolgte entsprechend der relativen Quantifizierung. Da das Expressionsniveau vieler sogenannter *Housekeeping* Gene (HKGs) nachweislich beträchtlichen Schwankungen unterliegen kann [137], stützt man sich bei der Normalisierung nicht nur auf ein einzelnes HKG. Durch die Verwendung mehrerer zuvor validierter HKGs kann so eine zuverlässigere Normalisierung erreicht werden [138].

Zunächst erfolgte eine Vorauswahl von HKGs, für die in der Fachliteratur eine gute Stabilität, insbesondere im Magengewebe, beschrieben war [137,139,140]. Welche dieser HKGs sich im vorliegenden Testsystem am besten zur Normalisierung eignen, wurde anhand ihrer Expressionsstabilität im Tumor- und Nicht-Tumorgewebe ermittelt und mit dem Programm geNorm Visual Basic Application [138] ausgewertet.

Basierend auf der Annahme, dass das Expressionsverhältnis zweier idealer HKGs in allen Proben gleich ist, berechnet geNorm die Genstabilität M als Durchschnitt der paarweisen Variation eines ausgewählten Gens mit allen anderen Genen. Da nun schrittweise das jeweils instabilste Gen (höchster M -Wert) aus der Analyse ausgeschlossen wird, können am Ende die stabilsten HKGs identifiziert werden. Die optimale Anzahl von HKGs, die für die

Kalkulation des Normalisierungsfaktors notwendig sind, wurde durch eine paarweise Varianzanalyse der Normalisierungsfaktoren ermittelt. In die Kalkulation wird zu den beiden stabilsten HKGs solange ein nächst stabileres HKG hinzugezogen, bis keine bedeutende Verbesserung (Varianz < 0,15) des berechneten Normalisierungsfaktors mehr eintritt. Es wird die Verwendung von drei, mindestens aber von zwei HKGs empfohlen [138].

Der *Housekeeping*-Test ermittelte in dem vorliegenden Testsystem für *Homo sapiens succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein* (Fp) (*SDHA*), *Homo sapiens calpain 2* (*CAPN2*) und *Cyclophilin C* (*CYCC*) die höchste Stabilität. Ein Normalisierungsfaktor aus diesen drei Referenzgenen wurde daher für die Normalisierung der Zielgenexpression in der relativen Quantifizierung verwendet. Die Expressions-Daten der Zielgene wurden mit der LightCycler 480 Software automatisch gegen den Normalisierungsfaktor der drei HKGs *CAPN2*, *SDHA* und *CYCC* normalisiert und verrechnet.

Um annähernd normalverteilte Werte zu erhalten, wurden die Daten anschließend logarithmiert. Das Logarithmieren ist statistisch notwendig, da der verwendete t-Test eine Normalverteilung voraussetzt.

3.2.11 DNA-Isolation

Die Isolation von genomischer DNA aus Zellen wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben vorgenommen. Für jede Isolation wurden etwa 4×10^6 Zellen in einem Volumen von 200 μ l PBS resuspendiert. Die Zellen der Suspension wurden mit 20 μ l Proteinase K unter Zugabe von 200 μ l AL-Puffer für 10 min bei 56 °C lysiert und anschließend mit 200 μ l 96 %igem Ethanol versetzt. Während die DNA im folgenden Schritt an eine Silikat-Gel-Membran der QIAamp Mini spin Säule adsorbierte, passierten die übrigen Zellbestandteile, wie auch Proteine und andere Fragmente, die Membran in den folgenden zwei Waschschritten. Abschließend wurde die aufgereinigte DNA in konzentrierter Form mit AE-Puffer von der Membran eluiert und vermessen (siehe Abschnitt 3.2.3).

3.2.12 Fragmentanalyse

Um die Identität und Abstammung der Magenkarzinomzelllinien MKN45 und MKN74 zu sichern, wurde ein short tandem repeat (STR) multiplex Assay der isolierten genomischen DNA mit dem AmpFISTR Identifier PCR Amplification Kit am 3500 Genetic Analyzer (beides Applied Biosystems) durchgeführt. In einer Reaktion können hier 15 Tetranucleotid-Repeat-Loci und der geschlechtsanzeigende Amelogenin Marker amplifiziert werden.

In der PCR wurden entsprechend den Herstellerangaben jeweils 1 ng Gesamt-DNA amplifiziert. Je 1 µl des PCR-Produkts wurde anschließend mit 23 µl Formamid und 1 µl des Längenstandards GS500-LIZ versetzt und für 3 min bei 95 °C denaturiert. Das Amplifikat wurde dann kapillarelektrophoretisch auf dem 3500 Genetic Analyzer aufgetrennt und mit der 3500 Data Collection v1.0 Software im Abgleich mit kommerziellen Allelleitern typisiert.

Die Identität von MKN45 und MKN74 wurde mittels Fragmentanalyse einwandfrei bestätigt.

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen

Für die Extraktion von Gesamtproteinen wurde zunächst das Kulturmedium der konfluent wachsenden Zellen abgesaugt und diese mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 1 ml PBS geerntet, bei 400 x g für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde nun in 600 µl ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent mit 1x Protease Inhibitor Cocktail (Complete EDTA-free, Roche) resuspendiert und die Zellen 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator lysiert. Zellbruchstücke, DNA und RNA wurden durch die Zentrifugation bei 16.000 x g für 15 min sedimentiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übergeführt. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte erst bei -20 °C und langfristig bei -80 °C.

3.3.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe

Zur Isolation von Proteinen aus humanem Gewebe wurden etwa 30 mg pulverisiertes, kryokonserviertes Gewebe mit 500 µl ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent mit 1x Protease Inhibitor Cocktail (Complete EDTA-free, Roche) vermischt und 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator lysiert.

Unlösliche Fragmente wurden anschließend durch die Zentrifugation bei 16.000 x g für 15 min sedimentiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übergeführt. Die Proteinextrakte wurden für den direkten Gebrauch bei -20 °C, später dann bei -80 °C gelagert.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der DC Protein Assay von Bio-Rad verwendet. Dieser kolorimetrische Assay basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry [141], dessen Farbentwicklung auf zwei chemischen Reaktionen beruht. Zunächst findet eine Biuret-Reaktion zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung statt. In einem zweiten Schritt wird Cu(II) zu Cu(I) reduziert, das wiederum das gelbe Folinreagenz zu Molybdänblau reduziert. Die Intensität der Blaufärbung wird dann zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration herangezogen.

Die Proteinbestimmung erfolgte im 96-well Format, eine Standardkurve aus acht BSA-Verdünnungsstufen wurde bei jeder Messung mitgeführt. Zunächst wurden 5 µl der BSA-Standards bzw. Proteinlösungen mit 25 µl Reagenz A (20 µl Reagenz S und 1 ml alkalische Kupfertartrat-Lösung) und 200 µl Reagenz B (Folinreagenz-Lösung) versetzt. Nach einer Inkubation von 15 min auf einem Mikroplatten Mixer erfolgte die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentrationen bei 595 nm am SpectraMax 250 Microplate Reader. Mithilfe der Standardkurve konnte die gemessene Absorption in eine Proteinkonzentration umgerechnet werden.

3.3.4 Western-Blot-Analyse

3.3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli verwendet [142]. SDS (*sodium dodecyl sulfate*) überdeckt die Eigenladung der Proteine mit einer konstant negativen Ladung. Das SDS führt gemeinsam mit der Denaturierung durch hohe Temperaturen zu einer Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen und so zu einer Linearisierung der Proteine. Die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe haben nun ein konstantes Masse-Ladungs-Verhältnis und unterscheiden sich nur noch in ihrer Größe. Da längere Proteine im Gel

stärker zurückgehalten werden als kürzere, ermöglicht die Linearisierung eine Auftrennung nach der Proteinlänge, proportional zur Molekülmasse.

Genau 30 µg des Proteinlysats wurden jeweils mit 5x Laemmli-Probenpuffer für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Unter Verwendung eines SDS-haltigen, diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystems wurden die Proteine bei 25 mA/Gel auf einem 4 %-16,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel zusammen mit einem Größenstandard (ColorBurst Electrophoresis Marker, Sigma-Aldrich) aufgetrennt.

3.3.4.2 Western Blot

Nach der Auftrennung erfolgte die Färbung eines der beiden identisch beladenen SDS-Polyacrylamid-Gele mit Coomassie-Brilliantblau. Die Proteine des ungefärbten Gels wurden auf eine Hybond ECL Nitrocellulose Membran (GE Healthcare) transferiert. Hierfür wurden jeweils in Blotting-Puffer getränktes Vlies, Whatman-Filterpapier, das Gel, die Nitrocellulose-Membran und wieder Whatman-Filterpapier und Vlies luftblasenfrei in eine Blothalterung (Bio-Rad) gestapelt. Die Proteine wurden nun elektrophoretisch bei 150 mA für 60 min auf die Membran übertragen.

3.3.4.3 Proteindetektion

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Western-Blot-Membran zunächst für 60 min in Blocking Solution (2 % Amersham ECL Advance Blocking Agent gelöst in TBS-Tween) getränkt. Die spezifische Proteindetektion erfolgte durch Inkubation mit dem Primärantikörper (LGR5, 1:20.000) bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper (1:4000, Dako), der gegen den konstanten Teil des primären Antikörpers gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist, für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die gleichmäßige Proteinbeladung zu überprüfen, wurde die Membran zusätzlich für jeweils 60 min mit einem Anti-β-Aktin-Antikörper (1:10.000, Klon AC-15, Sigma-Aldrich) und dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1:4000, Anti-*mouse*, Dako) inkubiert. Zwischen den jeweiligen Inkubationsschritten wurden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Spülen in TBS-Tween (0,1 %) abgewaschen. Die Proteindetektion erfolgte durch Chemilumineszenz mit dem

Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare). Gemäß den Herstellerangaben wurden Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 1:1 gemischt und für 30 s mit der Nitrocellulose-Membran inkubiert. Durch die Reaktion der membrangebundenen Meerrettich-Peroxidase mit dem Verstärkermolekül Peroxid und dem Chemilumineszenz-Substrat Lumigen TMA-6 (GE Healthcare) wurde ein Lumineszenzsignal erzeugt, das mit dem Molecular Imager ChemiDoc XRS+ von Bio-Rad detektiert werden konnte. Es wurden jeweils zwei Kontrollen mitgeführt: In der Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch TBS-Tween ersetzt, während er in der Peptidkontrolle zuvor für zwei Stunden mit seinem immunisierenden Peptid inkubiert wurde, um so alle spezifischen Bindungsstellen des Antikörpers zu blockieren.

3.3.5 Herstellung eines Antikörpers

Zur Herstellung eines hochspezifischen Antikörpers wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Pineda-abservice (Berlin) polyklonale Antiseren gegen das carboxyterminale Ende des humanen LGR5-Rezeptors generiert (siehe Abbildung 3.1). Dafür wurden jeweils zwei Kaninchen mit den Peptiden: SPAYPVTESCHLSSVAFVPCL (Cterm), RSKHPSLMSINSDDVEKQSC (11b) und CSITYDLPPSSVPSPAYPVTE (12) immunisiert, so dass am Ende sechs verschiedene Antikörper zur Verfügung standen. Um eine Kreuzreaktivität des neu generierten Antikörpers mit den strukturell ähnlichen Rezeptoren LGR4 und LGR6 ausschließen zu können, wurde zuvor ein Sequenzabgleich mithilfe des Alignment Programms des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) durchgeführt. In der Peptidregion von LGR5, die für die Immunisierung verwendet wurde, konnten keine Sequenzhomologien zu LGR4 oder LGR6 festgestellt werden.

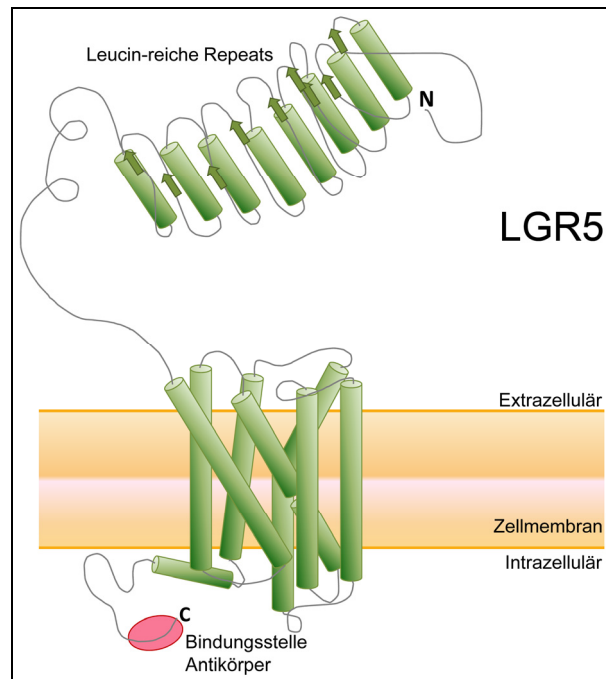


Abbildung 3.1 Struktur des LGR5-Rezeptors.

Die hypothetische Struktur des LGR5-Rezeptors umfasst eine große extrazelluläre Domäne mit multiplen Leucin-reichen *Repeats* zur Ligandeninteraktion, sieben Transmembrandomänen und eine intrazelluläre Domäne für die Signaltransduktion. Die Erkennungssequenz des Anti-LGR5-Antikörpers befindet sich am C-terminalen Ende. Abbildung modifiziert nach Barker und Clevers [143].

Am 150. Immunisierungstag wurde die Immunisierung beendet und das Kaninchenserum mittels FPLC (*fast protein liquid chromatography*) am ÄKTAprime System (GE Healthcare) auf einer Protein G Säule aufgereinigt und anschließend dialysiert. Für weiterführende Analysen wurden die monospezifischen IgG-Fractionen aus dem Immuserum durch die Firma Pineda-alservice zusätzlich gegen das jeweilige immunisierende Peptid affinitätschromatographisch aufgereinigt. Der Antikörper wurde dann mit 0,02 % Natriumazid (NaN_3) versetzt und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

In Dot Blot Analysen und immunhistochemischen Voruntersuchungen zeigte der monospezifische IgG Anti-LGR5-11b-Antikörper eines Kaninchens (Tier 2) im Vergleich zu "Cterm" und "12" die höchste Affinität zusammen mit einer starken und spezifischen Immunfärbung. Dieser Antikörper wurde in der vorliegenden Arbeit fortan verwendet. Die Spezifität des neu generierten LGR5-Antikörpers wurde mittels Immunfluoreszenz, Immunzytochemie und im Western Blot ausgetestet.

Antikörperaufreinigung

Zur Isolation und Aufreinigung des polyklonalen IgG aus Immuns serum wurde eine Protein G Sepharose High Performance Säule (GE Healthcare) an das ÄKTAprime System von GE Healthcare angeschlossen. Das System wurde entsprechend den Herstellerangaben bedient. Die Säule enthält das an eine Agarosematrix gekoppelte Oberflächenprotein G, dieses Protein G bindet als Typ III Fc-Rezeptor den Fc-Teil von IgG-Antikörpern. In sieben Durchläufen wurde das IgG aus jeweils 2 ml Immuns serum, gemischt mit Bindungspuffer (20 mM Natriumphosphat), bei pH 7,0 an die Protein G Säule gebunden. Die aufgereinigten IgG-Antikörper wurden durch Herabsetzen des pH-Werts auf 2,7 mit dem Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl) von der Säule gelöst und in Neutralisationspuffer (1 M Tris-HCl, pH 9,0) aufgefangen. Über eine hinter der Säule sitzende Messzelle konnte die Leitfähigkeit und Absorption der von der Säule kommenden Flüssigkeiten bei 280 nm erfasst und über einen Schreiber protokolliert werden. Da Proteine bei 280 nm absorbieren, konnte so überprüft werden, ob der Antikörper erfolgreich von der Säule eluiert und in welcher Fraktion er aufgefangen wurde. Abschließend wurde der isolierte Antikörper über eine Dialyse mit PBS entsalzt.

3.3.6 Immunfluoreszenz

Die Spezifität des selbst hergestellten Antikörpers wurde in transient transfizierten HEK293 EBNA-Zellen validiert (Abschnitt 3.5.2.1). Nachdem etwa 10.000 Zellen für 24 h auf CultureSlide Objektträgern (BD Biosciences) angewachsen waren, wurden sie mit PBS gewaschen, in 7:3 Aceton:Methanol für 20 min bei -20 °C fixiert und anschließend mit 0,1 % Triton-X für 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert, um sie für den Antikörper zugänglich zu machen. Über Nacht erfolgte dann die Inkubation der Objektträger mit dem monoklonalen c-Myc-Antikörper (Clontech) bei 5 °C in einer Feuchtkammer, gefolgt von einem Alexa Fluor 555 konjugierten Anti-Maus-Sekundärantikörper (Invitrogen). Um die erfolgreiche Transfektion der LGR5 cDNA zu detektieren, wurden die Zellen mit dem Anti-LGR5-Antikörper, gefolgt von einem Alexa Fluor 488 konjugierten Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper jeweils für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Negativkontrolle wurden LGR5-transfizierte HEK293 EBNA-Zellen mit PBS-BSA anstelle des Primärantikörpers inkubiert.

Das Eindeckeln und die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgten mit dem VECTA-SHIELD Hard-Set mit DAPI (Vector Laboratories).

3.3.7 Immunzytochemie

Um den Erfolg der stabilen Transfektion (siehe Abschnitt 3.5.2.2) und die Sensitivität des Anti-LGR5-Antikörpers zu untersuchen, wurden immunzytochemische Färbungen an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten MKN45- und MKN74-Magenkarzinomzellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 24 h in 4 % neutralisiertem Formalin fixiert, in 2 %iger *low-melt*-Agarose-lösung resuspendiert und anschließend in der gleichen Weise wie humane Gewebeproben an einem Gewebereinbettautomaten (Leica) entwässert und in Paraffin eingebettet [133]. Die weitere Aufbereitung und Färbung der Proben mit dem Anti-LGR5-Antikörper (Verdünnung 1:1000) wurde gemäß den Immunhistochemischen Analysen humaner Gewebeschnitte durchgeführt (Abschnitt 3.3.8). Als Negativkontrolle dienten LGR5-transfizierte MKN45- und MKN74-Zellen, die mit Antibody Diluent (Zytomed Systems GmbH) anstelle des Primärantikörpers inkubiert wurden. Die Spezifität des Anti-LGR5-Antikörpers wurde mithilfe der Peptidkontrolle (Prä-Inkubation des Antikörpers mit seinem immunisierenden Peptid) ebenfalls an LGR5-transfizierten MKN45-Zellen bestätigt.

3.3.8 Immunhistochemie

3.3.8.1 Histologie

Zur histologischen Begutachtung wurden Gewebeproben in 4 % neutralisiertem Formalin fixiert, in einem Gewebereinbettautomaten (Leica) entwässert und in Paraffin eingebettet. Entparaffinierte Gewebeschnitte wurden mit Hematoxylin und Eosin (HE) angefärbt und von einem erfahrenen Pathologen entsprechend den WHO-Richtlinien klassifiziert [22]. Der pTNM Status wurde gemäß der *UICC:TNM-Klassifikation maligner Tumoren* bestimmt [21].

3.3.8.2 Herstellung von Tissue Microarrays

Die Tissue Microarray Technik ermöglicht die Beurteilung und Analyse umfangreicher Patientenkollektive unter geringem Material- und Zeitaufwand.

Wie an anderer Stelle ausführlich beschrieben, wurden Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben zur Anfertigung eines Tissue Microarrays verwendet [132,144,145]. Aus einem Spenderblock wurden mit einem speziell angefertigten Gerät (Beecher Instruments) jeweils drei Zylinder je Tumorfall mit einem Durchmesser von 0,6 mm aus einem zuvor markierten Tumorareal gestanzt. Diese Gewebezylinder wurden in die vorgesehenen Löcher eines Empfängerblocks (leerer Paraffinblock mit gestanzten Löchern) eingebracht. Zum Abschluss wurde der Empfängerblock in einem Wärmeschrank für 5 min auf 54 °C erwärmt, um die einzelnen Stenzen mit dem umliegenden Paraffin zu verschmelzen. Von dem resultierenden Tumorgewebeblock wurden 2 µm dicke Schnitte für weitere Analysen angefertigt.

3.3.8.3 Immunhistochemische Färbung

Zur Untersuchung der Proteinexpression in humanem Gewebe wurden immunhistochemische Färbungen an Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe durchgeführt. 2 µm dicke Gewebeschnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, für 20 min mit Hydrogen Peroxid Block behandelt und 5 min mit Ultra V Block inkubiert, um unspezifische Hintergrundsignale zu reduzieren. Die Immunfärbungen wurden mit dem Anti-LGR5-11b-Antikörper (Verdünnung 1:1000), dem Anti-CXCR4-Antikörper (1:100, Stefan Schulz [131]), den monoklonalen Antikörpern gegen CXCL12 (1:100, R&D Systems), CD34 (1:700, Beckman Coulter GmbH), CD44 (1:200, Novocastra Laboratories Ltd), Ki67 (1:300, Thermo Scientific), Synaptophysin (1:50, Thermo Scientific) und den polyklonalen Antikörpern, die gegen ADAM17 (1:50, Sigma-Aldrich), FZD7 (1:800, Aviva Systems Biology Corp.) and Musashi-1 (1:500, Chemicon International Inc.) gerichtet sind, jeweils für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Immunreaktion wurde mit dem Immun-Peroxidase-Polymer des n-Histofine Simple Stain MAX Po Kits (Nichirei Bioscience) und dem Peroxidase Substrat DAB (Diaminobenzidin, Vector Laboratories) sichtbar gemacht. Zwischen allen Schritten wurden die Objektträger dreimal mit TBS-Tween (*Tris-buffered saline*) gewaschen.

Für die Doppelfärbung von LGR5 mit anderen Antikörpern wurden freie Bindungsstellen nach der DAB-Behandlung für 20 min mit einer Maus-IgG und einer Kaninchen-IgG Kontrolle (Abcam) blockiert. Die Schnitte wurden nun

wiederum für 30 min mit dem zweiten Primärantikörper inkubiert und mithilfe des UltraVision alkalische Phosphatase Polymers von Thermo Scientific zusammen mit dem Fast Red Chromogen (Sigma-Aldrich) sichtbar gemacht. Zum Schluss wurden die Schnitte zur Gegenfärbung der Zellkerne für 1 min in Hämalaunlösung (Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co KG) getränkt. In der Negativkontrolle ersetzte Antibody Diluent den Primärantikörper.

3.3.8.4 Beurteilung der Immunfärbung

Die Immunfärbung von nicht-neoplastischen Epithelzellen und Tumorzellen wurde unter Anwendung einer Bewertungsskala, dem Immunreaktivitätsscore (IRS), quantifiziert. Kategorie A bewertete die Farbintensität als 0 (keine Immunfärbung), 1 (schwach), 2 (mäßig) und 3 (starke Immunfärbung). Kategorie B dokumentierte den Anteil positiver Zellen als 0 (negativ), 1 (vereinzelt positive Zellen $\leq 1\%$), 2 ($>1\%$ bis 10% positive Zellen), 3 (10% bis 50%), 4 (50% bis 80%) und 5 ($>80\%$). Die Addition von Kategorie A und B resultierte in einem IRS von 0 bis 8 für jeden individuellen Fall.

Die Lokalisation von LGR5-positiven Zellen in 100 Großflächenschnitten des intestinalen Magenkarzinoms wurde wie folgt beurteilt. Separat für die Oberfläche der Schleimhaut, das Tumorzentrum und die Invasionsfront wurde die Anzahl immunreaktiver Zellen als 0 (negativ), 1 (< 10 positive Zellen), 2 (10 - 50 positive Zellen) und 3 (>50 positive Zellen) kategorisiert.

3.4 Klonierung eines Expressionkonstrukts für LGR5

3.4.1 Expressionsvektor pcDNA3.1(-)

Für die Klonierungsexperimente wurde der pcDNA3.1(-) Vektor von Invitrogen verwendet (siehe Abbildung 3.2). Er besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion transformierter Bakterienzellen und ein Neomycin-Resistenzgen, das die Selektion stabil transfizierter Zellen mit Geneticin (G418) ermöglicht. Des Weiteren ist er mit einem Zytomegalievirus-Promoter (CMV) sowie einer Polyadenylierungssequenz ausgestattet.

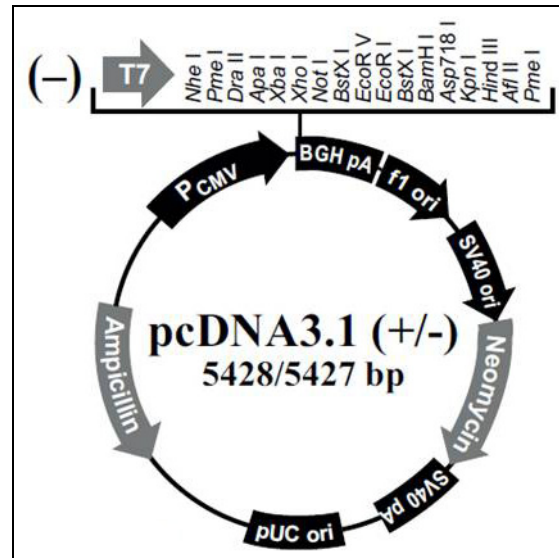


Abbildung 3.2 Vektorkarte von pcDNA3.1(-).

Der pcDNA3.1(-) Vektor ist ein eukaryotischer Expressionsvektor unter der Kontrolle eines CMV Promotors. Er besitzt sowohl ein Ampicillin-, als auch ein Neomycin-Resistenzgen zur Selektion. Dargestellt sind auch mögliche Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.

Quelle: Invitrogen

3.4.2 Transformation von *E. coli*

3.4.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Je nach Verwendungszweck wurden kompetente 5-alpha *E. coli* (New England Biolabs) auf Agarplatten bei 37 °C im Brutschrank oder in Luria Bertani (LB) Flüssigmedium bei 37 °C auf dem Schüttler mit 225 rpm angezüchtet. Eine Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch das Antibiotikum Ampicillin in den Nährmedien. Um eine Flüssigkultur herzustellen, wurde eine Einzelkolonie zuvor transformierter *E. coli* mit einer sterilen Spitze gepickt, um damit das Flüssigmedium anzupfen.

3.4.2.2 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden 100 µl kompetenter *E. coli* vorsichtig aufgetaut und für 30 min mit 100 ng Plasmid-DNA auf Eis inkubiert. Um die Aufnahme des Plasmids in das Zellinnere zu erreichen, wurden die Bakterien 90 s lang einem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad ausgesetzt und wieder auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der Ansatz mit 800 µl SOC-Medium (New England Biolabs) gemischt und die Kultur für 45 min bei 37 °C und 225 rpm im Bakterenschüttler wachsen gelassen. Zur Selektion wurden nun zwischen

25-100 µl der transformierten Bakterienkultur, die im eingebrachten Plasmid ein Resistenzgen für Ampicillin besaßen, auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Mit einer angewachsenen Einzelkolonie konnte nun wiederum Flüssigmedium (mit Ampicillin) angeimpft werden, um eine weitere Vervielfältigung der Plasmid-DNA zu erreichen. Die Plasmide aus der gewachsenen Flüssigkultur wurden anschließend über eine Mini- oder Midipräparation isoliert und mittels Restriktionsverdau auf den Erfolg der Transformation hin überprüft.

3.4.3 Plasmidpräparation

Je nach Volumen der transformierten Bakterienkultur wurde eine Plasmidpräparation mit dem QIAGEN Plasmid Mini oder Midi Kit durchgeführt. Das Protokoll basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für eine Minipräparation wurden 3 ml einer Flüssigkultur bei 6000 x g für 15 min pelletiert und in 300 µl RNase-haltigem Puffer P1 resuspendiert. Die Bakterien wurden nun mittels Puffer P2 (NaOH, 1 % SDS) lysiert. Die alkalischen Bedingungen führten zur Denaturierung von Proteinen sowie genomischer und Plasmid-DNA. Nach der Zugabe des Puffers P3 wurde das Lysat für 5 min auf Eis neutralisiert. Durch die Erhöhung der Salzkonzentration wurden genomische DNA, Proteine, Zelltrümmer und SDS präzipitiert, während die Plasmid-DNA renaturiert in Lösung blieb. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation abgetrennt und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Säule von QIAGEN gebunden. Durch zwei Waschschriffe wurden Endonucleasen und Salze entfernt, die Plasmid-DNA dann in 800 µl QF Puffer von der Säule eluiert und mit 560 µl Isopropanol präzipitiert. Im Anschluss an einen Zentrifugations- und einen Waschschriff mit 70 %igem Ethanol wurde das Plasmid-Präzipitat in 50 µl Nuclease-freiem Wasser (Ambion) resuspendiert.

3.4.4 Restriktionsverdau und Gelkontrolle

Der Restriktionsverdau isolierter DNA mit FastDigest Enzymen (Fermentas) diente der Linearisierung und Überprüfung von Plasmiden sowie zum Ausschneiden gewünschter DNA-Fragmente. Mithilfe der Serial Cloner Software 2.1 (Serial Basics) wurden vor dem Restriktionsverdau geeignete Enzyme zum

Schneiden der Plasmid- und Insertsequenzen ausgewählt. Nach der Auftrennung in einem 1 %igen Agarosegel, konnten die gewünschten DNA-Fragmente im Abgleich mit einem Größenstandard und über die bekannten Restriktionsschnittstellen identifiziert werden. Relevante DNA-Fragmente wurden im Anschluss mit dem NucleoSpin Extract II Kit von Macherey-Nagel, wie im Abschnitt 3.2.8 beschrieben, aus dem Gel aufgereinigt und in weiterführenden Klonierungsschritten eingesetzt.

Ein Restriktionsansatz bestand aus 1 µg DNA in 15 µl Wasser, 2 µl 10x FastDigest Puffer und 1 µl FastDigest Enzym. Die DNA wurde für 30 min bei 37 °C verdaut.

3.4.5 Dephosphorylierung

Um eine Religation des linearisierten pcDNA3.1(-) Plasmids vor der Ligation mit dem *Insert* zu verhindern, wurden die 5'-Phosphat-Enden mittels alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (Roche, 1U/µl) dephosphoryliert. Zu diesem Zweck wurde eine Einheit alkalischer Phosphatase für 1 pmol freier 5'-Enden in entsprechendem Puffer verdünnt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend bei 75 °C inaktiviert.

3.4.6 Vorbereitung des Inserts

Aus der RNA eines Tumor-Patienten wurde mit dem High Fidelity PCR System von Roche die gesamte kodierende Sequenz von LGR5 (NM_003667.2) mit einer Länge von 2880 bp entsprechend den Herstellerangaben amplifiziert. Die gewählten Klonierungsprimer für LGR5 (siehe Tabelle 3.5) ermöglichten das Anfügen von kurzen Sequenzabschnitten an das 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments. So konnte mit dem Vorwärtsprimer gezielt eine zusätzliche NheI und mit dem Rückwärtsprimer eine BamHI Restriktionsschnittstelle eingefügt werden, um das Subklonen des amplifizierten Fragments in den Expressionsvektor zu erleichtern. Das Einfügen einer c-Myc Tag-Erkennungssequenz ermöglichte später eine Überprüfung der erfolgreichen Transfektion des Expressionskonstrukts.

Abschließend wurde das PCR-Produkt in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und die spezifische Bande, wie in Abschnitt 3.2.8 beschrieben, isoliert

und aufgereinigt. Um sicherzustellen, dass das resultierende PCR-Produkt gegenüber der Referenzsequenz keine Basenaustausche enthielt, wurde das Amplifikat sequenziert (siehe Abschnitt 3.2.9, Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5 Primer Details für die Sequenzierung und Klonierung von cDNA.

	Vorwärts (5'→ 3')	Rückwärts (5'→ 3')	Länge (bp)
Biomers.net		Sequenzierungsprimer	
LGR5	AAT TTG CGA AGC CTT CAA TC	GGG ATT TCT GTT AAC GCA TTG	128
BGH		TAG AAG GCA CAG TCG AGG	
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG		
LGR5-Seq1	AAA CTG TTA ATT GGG GTC AT	GAA AGC CAC AGG GCA GTT TA	576
LGR5-Seq2	CTG GCA TTC CCT GAG GCA CCT	TTA AAT CAG GAA ATT CAG TT	493
Eurogentec		Klonierungsprimer	
LGR5cloning	CGC GCT AGC ATG GAC ACC TCC CGG CTC GG	CGC GGA TCC CTA CAG ATC TTC TTC AGA AAT AAG TTT TTG TTC GAG ACA TGG GAC AAA TGC CA	2.724

3.4.7 Ligation

Zur Vorbereitung der Ligation wurden das PCR-Fragment (*Insert*) und der pcDNA3.1(-) Vektor einzeln mit NheI und BamHI verdaut. Anschließend wurde das LGR5-*Insert* im Verhältnis 3:1 mit 50 ng Plasmid-DNA und einer Einheit T4-Ligase (Roche) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das fertige LGR5-Expressionskonstrukt wurde nun zum Zwecke der Vervielfältigung in *E. coli* transformiert und mit einer Midipräparation isoliert. Der erfolgreiche Einbau des *Inserts* in das Plasmid wurde nach Restriktionsverdau in einem Agarosegel und durch Sequenzierung überprüft.

3.5 Zellkultur

Die Identität aller verwendeten Zelllinien wurde zuvor mittels Fragmentanalyse gesichert (Abschnitt 3.2.12).

3.5.1 Standardbedingungen bei der Arbeit mit Zellkulturen

3.5.1.1 Kultivierung der Zelllinie MKN74

Zellen der humanen Magenkarzinomzelllinie MKN74 wurden aus der japanischen *Health Science Research Resource Bank* (Osaka, Japan) bezogen. Diese Zelllinie wurde im Kulturmedium, bestehend aus 10 ml RPMI-1640-Medium, angereichert mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FBS, *fetal bovine serum*) und 1 % Penicillin/Streptomycin (alles PAA) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Zur Passage der Zellen wurden alle verwendeten Linien zunächst mit PBS gewaschen, dann mit 1 ml Trypsin-EDTA für 3 min im Brutschrank angedaut und in 5 ml vollständigem Kulturmedium mit einem Zellschaber vom Boden abgekratzt. Um das Trypsin zu entfernen wurden die Zellen bei 400 x g für 5 min sedimentiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet in frischem Medium 1:5 verdünnt und in neue T75-Zellkulturflaschen verteilt. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte jeden zweiten Tag. Wachstum und Verhalten aller Zelllinien wurde kontinuierlich am Lichtmikroskop (Leica) überwacht und dokumentiert.

3.5.1.2 Kultivierung der Zelllinie MKN45

Die humane Magenkarzinomzelllinie MKN45 stammte aus der *Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ, Braunschweig). Die Zellen wurden in Kulturmedium, bestehend aus 10 ml RPMI 1640, angereichert mit 20 % hitzeinaktiviertem FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin, gehalten. Sie wuchsen zum Teil als Zellcluster in Suspension, aber auch als Monolayer.

Zur Passage der Zellen wurden die Suspensionszellen samt Medium in einem 50 ml Falcon Röhrchen aufgefangen, während die als Monolayer wachsenden Zellen mit PBS gespült und ebenso wie MKN74 mit Trypsin-EDTA

passagiert wurden. Um die in Suspension wachsenden Zellen bei einem Mediumwechsel nicht zu verlieren, wurden diese mit dem alten Medium bei 400 x g 5 min abzentrifugiert und mit frischem Kulturmedium wieder in die Zellkulturflasche pipettiert.

3.5.1.3 Kultivierung der Zelllinie HEK293 EBNA

Die humanen embryonalen Nierenzellen HEK293 EBNA (*Human Embryonic Kidney*) wurden von Invitrogen bezogen und in DMEM mit hohem Glukoseanteil, 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA) gehalten. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:10 passagiert.

3.5.1.4 Hitzeinaktivierung von fetalem Kälberserum

Für die Kultivierung der Zelllinien MKN74 und MKN45 wurde der Zusatz von hitzeinaktiviertem FBS empfohlen. Um störende Einflüsse im Serum, wie Laktatdehydrogenase, Viren oder Mykoplasmen zu beseitigen, wurde das FBS in 50 ml Falcon Röhrchen für 30 min bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert.

3.5.1.5 Gefrierkonservierung und Auftauen von Zellen

Um stets ausreichend stabil transfizierte sowie untransfizierte Kulturen zur Verfügung zu haben, wurden Zellen früher Passagen nach dem Passagieren kryokonserviert. Die Zellsuspension von 1×10^6 Zellen wurde auf Eis mit 1 ml Einfriermedium gemischt und in speziellen Kryoröhrchen (Nalgene) für eine Stunde bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C tiefgefroren. Die langfristige Kryokonservierung erfolgte dann in flüssigem Stickstoff (-196 °C). Als Einfriermedium diente das herkömmliche Kulturmedium mit Zusatz von 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Schutzsubstanz DMSO verhindert beim Gefrieren die Bildung von Eiskristallen, die die Zellen zerstören könnten.

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie aus dem flüssigen Stickstoff für ca. 2 min im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und mit 6 ml angewärmtem Kulturmedium gemischt. Das Einfriermedium wurde durch Zentrifugation bei 400 x g abgetrennt und das Zellpellet in 6 ml frischem Kulturmedium oder Selektionsmedium (mit Geneticin) resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde anschließend in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank angezogen.

3.5.1.6 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit der automatischen Trypan-Blaumethode am ViCell Zellzähler (Beckman Coulter GmbH). In jedem Messdurchgang wurde 1 ml einer Zellsuspension angesaugt und vollautomatisch gefärbt, ausgezählt und mittels digitaler Bildtechnologie fotografiert. Die dazugehörige Software wertete anschließend Anzahl, Konzentration, Größenverteilung und Vitalität der Zellen aus.

3.5.2 Transfektion

3.5.2.1 Transiente Transfektion

Bei der transienten Transfektion wurde Plasmid-DNA mittels Lipofektion zeitweilig in eine Zelle eingebracht. Unter Verwendung des Lipofectamin LTX Reagenz von Invitrogen konnte Fremd-DNA mithilfe von Lipidvesikeln, die mit der Zellmembran der Wirtszelle fusionieren, in die Zelle transfiziert werden.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen in eine 6-well Kulturschale ausgesät und für 6 h im Brutschrank inkubiert. Der Transfektionsansatz, bestehend aus 500 µl serumfreiem Medium, 5 µl Lipofectamine LTX Reagenz und 0,5 bis 1 µg Plasmid-DNA, wurde für 30 min bei Raumtemperatur belassen, um eine Komplexbildung zu ermöglichen. Im Anschluss an einen Mediumwechsel konnte das DNA-Liposomen-Gemisch auf die Zellen pipettiert werden. Etwa 16 h nach der Transfektion wurde das Medium erneut gewechselt und die Zellen bis zur Ernte (24-48 h) im vollständigen Kulturmedium kultiviert. Transient transfizierte Zellen wurden für Immunfluoreszenzfärbungen genutzt, die Isolation von RNA (Abschnitt 3.2.1), DNA (Abschnitt 3.2.11) oder Protein (Abschnitt 3.3.1) erfolgte wie zuvor beschrieben.

3.5.2.2 Stabile Transfektion

Ziel der stabilen Transfektion ist die dauerhafte Integration von DNA in das Zell-Genom, da die Fremd-DNA nur so den Abbauprozessen der Zelle entgehen kann. Zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurde Plasmid-DNA durch

Lipofektion in die Zellen eingebracht und durch Zugabe des Antibiotikums Geneticin (G418) zum Kulturmedium ein Selektionsdruck aufgebaut. Der verwendete pcDNA3.1(-) Vektor enthält ein Neomycin-Resistenzgen, daher konnten im geneticinhaltigen Selektionsmedium nur jene Zellen überleben, die den Vektor stabil in ihr Genom integriert hatten. Etwa 48 h nach der Lipofektion wurde der Selektionsdruck durch schrittweise Steigerung der Geneticin-Konzentration im Medium aufgebaut, bis nur noch die stabil transfizierten Zellen überleben konnten. Für MKN45 wurde eine ideale Geneticin-Konzentration von 650 µg/ml, für MKN74 eine Konzentration von 450 µg/ml Geneticin im Medium empirisch ermittelt. Einzelklone der erfolgreich transfizierten Zellen wurden unter anhaltendem Selektionsdruck weiter kultiviert und mittels Real-time RT-PCR (Abschnitt 3.2.10) und Western Blot (Abschnitt 3.3.4) auf die Expression des Zielgens überprüft. Für stabile und transiente Transfektionen wurde das Expressionskonstrukt aus LGR5, kloniert in pcDNA3.1(-), verwendet. Untransfizierte Zellen sowie Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA3.1(-) ohne *Insert* transfiziert wurden, dienten als Negativkontrolle.

3.5.3 Zellbasierte Assays

3.5.3.1 MTT-Proliferationsassay

Der MTT-Test kann als Zytotoxizitäts- bzw. Proliferationsassay verwendet werden, indem der Anteil vitaler und proliferierender Zellen in einer Population gemessen wird [146]. Der Nachweis beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumbromid MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen sowie NADH und NADPH zu dem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan. Dieser Prozess ist unabhängig davon, ob die Zellen gerade DNA synthetisieren oder nicht.

Für diesen Versuch wurden 5000 Zellen/well in eine 96-well Zellkulturschale mit 200 µl vollständigem Kultur- bzw. Selektionsmedium ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Proliferationsmessung erfolgte über vier Tage, sodass jeweils vier identisch bestückte 96-well Platten parallel kultiviert wurden. An jedem Messtag wurden 20 µl MTT-Lösung (5 mg MTT in 1 ml PBS) pro well pipettiert und der Ansatz für 4 h im Zellkulturschrank inkubiert. Anschließend wurde die Platte für 10 min bei 1500 rpm abzentrifugiert, das

Medium verworfen und die Zellen durch Zugabe von 100 μ l DMSO aufgeschlossen. Durch die 15-minütige Zellyse wurde der blau-violette Formazan-Niederschlag in Lösung gebracht und die Optische Dichte (OD) anschließend bei 570 nm Messwellenlänge gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm am SpectraMax Microplate Reader gemessen. Die Extinktion der Farblösung korreliert dabei mit der Anzahl vitaler Zellen und lässt Rückschlüsse auf deren Wachstumsverhalten unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu.

Die OD der *Blank*-wells (Medium ohne Zellen) wurde von allen anderen Messwerten abgezogen. Zur Sicherung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden jeweils zehn technische Replikate gemessen und jeder Versuch mindestens dreimal wiederholt.

3.5.3.2 MTT-Zytotoxizitätstest

Um im Apoptose-Assay einen möglichen Effekt der LGR5-Überexpression untersuchen zu können, wurde zuvor mit dem MTT-Zytotoxizitätstest die Konzentration von Mitomycin C (MMC) bestimmt, bei der etwa 10-20 % der Zellen in Apoptose gehen. Für jede Zelllinie wurden sechs verschiedene MMC-Konzentrationen über einen Inkubationszeitraum von vier Tagen ausgetestet (siehe Abbildung 3.3). Aufgrund der Ergebnisse dieses Tests wurden die MKN45-Zellen mit 0,5 μ g/ml MMC für 24 h und MKN74 mit 1 μ g/ml MMC für 72 h behandelt um anschließend die Aktivität der Caspase-3 und -7 zu erfassen (siehe Abschnitt 3.5.3.5).

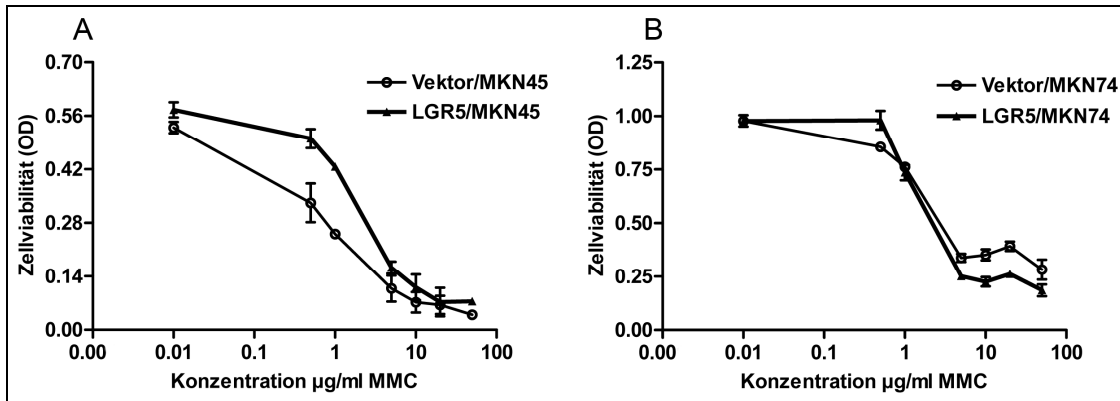


Abbildung 3.3 MTT-Zytotoxizitätstest.

Die Diagramme zeigen anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve die Zellviabilität von Magenkarzinomzelllinien nach der Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Mitomycin C (MMC). Links: stabil transfizierte MKN45-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit MMC (A). Rechts: stabil transfizierte MKN74-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit MMC (B). OD = Optische Dichte.

3.5.3.3 Matrigel Invasionsassay

Zur Untersuchung der Invasivität stabil transfizierter MKN45- und MKN74-Zellen wurde eine 24-well Platte mit Transwell-Einsätzen (Corning) verwendet. Etwa 24 h vor dem Versuch wurde die Serumkonzentration im Kulturmedium der Zellen auf 0,5 % reduziert. Am Versuchstag wurde die Membran der Transwell-Einsätze zur Nachahmung einer Basalmembran, mit 52 µl Matrigel Basalmembranmatrix (1:3 verdünnt mit serumfreiem Medium) beschichtet und für 30 min bei 37 °C polymerisiert. In das durch die Einsätze entstandene untere Kompartiment der Platte wurden nun 500 µl Kulturmedium (mit 20 % FBS) pipettiert und das obere Kompartiment mit 100.000 Zellen in 250 µl serumfreiem Medium befüllt. Die Zellen sollten nun dem Serumgradienten folgend durch die Basalmembran von einem in das andere Kompartiment invadieren. Nach einer Inkubation von 72 h wurde die Zellsuspension des oberen Kompartiments verworfen und das Medium des unteren Kompartiments in einer Messküvette des ViCell XR Zellzählers aufgefangen. Zellen, die die Membran passiert hatten und an der Unterseite des Transwell-Einsatzes hafteten, wurden mit 500 µl Trypsin abgelöst, in die Messküvette pipettiert und anschließend am ViCell XR Zellzähler ausgezählt. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

3.5.3.4 Wundheilungsassay

Zur Bestimmung der Migrationsfähigkeit wurde der Wundheilungsassay (*Scratch Assay*) in einer 6-well Zellkulturplatte durchgeführt. Einem konfluenten Zellrasen von stabil transfizierten MKN45- und MKN74-Zellen wurden mit einer sterilen gelben (200 µl) Pipettenspitze zwei Wunden beigefügt. Entlang jeder Furche wurden mehrere Messpunkte auf der Unterseite der Platte mit einem Stift markiert. Die abgelösten Zellen wurden mit PBS ausgewaschen und die entstandene zellfreie Furche am Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss) fotografisch (ProgRes C10 Plus, Jenoptik) festgehalten. Der Wundverschluss, also die Migration der Zellen von den Wundrändern in die Wunde, wurde über fünf Tage an den markierten Stellen dokumentiert und mit dem ImageJ Bildverarbeitungsprogramm (Rasband, W.S.) ausgewertet. Um den Effekt der Proliferation auf den Migrationsassay abzuschätzen, wurde der Versuch sowohl unter serumfreien Bedingungen, als auch unter Zusatz von Serum durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden acht Replikate vermessen und der Versuch dreimal wiederholt. Beide Versuchsansätze (mit bzw. ohne Serum) kamen zu dem gleichen Ergebnis.

3.5.3.5 Apoptose-Assay

Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen in der Zellkultur wurde der Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Dieser, auf Lumineszenz basierende Assay, misst die Aktivität der Caspase-3 und -7, die eine Schlüsselrolle bei der Apoptose von Säugerzellen einnehmen [147]. Um gezielt und kontrolliert Apoptose unter den Versuchsbedingungen zu induzieren, wurde das Antibiotikum Mitomycin C (MMC) verwendet, das zur Hemmung der DNA-Synthese und so zum Arrest des Zellzyklus führt [148]. Die optimale Konzentration und Wirkdauer von MMC für MKN45 und MKN74 wurde im Zytotoxizitätsassay (Abschnitt 3.5.3.2) zuvor empirisch ermittelt.

In einer 96-well Platte wurden 100.000 Zellen pro well ausgesät und 24 h in serumreduziertem Medium (1 % FBS) kultiviert. Zur Induktion der Apoptose wurden MKN45-Zellen für 24 h mit 0,5 µg/ml MMC und MKN74-Zellen für 72 h mit 1 µg/ml MMC inkubiert. Die Zugabe von 100 µl des Caspase-Glo 3/7 Reagenz (bestehend aus Caspase 3/7 Substrat und Puffer) führt zur Zelllyse, gefolgt von einer Spaltung des Substrats durch die Caspase-3 und -7.

Die Reaktion des Spaltprodukts Aminoluciferin mit dem Enzym Luciferase bewirkt letztendlich die Freisetzung eines Lumineszenzsignals. Das erzeugte Signal ist dabei proportional zur Caspase-3/7-Aktivität der Zellen und konnte nach 90 min am Tecan infinite M200 Luminometer gemessen werden. Die Hintergrundfluoreszenz des Mediums mit MMC wurde mit einem Leerwert ohne Zellen bestimmt. In der Negativkontrolle konnte außerdem die normale Caspase-Aktivität unbehandelter Zellen detektiert werden. Nach Abzug des Leerwerts der zellfreien Kontrolle wurde das gemessene Lumineszenzsignal der MMC-behandelten Proben mit den MMC-unbehandelten Kontrollen prozentual ins Verhältnis gesetzt. Jeder Versuchsansatz wurde mit zwei technischen und drei biologischen Replikaten durchgeführt.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel, PASW Statistics Version 18 (SPSS) oder GraphPad Prism Version 4 für Windows. Die Werte wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SA) ausgedrückt. Real-time RT-PCR Daten wurden zunächst logarithmiert, um annähernd normalverteilte Werte zu erhalten und anschließend mit dem doppelseitigen t-Test für gepaarte Stichproben ausgewertet. Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschieds zwischen Tumor- und Nicht-Tumorgewebeproben desselben Patienten wurde der Wilcoxon Test angewendet. Der exakte Test nach Fisher diente dazu, die Korrelation zwischen einer Proteinexpression und einzelnen klinisch-pathologischen Merkmalen zu berechnen. Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen der Expression zweier unterschiedlicher Proteine innerhalb einer Gruppe mit dem Kendalls Tau Rangkorrelationskoeffizienten ermittelt. Der Vergleich zwischen der LGR5-Expression und dem Patientenüberleben wurde mit dem Log-Rang-Test durchgeführt und in Überlebenskurven mittels Kaplan-Meier-Methode dargestellt.

Ein p-Wert $<0,05$ wurde als 'signifikant', ein Wert unter 0,01 als 'hoch signifikant' erachtet.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Suche nach neuen diagnostischen und prognostischen Biomarkern des Magenkarzinoms. Mithilfe molekularbiologischer Methoden sollten Oberflächenrezeptoren identifiziert werden, die im Magen zwischen Tumor- und Normalgewebe sowie zwischen Gewebe von Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen eine unterschiedliche Expression zeigen und einen Bezug zur Stammzellbiologie aufweisen.

Ausgangspunkt der Arbeit waren zwei verschiedene GeneChip Arrays, mit denen in Patientengewebe und einer Magenkarzinomzelllinie differentiell exprimierte GPCRs und GPCR-assoziierte Gene analysiert wurden. Rezeptoren, die eine *in silico* Plausibilitätsprüfung bestanden, wurden an einem größeren Patientenkollektiv auf transkriptioneller (Real-time RT-PCR) und translationaler Ebene (Immunhistochemie) ausführlich validiert. Mittels funktioneller Assays konnte abschließend die pathophysiologische Bedeutung des Kandidatengens *LGR5* in zwei unterschiedlichen Magenkarzinomzelllinien untersucht werden (siehe Abbildung 4.1).

Mithilfe dieser Erkenntnisse sollen neue Therapieziele zur Behandlung des Magenkarzinoms gefunden werden, die sich die zellbiologischen Prozesse der Tumorstammzellen zu Nutze machen und zur Rezidivprophylaxe und Dauertherapie eingesetzt werden können. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in vier Originalarbeiten und auf sieben Kongressen veröffentlicht (siehe Kapitel 10 Publikationen) [132,133,149,150].

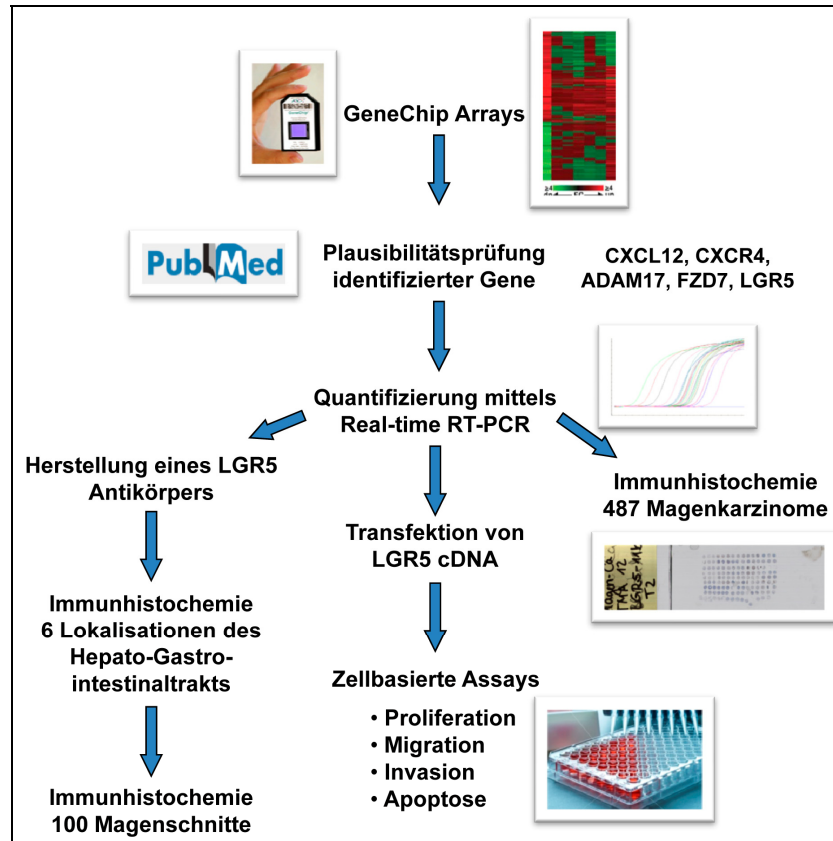


Abbildung 4.1 Arbeitsplan.

Quelle: www.affymetrix.com; www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed; www.istockphoto.de

4.1 Suche nach differentiell exprimierten GPCRs und Stammzellmarkern im Magenkarzinom

Der Nodalstatus ist einer der wichtigsten Prognosefaktoren des Magenkarzinoms [151]. In einem ersten Gene Array wurde für die Suche nach tumorbiologisch relevanten GPCRs das Genexpressionsprofil von drei Magenkarzinomen mit Lymphknotenmetastasen mit dem von drei Magenkarzinomen ohne Lymphknotenmetastasen verglichen. Die bioinformatische Auswertung der Array-Daten mit dem GCOS 1.4 Veränderungsalgorithmus und der GeneSpring 7.2 Software (Silicon Genetics) ergab 334 differentiell exprimierte Gene, die nodal-positive von nodal-negativen Magenkarzinomen unterschieden. Davon wurden 52 GPCRs und GPCR-bezogene Proteine identifiziert, die mit einem *fold change* Faktor von $> 1,5$ hoch- oder runterreguliert waren (siehe Abbildung 4.2) [132].

Die Rohdaten des GeneChip Arrays sind in der *Gene Expression Omnibus* Datenbank zu finden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=pzmjlcoscakugfc&acc=GSE17187>).

Ausschlaggebend für den Therapieerfolg von Karzinomen ist das Vorhandensein sogenannter Krebsstammzellen. Diese sind resistent gegenüber gängigen Chemotherapeutika und werden für die maligne Entartung, Metastasierung und Rezidivierung des Magenkarzinoms verantwortlich gemacht [130,152].

Ziel des zweiten Studienansatzes war daher die Identifizierung von Oberflächenmarkern, die eine Rolle in der Stammzell- oder Krebsstammzellbiologie spielen. Im Rahmen dieser Strategie wurden aus der Magenkarzinomzelllinie AGS die Zellen der *Side Population* (SP), die Stammzelleigenschaften besitzen, von solchen der *Non-Side Population* (Non-SP) mit einer Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) getrennt. Die mRNA von vier verschiedenen FACS-Sortierungen wurde gegenüber zwei unsortierten Proben auf einem weiteren GeneChip Array untersucht. Diese Vorversuche wurden von Frau Dr. Rosa Schmuck im Institut für Pathologie der Charité Berlin Mitte durchgeführt. Die bioinformatische Auswertung ergab 531 differenziell exprimierte Gene, die SP-Zellen von der Gesamtpopulation mit einem *fold change* Faktor $> 1,5$ unterschieden (siehe Abbildung 4.2) [133]. Die Rohdaten dieses GeneChip Arrays sind in der *Gene Expression Omnibus* Datenbank zu finden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=pzmjlcoscakugfc&acc=GSE20058>).

Die gewonnenen Datensätze wurden nun gezielt nach Genen durchsucht, die im Zusammenhang mit GPCRs, dem Notch- oder Wnt-Signalweg stehen und eine wichtige Rolle in der Stammzellbiologie spielen. In dieser Studie wurden 10 Gene identifiziert, die für GPCRs und/oder Komponenten der oben genannten Signalwege kodieren.

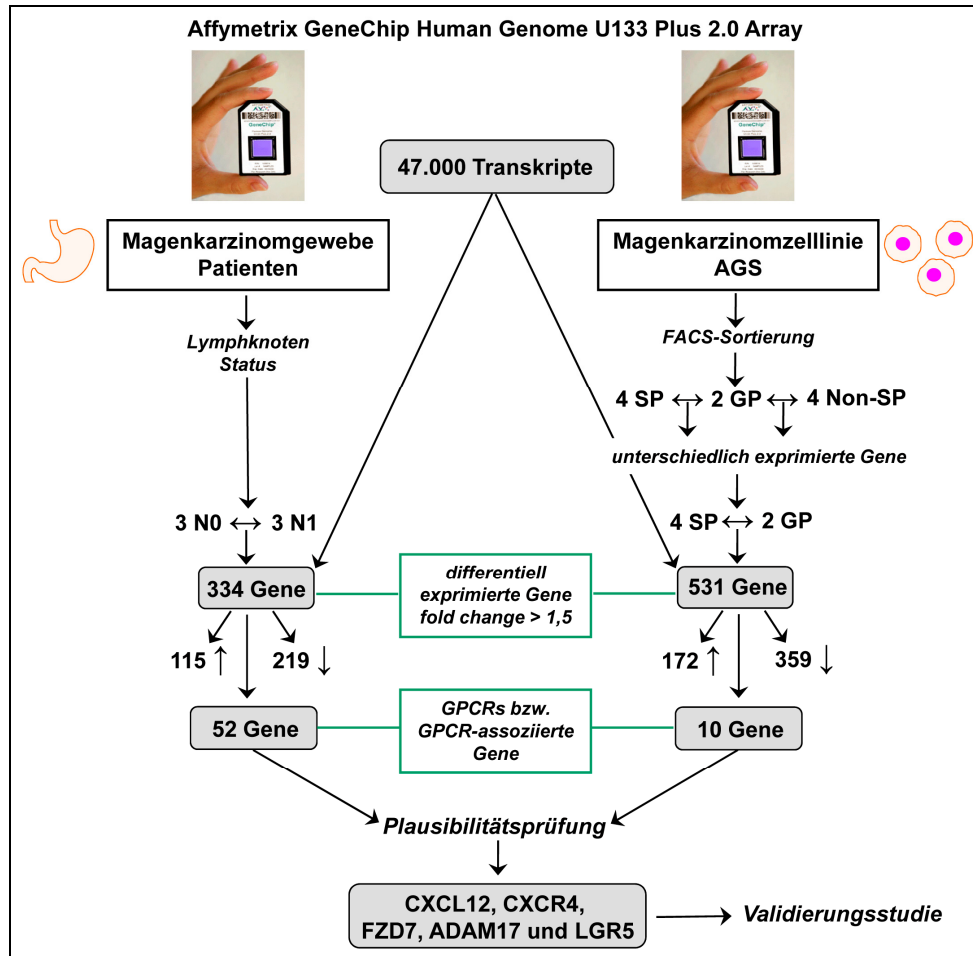


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der GeneChip Array Auswertung.

Darstellung der schrittweisen Analyse mittels Affymetrix GeneChip Arrays gewonnener Expressionsdaten von sechs Magenkarzinompatienten und einer Magenkarzinomzelllinie. SP = Side Population, GP = Gesamtpopulation, N0 = Patienten ohne Lymphknotenmetastasen, N1 = Patienten mit Lymphknotenmetastasen.

Quelle: www.affymetrix.com; www.motifolio.com

Überprüfung der Plausibilität identifizierter Kandidatengene *in silico*

Die insgesamt 62 in den beiden Gene Arrays identifizierten, differenziell exprimierten Gene wurden nun eingehend auf ihre Relevanz gemäß der Zielstellung hin geprüft. Aufgrund einer gründlichen Literaturrecherche wurden LGR5, CXCL12 und CXCR4 aus dem ersten Gene Array und ADAM17 und FZD7 aus dem zweiten Gene Array ausgewählt.

CXCL12, auch bekannt als SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*) ist ein kleines pro-inflammatorisches chemoattraktantes Zytokin, das eine vielfältige Rolle in der Vaskularisierung, Hämatopoese, neuronalen Entwicklung, Immunität sowie Organ- und Wundheilung spielt [153-155]. Seine Effekte vermittelt es

durch die Bindung von zwei Chemokinrezeptoren, **CXCR4** und CXCR7. Während die Funktion von CXCR7 als noch weitestgehend unklar gilt, ist die Wirkungsweise des GPCRs CXCR4 zusammen mit seinem Liganden CXCL12 vielfach beschrieben [156-158]. CXCR4 ist in vielen Zellen des blutbildenden Systems verbreitet und wird insbesondere von Stamm- und Tumorzellen exprimiert [159-165].

CXCL12 induziert die Mobilisierung und zielgerichtete Wanderung von CXCR4-exprimierenden Stamm- und Tumorzellen. Die Aktivierung der CXCL12/CXCR4-Achse hat daher eine entscheidende Bedeutung für die Tumorprogression, Invasion und Metastasierung. Des Weiteren ist CXCL12 über die Förderung der Angiogenese auch am Tumorwachstum beteiligt [157,166-170]. Studien belegen, dass der CXCL12-Signalweg einen Schlüsselfaktor in der Metastasierung von Prostata-, Kolorektal- und Brustkrebs darstellt [171-173]. Weitere Untersuchungen brachten ans Licht, dass die Aktivierung der CXCL12/CXCR4-Achse außerdem ein Mechanismus der Tumorresistenz gegenüber konventionellen zytotoxischen Therapieansätzen und biologischen Wirkstoffen ist [174].

Aufgrund ihrer vielseitigen pathologischen Bedeutung sind CXCL12 und sein Rezeptor CXCR4 ein attraktives Ziel für die Entwicklung neuer Arzneimittel. Aktuell werden einige CXCR4 Antagonisten untersucht, die möglicherweise einen inhibierenden Effekt auf das Tumorwachstum haben könnten [175,176].

ADAM17 (*a disintegrin and metalloproteinase 17*, Abbildung 4.3) ist auch bekannt als Tumornekrosefaktor-Alpha-konvertierendes Enzym (TACE). ADAM17 ist eine Transmembranprotease, zuständig für die proteolytische Spaltung (sog. *Shedding*) von Oberflächenproteinen wie Zytokinen (z. B. TNF α), Zytokinrezeptoren (z. B. IL-6R und TNF-R), Liganden des EGF-Rezeptors (z. B. TGF α und Amphiregulin) und Adhäsionsproteinen (z. B. L-Selektin und ICAM-1). Der Prozess des *Sheddings* reguliert die biologische Aktivität einer Vielzahl von Proteinen. Insgesamt wurden bisher bereits 76 Proteine identifiziert, die Substrate für ADAM17 darstellen [177,178]. Es wird angenommen, dass ADAM17 als eine Art molekularer Schalter Immunantworten, Geweberegeneration und die Krebsentstehung kontrolliert [178]. Das ADAM17-vermittelte *Shedding* von MHC I Proteinen stellt beispielsweise eine Strategie von Krebszellen dar, der

Überwachung durch das Immunsystem unbemerkt zu entkommen [179]. Von zentraler Bedeutung für das Wachstum vieler Tumoren ist die Transaktivierung des EGFR-Signalwegs, die durch eine ADAM17-vermittelte Spaltung der EGFR-Liganden (TGF α , Amphiregulin und HB-EGF) oder von Notch 1 realisiert wird [180-183]. Untersuchungen zeigen, dass die Aktivierung von ADAM17 und die anschließende EGFR-Transaktivierung auch zu einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führen kann [184]. Verschiedene Studien belegen, dass ADAM17 Entzündungs-assoziierte Krebsleiden fördert [185,186] und in Tumorzellen des Mamma-, Ovarial-, Prostata-, Kolon- und Pankreaskarzinoms gegenüber den normalen Zellen häufig verstärkt exprimiert wird [178,180,181,187-192]. Daher stellt auch ADAM17 eine vielversprechende Zielstruktur für die Behandlung verschiedener Krebsleiden dar.

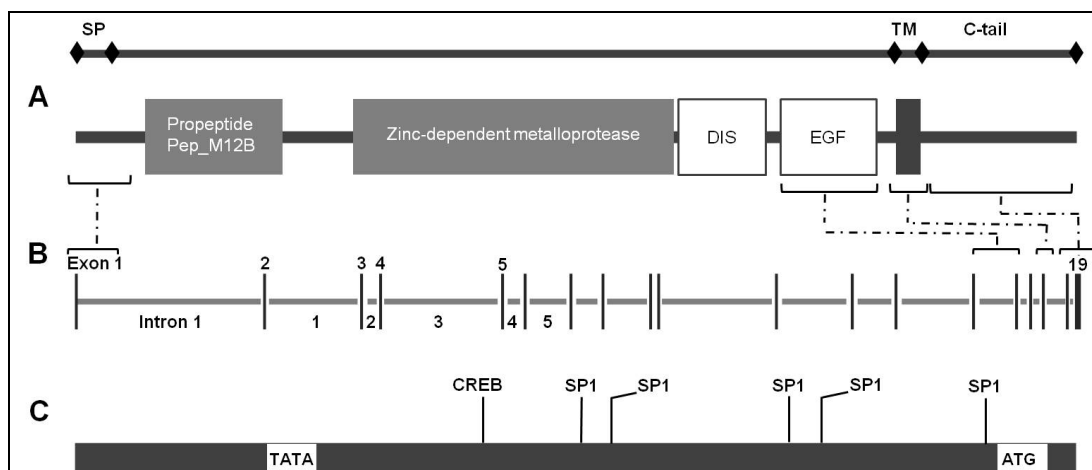


Abbildung 4.3 Schematische Darstellung von ADAM17.

Darstellung von ADAM17 als (A) Protein, (B) Gen und dessen Promotorregion (C) mit potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Das *ADAM17* Gen besteht aus 19 Exons. Exon 1 kodiert für das Signalpeptid für die Sekretion (SP). Exon 14 und 15 kodieren für die EGF-like Domäne, Exon 17 kodiert für die Transmembranregion (TM) und Exon 18 und 19 für das C-terminale Ende. Die Promotorregion von *ADAM17* (C) zeigt potentielle Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren CREB und SP1.

Frizzled-7 (FZD7) ist ein Sieben-Transmembrandomänen-Protein und Mitglied der Frizzled (FZD) Genfamilie, die von der *International Union of Pharmacology* (IUPHAR) als neue und gesonderte Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren geführt wird [193]. Diese Rezeptoren binden mit ihrer N-terminalen, Cysteinreichen Domäne im Beisein des Korezeptors LRP an Wnt-Signalproteine, um so den kanonischen und/oder nicht-kanonischen Wnt-Signalweg zu aktivieren. FZD7 selbst spielt eine wichtige Rolle in der Stammzellbiologie, bei der Krebsentstehung und -progression [194].

Aktuelle Studien zeigen, dass die gesteigerte FZD7-Expression im Kolorektalkarzinom, hepatozellulären Karzinom und hormonresistenten Brustkrebs (*triple negative breast cancer*, TNBC) die Tumorentstehung und -metastasierung über die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs begünstigt [194]. Doch auch in anderen Krebserkrankungen scheint FZD7 eine Rolle zu spielen: im Wilms-Tumor, Ösophagus- und Magenkarzinom sowie in der Lymphoblastischen Leukämie konnte eine gesteigerte FZD7 mRNA-Expression nachgewiesen werden [195-198]. FZD7 wird als neues Oberflächenantigen embryonaler Stammzellen beschrieben und stellt einen möglichen Tumor-Biomarker für die Vorläuferpopulation im Wilms-Tumor dar [199-201].

In Versuchen mit einem siRNA und shRNA Knockdown von FZD7, einem Anti-FZD7-Antikörper oder löslichen rekombinanten Peptidfragmenten konnte bereits eine antitumorale Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* erreicht werden, möglicherweise aufgrund der Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs [202-205]. Die Überaktivierung des Wnt-Signalwegs und die verstärkte Expression von FZD7 in zahlreichen Krebserkrankungen sowie die Bedeutung von FZD7 in der Krebsstammzellbiologie legen nahe, dass FZD7 ein vielversprechendes Ziel für die Krebstherapie darstellt [194].

Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor **LGR5** (*Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5*) gehört zur Familie der Glykoprotein-Hormon-Rezeptoren und ist ein Zielgen des Wnt-Signalwegs (Abbildung 4.4) [206]. LGR5 wurde von Barker *et al.* als Marker adulter Stammzellen der intestinalen Krypten, des Magens und der Haarfollikel von Mäusen identifiziert [143]. Auch im Barrett-Ösophagus zeigten LGR5-positive Zellen alle funktionellen Eigenschaften von Stammzellen [207].

Der Leucin-reiche Rezeptor galt lange als *orphan* GPCR, bis kürzlich nachgewiesen werden konnte, dass er über die Bindung von Mitgliedern der R-Spondin-Familie in der Lage ist, Wnt/ β -Catenin-Signalprozesse zu verstärken [208-210]. R-Spondine stellen eine Gruppe von vier Proteinen dar, die als wirksame Agonisten des Wnt-Signalwegs für pleiotrope Funktionen in Entwicklung, Stammzellüberleben und -differenzierung sowie Onkogenese bekannt sind [211,212].

LGR5 wird in zahlreichen Tumoren wie Leber-, Kolon-, Ovarial- und Basalzellkarzinomen überexprimiert, die Expression steigt dabei mit dem Fortschreiten der Krankheit an [66,206,213-215]. In den Studien von Barker *et al.* waren einzelne LGR5-positive Stammzellen in der Lage, organoide Strukturen *in vitro* zu bilden. Andere Untersuchungen im Mausmodell zeigten außerdem, dass es sich bei diesen Zellen um die Tumor-initiiierenden Krebsstammzellen von intestinalen Tumoren handelte [215,216]. Trotz intensiver Forschungen ist bislang noch sehr wenig über die genaue Funktion von LGR5 bekannt.

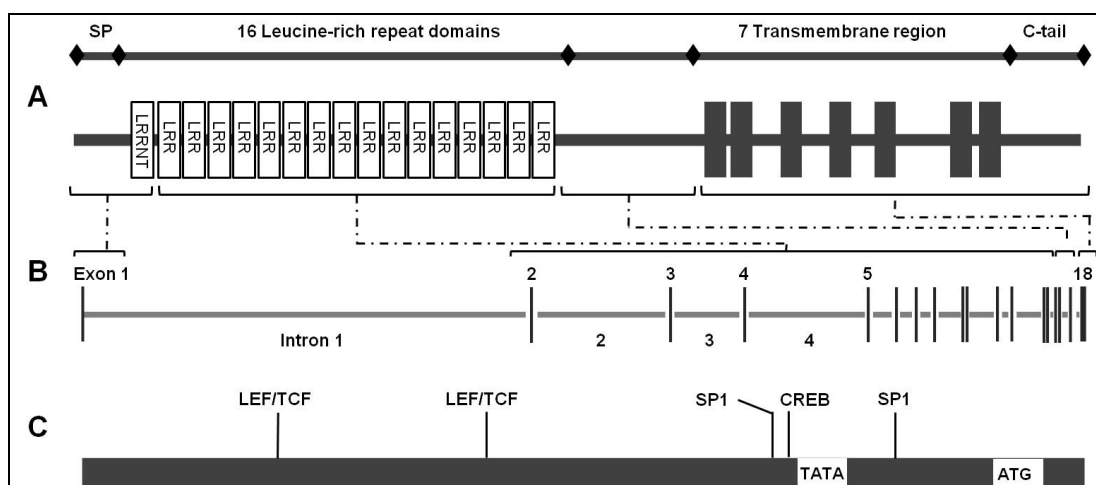


Abbildung 4.4 Schematische Darstellung von LGR5.

Darstellung von LGR5 als (A) Protein, (B) Gen und dessen Promotorregion (C) mit potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Das *LGR5* Gen besteht aus 18 Exons, Exon 1 kodiert für das Signalpeptid für die Sekretion (SP) und die N-terminale Leucin-reiche Domäne (LRRNT). Exons 2 bis 15 kodieren für die 16 Leucin-reichen Repeats, Exon 18 kodiert für die sieben Transmembranregionen (TM) und das C-terminale Ende. Die Promotorregion von *LGR5* (C) zeigt potentielle Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren LEF/TCF, SP1 und CREB.

4.2 Expressionsanalyse von CXCL12, CXCR4, ADAM17 und FZD7 im Magenkarzinom

Aufgrund der *in silico* Plausibilitätsprüfung wurden aus den im Gene Array identifizierten, differentiell exprimierten Genen fünf Kandidaten für eine weiterführende Validierung mittels quantitativer Real-time RT-PCR und Immunhistochemie ausgewählt. Für CXCL12 und seinen Rezeptor CXCR4 sowie für FZD7, ADAM17 und LGR5 kann in der NCBI-Datenbankrecherche eine Relevanz in der humanen Tumorigenese und in der Stammzell- bzw. Krebsstammzellbiologie nachgewiesen werden. Ihre Expression wurde daher an einem Validierungskollektiv von Magenkarzinompatienten untersucht.

In der quantitativen Real-time RT-PCR wurde zunächst jeweils die Expression der Kandidatengene im Tumorgewebe von Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen sowie im Tumor- und Nicht-Tumorgewebe eines Patienten miteinander verglichen und ausgewertet. Anschließend sollte untersucht werden, ob die Expression der Zielgene CXCL12, CXCR4, FZD7, ADAM17 und LGR5 auf translationaler Ebene im Magenkarzinom von klinisch-pathologischer Bedeutung ist. Für die immunhistochemischen Analysen wurden Tissue Microarrays (TMA) aus einem Kollektiv von 487 Magenkarzinompatienten hergestellt.

Zur statistischen Auswertung der Korrelation zwischen Proteinexpression im Tumorgewebe und den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika wurden die Ergebnisse der Immunfärbungen in zwei Kategorien unterteilt. Ein Immunreaktivitätsscore (IRS) unterhalb des Medians wurde als negativ ($IRS = 0$), oberhalb des Medians als positiv definiert ($IRS \geq 1$).

Für 469 Patienten standen Überlebensdaten zur Verfügung, 336 verstarben während der Nachbeobachtung (*follow-up*), 82 Patienten brachen die Nachsorge ab (z. B. aufgrund eines Wohnortwechsels) und 51 Patienten waren zum Ende der Studie noch am Leben. Die mittlere Nachbeobachtungszeit der überlebenden Patienten betrug 60,9 Monate (Spannweite 14,3-129,9 Monate). Das Patientenüberleben korrelierte hoch signifikant mit dem lokalen Tumorstadium (T-Kategorie), dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, der Lymphknotenbeteiligung (N-Kategorie), dem UICC-Stadium und dem Differenzierungsgrad des Tumors (Grading). Es korrelierte zudem signifikant mit dem Tumortyp nach Laurén (siehe Tabelle 4.7) [150].

4.2.1 CXCL12 und CXCR4 sind im Magenkarzinom differentiell exprimiert

4.2.1.1 Untersuchung der mRNA-Expression von CXCL12 und CXCR4

Die Analyse im GeneChip Array zeigt eine um 2,72-fach gesteigerte CXCL12-Expression in Magenkarzinomen mit Lymphknotenmetastasen (N1), verglichen mit solchen ohne nodale Ausbreitung (N0). Diese differentielle Expression kann mit einer Gruppe von Fällen aus dem Validierungskollektiv ebenfalls bestätigt werden. Hier wird eine Erhöhung von CXCL12 in nodal-positiven (N1) im Vergleich zu nodal-negativen (N0) Magenkarzinomen gemessen, die mit einem *fold change* Faktor von 1,34 jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,132$) erreicht. Im Vergleich von Tumor- und Normalgewebe ist eine signifikant verminderte mRNA-Expression in den Tumorproben zu verzeichnen ($p = 0,033$).

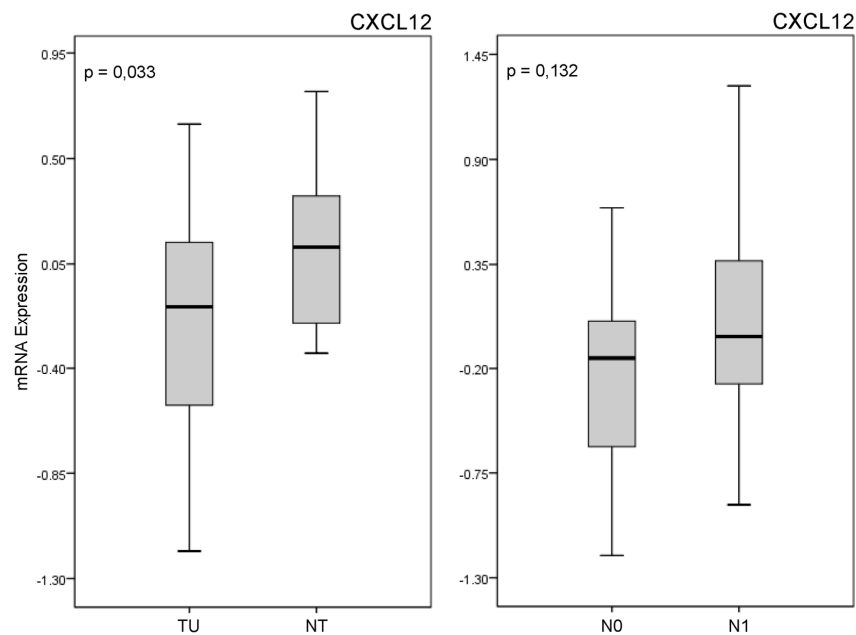


Abbildung 4.5 Boxplots CXCL12.

Die mRNA-Expression von CXCL12 in 37 Magenkarzinompatienten. Links der Vergleich zwischen Tumor- (TU) und den jeweils dazugehörigen Nicht-Tumorproben (NT) desselben Patienten. Rechts der Vergleich von Gewebeproben der Patienten mit (N1) und ohne (N0) Lymphknotenmetastasen. Die Ober- und Untergrenze der Box repräsentiert die 25. und 75. Perzentile; Linien (fett): Median; die *Whiskers* zeigen das Minimum und Maximum.

Im Gegensatz zu CXCL12 wird der Chemokinrezeptor CXCR4 im Tumorge- webe stärker exprimiert. Im entsprechenden Boxplot der Abbildung 4.6 ist zu erkennen, dass sich die beiden Gruppen im Mittel um einen Faktor von 1,15 unterscheiden. Der Vergleich von Patienten mit nodal-positiven (N1) und nodal- negativen (N0) Karzinomen zeigt ebenso wie für CXCL12 eine gesteigerte Expression von CXCR4 in Magenkarzinomen die Lymphknotenmetastasen auf- weisen. Eine statistische Signifikanz im doppelseitigen t-Test wird aber in beiden Vergleichsgruppen nicht erreicht (Tu vs. NT: $p = 0,229$; N0 vs. N1: $p = 0,169$).

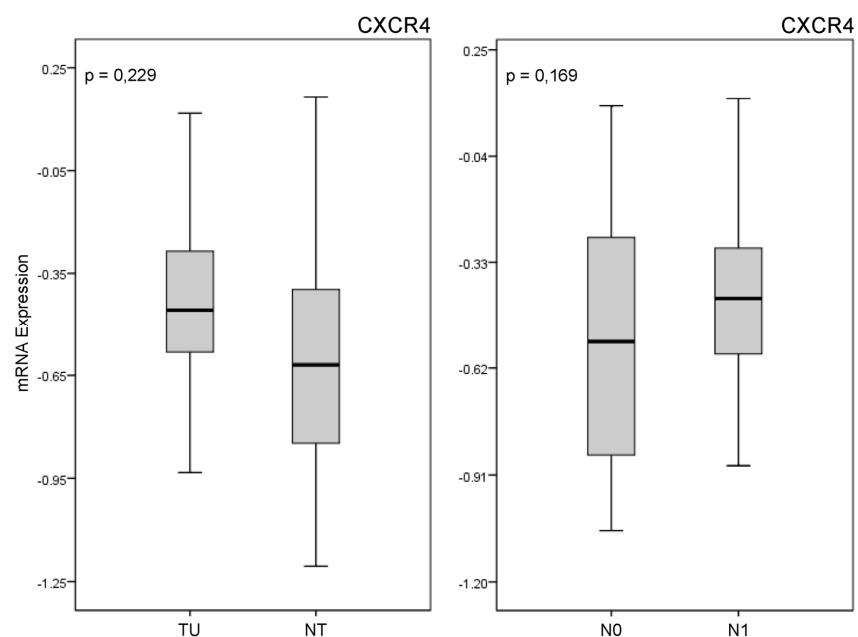


Abbildung 4.6 Boxplots CXCR4.

Die mRNA-Expression von CXCR4 im Magengewebe von 37 Patienten. Links der Vergleich zwischen Tumor- (TU) und den entsprechenden Nicht-Tumorproben (NT) desselben Patienten. Rechts der Vergleich von Gewebeproben der Patienten mit (N1) und ohne (N0) Lymphknoten- metastasen. Die Ober- und Untergrenze der Box repräsentiert die 25. und 75. Perzentile; Linien (fett): Median; die *Whiskers* zeigen das Minimum und Maximum.

4.2.1.2 Untersuchung der Proteinexpression von CXCL12 und CXCR4

Die CXCL12 Expression korreliert mit der Metastasierung des Tumors

Die immunhistochemische Färbung von CXCL12 und seinem Rezeptor CXCR4 sowie deren Beurteilung wurde von der Pathologin Dr. Barbara Ingold im Institut für Pathologie der Charité Berlin durchgeführt [132].

Für 291 Patientenproben war die Immunreaktivität von CXCL12 auswertbar. In 244 (84 %) von 291 Fällen sind die Tumorzellen CXCL12-positiv, davon weisen 143 (49 %) eine starke und 101 (35 %) Proben eine schwache zytoplasmatische und membranäre Färbung auf (siehe Abbildung 4.7). In insgesamt 47 Magenkarzinomen (16 %) ist keine Immunreaktion von CXCL12 nachweisbar. Interessanterweise zeigen alle analysierten Gewebeschnitte eine deutliche CXCL12-Positivität der Gefäßendothelzellen, die somit als interne Positiv-Kontrolle dienen (siehe Abbildung 4.7).

Die statistische Auswertung der Daten belegt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der CXCL12-Expression in Tumorzellen und dem Vorhandensein von Fernmetastasen ($p = 0,043$) sowie mit dem Differenzierungsgrad des Tumors (Grad, $p = 0,006$). Die Expression von CXCL12 im Tumor hat jedoch keinen Einfluss auf das Patientenüberleben ($p = 0,830$). Auch eine Unterteilung der Karzinome in den intestinalen ($p = 0,766$) und diffusen ($p = 0,817$) Typ nach Laurén offenbart keine weitere klinisch-pathologische Bedeutung von CXCL12 (siehe Tabelle 4.1).

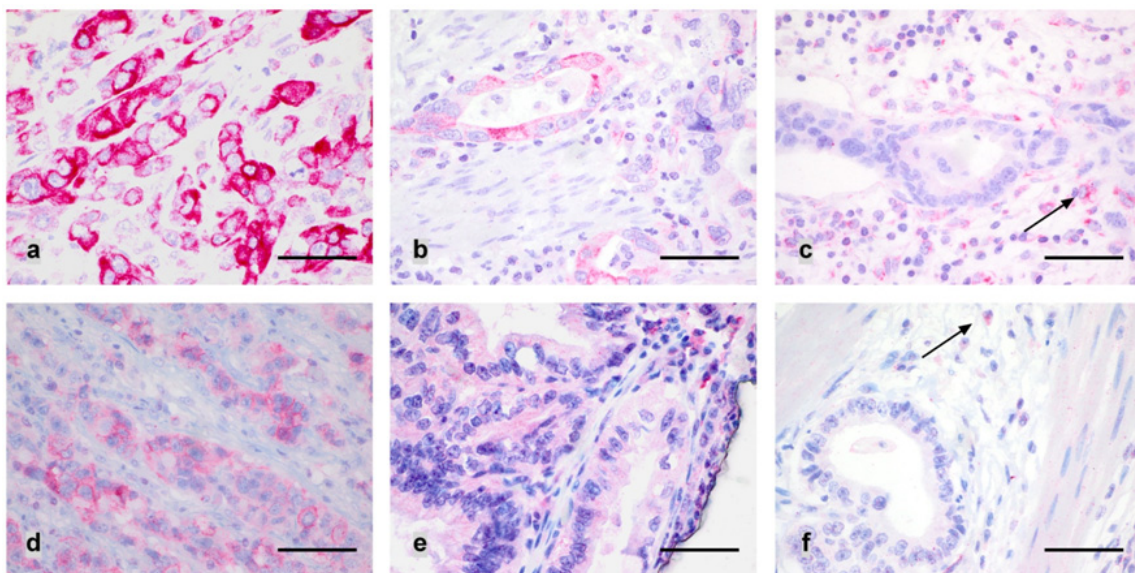


Abbildung 4.7 Expression von CXCL12 und CXCR4 in Tumorzellen.

Zu sehen sind Magenkarzinomproben mit starker (a) und schwacher (b) CXCL12-Immunreaktivität. Nur wenige Fälle sind CXCL12-negativ (c), der Pfeil kennzeichnet ein CXCL12-positives Blutgefäß. Magenkarzinomproben, die eine klare zytoplasmatische und membranäre CXCR4-Immunreaktivität aufweisen, sind selten (d). Wenige Proben zeigen eine schwache (e) CXCR4-Färbung, der Großteil der Tumoren besitzt jedoch keine CXCR4-Expression (f). CXCR4-positive Leukozyten dienen als interne Positivkontrolle (Pfeil). Maßstab: a-f: 50 mm. Quelle: Ingold *et al.* [132]

Tabelle 4.1 Proteinexpression von CXCL12 im Magenkarzinom.

Magenkarzinom	Total	CXCL12 negativ	CXCL12 positiv	p-Wert
Patienten, n (%)	291	47 (16)	244 (84)	
Alter, Jahre, n (%)				0,525
≤ 65	138	20 (14)	118 (86)	
> 65	153	27 (18)	126 (82)	
Geschlecht, n (%)				0,621
Männer	187	32 (17)	155 (83)	
Frauen	103	15 (15)	88 (85)	
T-Kategorie, n (%)				
pT1/pT2a	48	8 (17)	40 (83)	1,000
pT2b/pT3/pT4	241	39 (16)	202 (84)	
pT1/pT2	151	24 (16)	127 (84)	1,000
pT3/pT4	140	23 (16)	117 (84)	
Lymphknoten, n (%)				0.200
Keine Metastasen	74	8 (11)	66 (89)	
Metastasen	215	39 (18)	176 (82)	
N-Kategorie, n (%)				0.220
pN0	74	8 (11)	66 (89)	
pN1	103	16 (16)	87 (84)	
pN2	78	14 (18)	64 (82)	
pN3	34	9 (26)	25 (74)	
UICC, n (%)				0.262
I	57	10 (18)	47 (82)	
II	73	7 (10)	66 (90)	
III	95	14 (15)	79 (85)	
IV	68	16 (24)	52 (76)	
M-Kategorie, n (%)				0.043
pM0	257	37 (14)	220 (86)	
pM1	34	10 (29)	24 (71)	
Grading, n (%)				0.006
G1/G2	77	5 (6)	72 (94)	
G3/G4	214	42 (20)	172 (80)	

Die CXCL12-Expression im Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. Die p-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. CXCL12 positiv: Anzahl (n) und Prozentsatz (%) der CXCL12-positiven Fälle.

CXCR4 wird von Endothelzellen der Tumorgefäße exprimiert

Die CXCR4-Immunreaktion konnte an 293 Magenkarzinomen ausgewertet werden. Der Großteil CXCR4-positiver Tumorproben zeigt eine schwache zytoplasmatische CXCR4-Immunreaktivität (44 Fälle, 15 %), lediglich sechs (2 %) Fälle weisen eine eindeutig membranäre Färbung auf (Abbildung 4.7). Insgesamt 83 % (243) der Magenkarzinome sind CXCR4-negativ. Als interne Positivkontrolle dienen hier die überwiegend positiv gefärbten Leukozyten. In 86 von 293 Fällen (29 %) sind CXCR4-positive Mikrogefäße im Tumorstroma zu finden, die eine kräftige CXCR4-Immunreaktivität der Endothelzellen zeigen. Durch die Gegenfärbung mit einem Antikörper für den Endothelzellmarker CD34 konnte

bestätigt werden, dass es sich bei diesen CXCR4-positiven Zellen um Endothelzellen handelt (Abbildung 4.8). Die statistische Analyse der CXCR4-Expression im Zusammenhang mit den klinisch-pathologischen Parametern macht deutlich, dass die CXCR4-Expression signifikant mit der lokalen Tumorausdehnung (T-Status, $p = 0,030$) korreliert (siehe Tabelle 4.2). Ein Zusammenhang zwischen der Expression von CXCR4 und dem Patientenüberleben besteht nicht.

Tabelle 4.2 Proteinexpression von CXCR4 im Magenkarzinom.

Magenkarzinom	Total	CXCR4 negativ	CXCR4 positiv	p-Wert
Patienten, n (%)	293	243 (83)	50 (17)	
Alter, Jahre, n (%)				0,757
≤ 65	142	119 (84)	23 (16)	
> 65	151	124 (82)	27 (18)	
Geschlecht, n (%)				0,629
Männer	187	154 (82)	33 (18)	
Frauen	105	89 (85)	16 (15)	
T-Kategorie, n (%)				
pT1/pT2a	52	43 (83)	9 (17)	1,000
pT2b/pT3/pT4	239	199 (83)	40 (17)	
pT1/pT2	153	134 (88)	19 (12)	0,030
pT3/pT4	140	109 (78)	31 (22)	
Lymphknoten, n (%)				0,721
Keine Metastasen	74	60 (86)	14 (14)	
Metastasen	217	181 (83)	36 (17)	
N-Kategorie, n (%)				0,830
pN0	74	60 (86)	14 (14)	
pN1	104	89 (86)	15 (14)	
pN2	79	64 (81)	15 (19)	
pN3	34	28 (82)	6 (18)	
UICC, n (%)				0,141
I	59	50 (85)	9 (15)	
II	73	66 (90)	7 (10)	
III	91	70 (77)	21 (23)	
IV	70	57 (81)	13 (19)	
M-Kategorie, n (%)				0,633
pM0	258	215 (83)	43 (17)	
pM1	35	28 (80)	7 (20)	
Grading, n (%)				0,163
G1/G2	78	69 (88)	9 (12)	
G3/G4	215	174 (81)	41 (19)	

Statistische Auswertung der CXCR4-Immunreaktivität in Korrelation mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika mit dem exakten Test nach Fisher. CXCR4 positiv: Anzahl (n) und Prozentsatz (%) der CXCR4-positiven Fälle.

Anschließend wurde auch die Beziehung zwischen der vaskulären CXCR4-Expression in den Endothelzellen der Tumor-Mikrogefäße mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern untersucht (siehe Tabelle 4.3).

Die vaskuläre CXCR4-Expression (vCXCR4) korreliert hoch signifikant mit dem lokalen Tumorwachstum (T-Kategorie, $p < 0,001$) und dem UICC-Stadium ($p = 0,006$). Darüber hinaus ist die vCXCR4-Expression signifikant mit dem Alter der Patienten ($p = 0,015$) assoziiert, hat jedoch keinen Einfluss auf das Patientenüberleben.

Tabelle 4.3 vCXCR4-Expression im Magenkarzinom.

Magenkarzinom	Total	vCXCR4 negativ	vCXCR4 positiv	p-Wert
Patienten, n (%)	293	207 (71)	86 (29)	
Alter, Jahre, n (%)				0,015
≤ 65	142	110 (77)	32 (23)	
> 65	151	97 (64)	54 (36)	
Geschlecht, n (%)				1,000
Männer	187	132 (71)	55 (29)	
Frauen	105	74 (70)	31 (30)	
T-Kategorie, n (%)				
pT1/pT2a	52	48 (92)	4 (8)	<0,001
pT2b/pT3/pT4	239	158 (66)	81 (34)	
pT1/pT2	154	124 (81)	30 (19)	<0,001
pT3/pT4	139	83 (60)	56 (40)	
Lymphknoten, n (%)				0.463
Keine Metastasen	74	55 (74)	19 (26)	
Metastasen	217	151 (70)	66 (30)	
N-Kategorie, n (%)				0.689
pN0	74	55 (74)	19 (26)	
pN1	105	75 (71)	30 (29)	
pN2	79	52 (66)	27 (34)	
pN3	33	24 (73)	9 (27)	
UICC, n (%)				0.006
I	58	52 (90)	6 (10)	
II	74	51 (69)	23 (31)	
III	91	56 (62)	35 (38)	
IV	69	48 (70)	21 (30)	
M-Kategorie, n (%)				0.427
pM0	259	185 (71)	74 (29)	
pM1	34	22 (65)	12 (35)	
Grading, n (%)				0.773
G1/G2	78	54 (69)	24 (31)	
G3/G4	215	153 (71)	62 (29)	

Korrelation der vCXCR4-Expression mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. Die statistische Analyse wurde mit dem exakten Test nach Fisher durchgeführt. vCXCR4 positiv: Anzahl (n) und Prozentsatz (%) der vCXCR4-positiven Fälle.

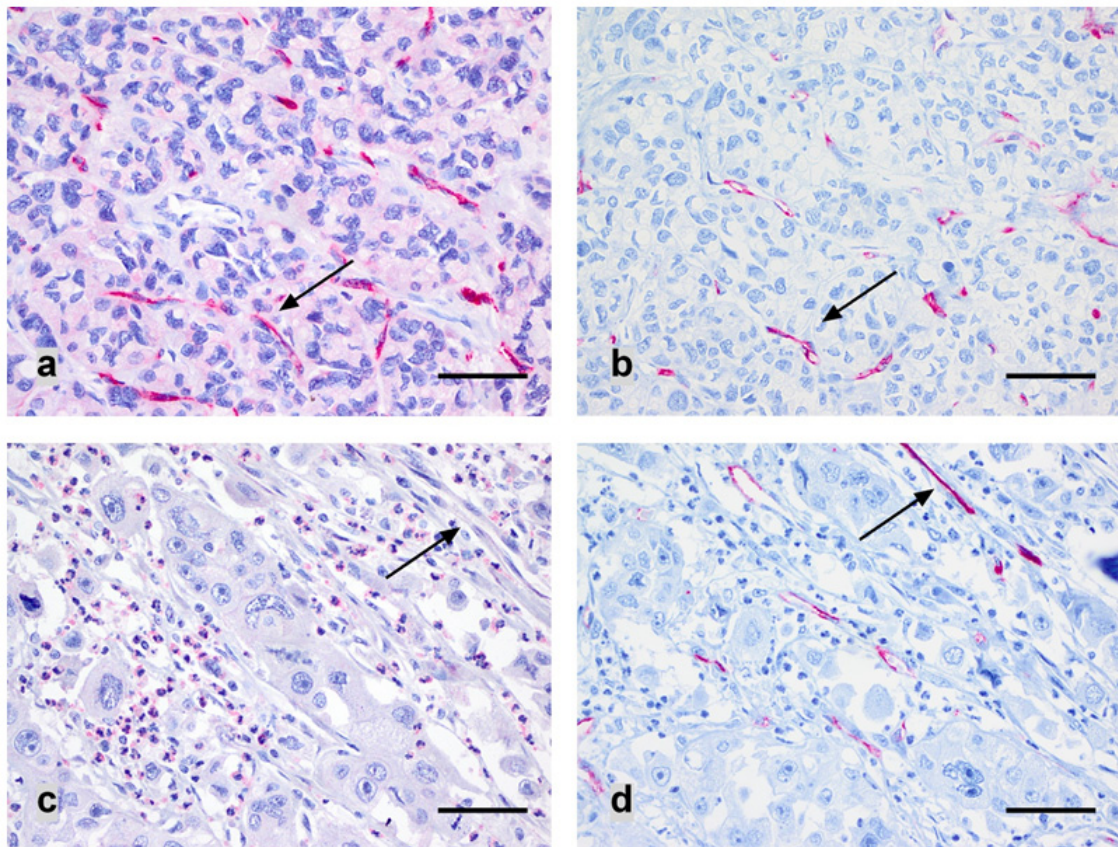


Abbildung 4.8 CXCR4-Expression in Tumor-Mikrogefäßen.

Die Magenkarzinomproben zeigen entweder eine starke (a) oder gar keine (c) vaskuläre CXCR4-Immunreaktivität (gekennzeichnet durch Pfeile). Dass es sich hier um Gefäßstrukturen handelt, wurde durch die Färbung mit dem Endothelzellmarker CD34 verifiziert (b, d). Maßstab: a-d: 50 μ m. Quelle: Ingold *et al.* [132].

4.2.2 Die Expression von ADAM17 ist im Magenkarzinom signifikant erhöht

4.2.2.1 Analyse der mRNA-Expression von ADAM17

Die Analyse der ADAM17 mRNA zeigt in einer Gruppe von Fällen aus dem Validierungskollektiv eine hoch signifikante Steigerung ($p < 0,001$) der Genexpression. ADAM17 ist in den Primärtumoren gegenüber der nicht-neoplastischen Mukosa 2,4x so stark exprimiert. Im Gewebe von Patienten mit positivem Lymphknotenbefund (N1) und Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0) unterscheidet sich die mittlere ADAM17-Expression nur gering (Abbildung 4.9). Mit einer 1,09-fach höheren Genexpression in nodal-positiven Magenkarzinompatienten ist der Unterschied zudem statistisch nicht signifikant ($p = 0,816$).

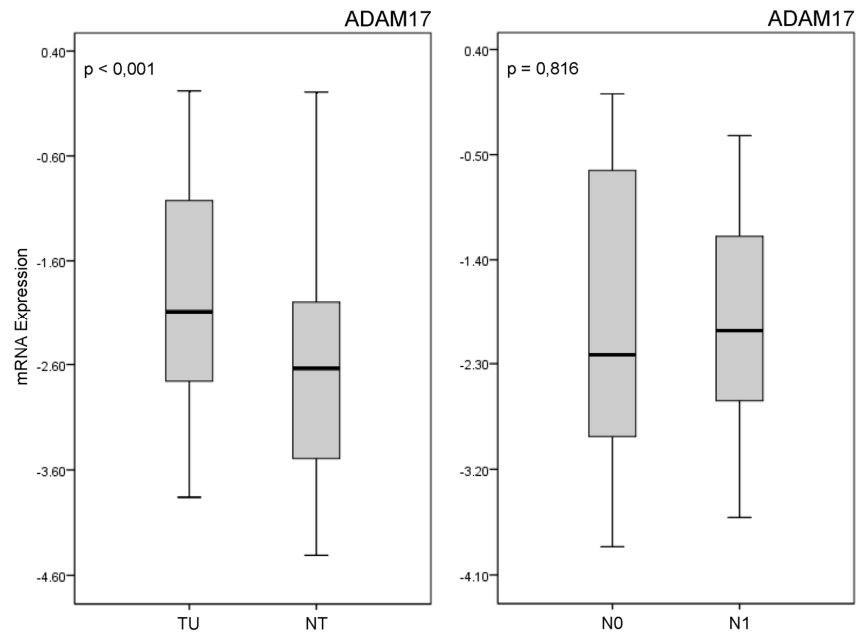


Abbildung 4.9 Boxplots ADAM17.

Die mRNA-Expression von ADAM17 in 38 Magenkarzinompatienten. Links der Vergleich zwischen Tumor- (TU) und den jeweils dazugehörigen Nicht-Tumorproben (NT) desselben Patienten. Rechts der Vergleich von Gewebeproben der Patienten mit (N1) und ohne (N0) Lymphknotenmetastasen. Die Ober- und Untergrenze der Box repräsentiert die 25. und 75. Perzentile; Linien (fett): Median; die *Whiskers* zeigen das Minimum und Maximum.

4.2.2.2 Beurteilung der klinisch-pathologischen Bedeutung von ADAM17

Die TMA-Immunfärbungen von ADAM17 und FZD7 wurden von der Pathologin Dr. Viktoria Warneke im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, beurteilt [133].

Insgesamt 126 (27 %) der 473 ausgewerteten TMA-Proben zeigen eine positive Färbung für ADAM17. Im Magengewebe wird ADAM17 vorwiegend zytoplasmatisch, teilweise aber auch membranständig exprimiert. Außerdem wird ADAM17 insbesondere von Zellen an der Basis der intestinalen Metaplasie exprimiert (Abbildung 4.10).

Nach eingehender Auswertung der immunhistochemischen Daten kann keine Korrelation zwischen der ADAM17-Immunreaktivität und einem klinisch-pathologischen Parameter festgestellt werden (Tabelle 4.4). Ebenso wenig scheint ADAM17 Einfluss auf das Patientenüberleben zu haben (Tabelle 4.7). Überraschenderweise korreliert die ADAM17-Immunreaktion der Tumorzellen jedoch hoch signifikant mit der FZD7-Immunreaktion in denselben Magenkarzinomfällen des Kollektivs ($p < 0,001$) (Tabelle 4.4).

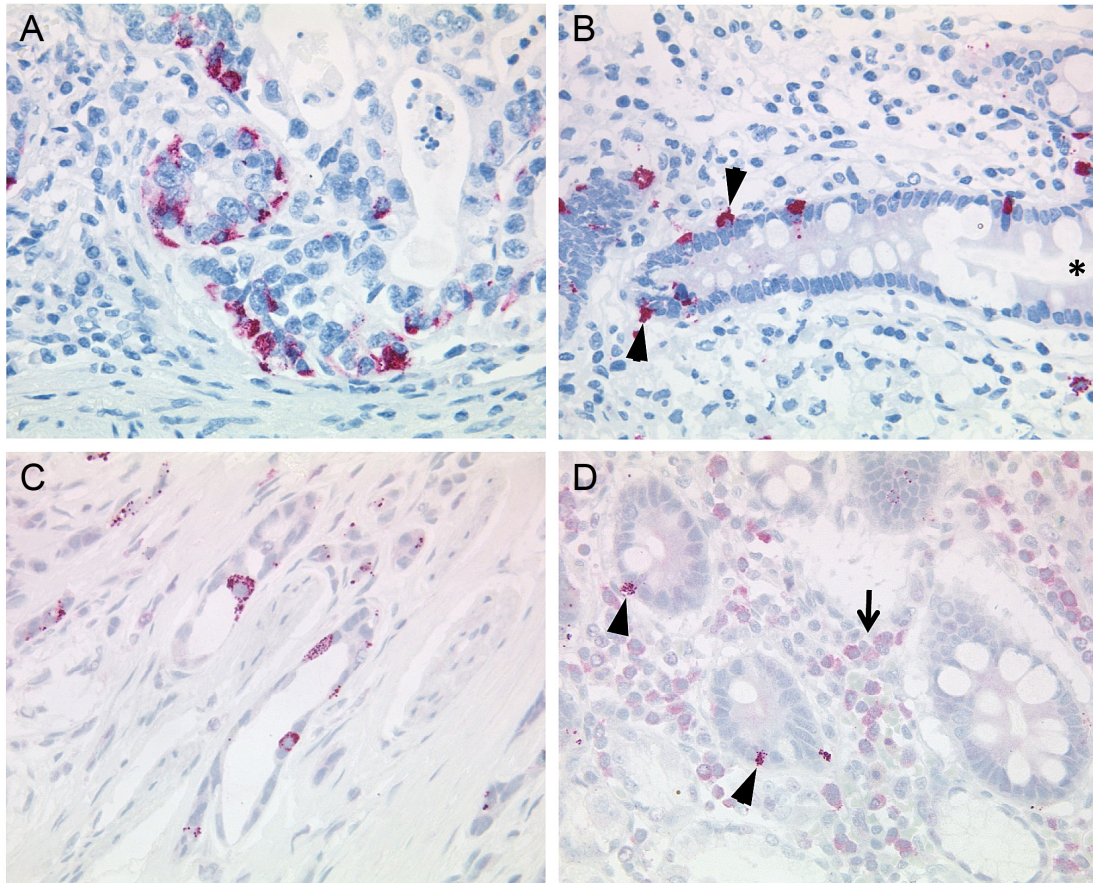


Abbildung 4.10 ADAM17- und FZD7-Expression in Magenkarzinom-TMAs.

Repräsentative Bilder der ADAM17- (A, B) und FZD7-Immunreaktion (C, D) in TMAs aus Magenkarzinomgewebe. ADAM17 und FZD7 werden sowohl in den Tumorzellen des Magenkarzinoms (A und C), als auch in Zellen an der Basis der intestinalen Metaplasie (B und D) exprimiert (markiert durch Pfeilspitzen). Das Sternchen (*) markiert die luminale Seite. Zusätzlich kann eine FZD7-Immunreaktivität in den inflammatorischen Zellen des angrenzenden nicht-neoplastischen Gewebes festgestellt werden (D, siehe Pfeil). Originalvergrößerung x 200 (B) und x 400 (A, C, D).

Tabelle 4.4 Proteinexpression von ADAM17 im Magenkarzinom.

Magenkarzinom	Total	ADAM17 negativ	ADAM17 positiv	p-Wert
Patienten, n (%)	473	347 (73)	126 (27)	
Alter (MW ± SA)		68 ± 10,5	66 ± 12,6	
Alter, Jahre, n (%)				0,526
< 68	224	167 (75)	57 (25)	
≥ 68	230	165 (72)	65 (28)	
Geschlecht, n (%)				0,668
Männer	295	214 (73)	81 (27)	
Frauen	178	133 (75)	45 (25)	
Tumortyp, n (%)				0,150
Intestinal	234	176 (75)	58 (25)	
Diffus	142	98 (69)	44 (31)	
Mischtyp	28	17 (61)	11 (39)	
Unklassifiziert	51	41 (80)	10 (20)	
Lokalisation, n (%)				0,176
Proximal	146	113 (77)	33 (23)	
Distal	315	224 (71)	91 (29)	
T-Kategorie, n (%)				0,655
pT1a	12	9 (75)	3 (25)	
pT1b	46	35 (76)	11 (24)	
pT2	54	43 (80)	11 (20)	
pT3	187	132 (71)	55 (29)	
pT4a	130	93 (72)	37 (28)	
pT4b	42	34 (81)	8 (19)	
Lymphknoten, n (%)				0,244
Keine Metastasen	130	100 (77)	30 (23)	
Metastasen	326	232 (71)	94 (29)	
N -Kategorie, n (%)				0,312
pN0	134	103 (77)	31 (23)	
pN1	71	50 (70)	21 (30)	
pN2	78	54 (69)	24 (31)	
pN3	67	49 (73)	18 (27)	
pN3a	67	54 (81)	13 (19)	
pN3b	50	32 (64)	18 (36)	
UICC, n (%)				0,717
IA	46	34 (74)	12 (26)	
IB	29	22 (76)	7 (24)	
IIA	56	42 (75)	14 (25)	
IIB	51	37 (73)	14 (27)	
IIIA	53	41 (77)	12 (23)	
IIIB	79	54 (68)	25 (32)	
IIIC	68	54 (79)	14 (21)	
IV	78	52 (67)	26 (33)	
Grading, n (%)				0,500
G1	8	7 (88)	1 (12)	
G2	102	71 (70)	31 (30)	
G3/G4	348	257 (74)	91 (26)	
FZD7				<0,001
negativ (=0)	292	232 (80)	60 (20)	
positiv (>0)	162	99 (61)	63 (39)	

Zusammenhang der ADAM17-Expression mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika, ausgewertet mit dem exakten Test nach Fisher. Berechnung des Korrelationskoeffizienten zwischen der ADAM17- und FZD7-Expression mit der Rangkorrelation nach Kendalls Tau. ADAM17 positiv: Anzahl (n) und Prozentsatz (%) der ADAM17-positiven Fälle. MW = Mittelwert; SA = Standardabweichung.

4.2.3 Die FZD7-Expression korreliert mit dem Patientenüberleben

4.2.3.1 Untersuchung der FZD7-Expression auf mRNA-Ebene

Der *frizzled family receptor* FZD7 wird in nodal-positiven gegenüber nodal-negativen Magenkarzinomen 1,99-fach höher exprimiert, erreicht mit einem p-Wert von $p = 0,143$ trotzdem keine statistische Signifikanz. Ein Expressionsunterschied zeigt sich auch im Vergleich von Tumor- und Nicht-Tumorgewebe. Anhand des Medians ist im Boxplot der Abbildung 4.11 eine um das 1,24-fache gesteigerte FZD7-Expression im Primärtumor gegenüber dem Normalgewebe eines Patienten erkennbar. Die statistische Auswertung mit dem doppelseitigen t-Test ergibt aber auch in dieser Analyse keine Signifikanz.

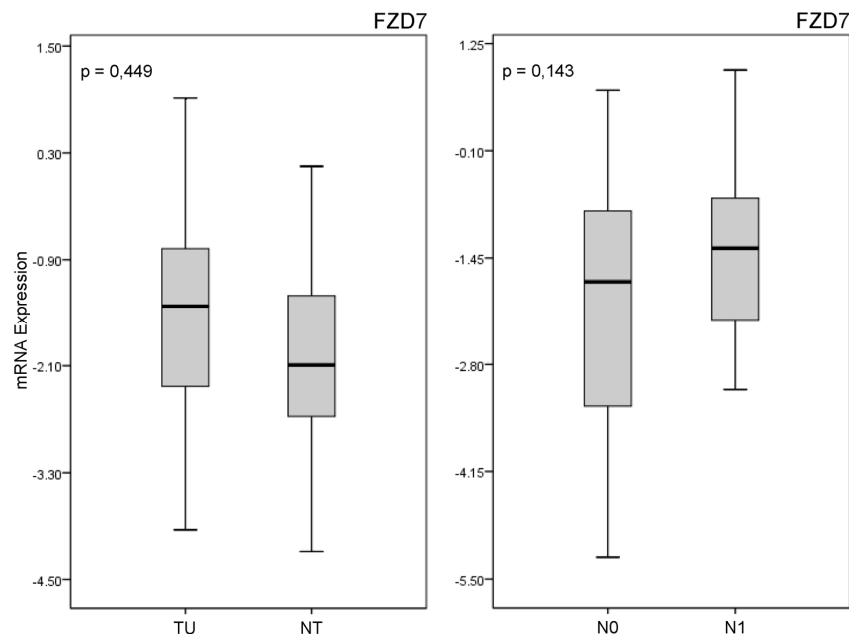


Abbildung 4.11 Boxplots FZD7.

Die FZD7 mRNA-Expression in 38 Magenkarzinompatienten. Links der Vergleich zwischen Tumor- (TU) und den entsprechenden Nicht-Tumorproben (NT) desselben Patienten. Rechts der Vergleich von Gewebeproben der Patienten mit (N1) und ohne (N0) Lymphknotenmetastasen. Die Ober- und Untergrenze der Box repräsentiert die 25. und 75. Perzentile; Linien (fett): Median; die *Whiskers* zeigen das Minimum und Maximum.

4.2.3.2 Untersuchung der FZD7-Expression auf Proteinebene Patienten mit FZD7-positiven Tumoren zeigen ein signifikant kürzeres Überleben

Die Auswertung von 467 Magenkarzinomen ergab in 165 (35 %) Fällen eine positive Immunfärbung für FZD7. Sowohl im Tumorgewebe als auch in den inflammatorischen Zellen des angrenzenden nicht-neoplastischen Gewebes wird FZD7 exprimiert. FZD7-positive Zellen zeigen im Magenkarzinom eine vorwiegend zytoplasmatische und nur im geringen Maße membranständige Immunreaktivität. In kolorektalen Karzinomen wird FZD7 vorwiegend in den proliferativ aktiven Bereichen des Tumorzentrums exprimiert [217,218]. Interessanterweise ist auch im Magen eine auffällige FZD7-Expression an der Basis der intestinalen Metaplasie zu beobachten, die die Regenerationszone des Epithels darstellt (siehe Abbildung 4.10) [219].

Die statistische Datenanalyse beweist eine signifikante Korrelation zwischen der FZD7-Immunreaktion in Tumorzellen und dem Tumortyp nach Laurén ($p = 0,012$). Ein Zusammenhang mit dem lokalen Tumorwachstum (T-Status), der Lymphknotenbeteiligung (N-Status) oder dem Differenzierungsgrad des Tumors (G-Status) besteht nicht (Tabelle 4.5). Ungeachtet dessen hat die FZD7-Expression eine Bedeutung für das Patientenüberleben. Patienten, die an einem FZD7-positiven Tumor erkrankt sind, zeigen eine signifikant kürzere Überlebenszeit, als solche mit FZD7-negativen Tumoren ($p = 0,007$, 12,5 gegenüber 17,7 Monaten Überleben, Abbildung 4.12 und Tabelle 4.7).

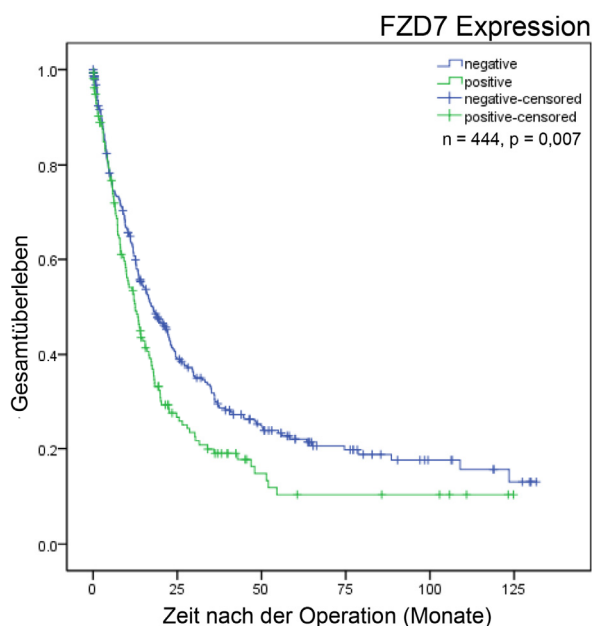


Abbildung 4.12 Einfluss der FZD7-Expression auf das Patientenüberleben.

Die Kaplan-Meier Kurve stellt das Gesamtüberleben des TMA-Kollektivs in Abhängigkeit von der FZD7-Expression im Magenkarzinom dar. Der p-Wert wurde mit dem Log-Rang-Test berechnet. n = Anzahl der Patienten.

Tabelle 4.5 Proteinexpression von FZD7 im Magenkarzinom.

Magenkarzinom	Total	FZD7 negativ	FZD7 positiv	p-Wert
Patienten, n (%)	467	302 (65)	165 (35)	
Alter (MW ± SA)		67 ± 11,4	68 ± 10,4	
Alter, Jahre, n (%)				0,235
< 68	221	150 (68)	71 (32)	
≥ 68	227	141(62)	86 (38)	
Geschlecht, n (%)				0,161
Männer	293	182 (62)	111 (38)	
Frauen	174	120 (69)	54 (31)	
Tumortyp, n (%)				0,012
Intestinal	234	140 (60)	94 (40)	
Diffus	138	105 (76)	33 (24)	
Mischtyp	26	16 (62)	10 (38)	
Unklassifiziert	50	31 (62)	19 (38)	
Lokalisation, n (%)				0,346
Proximal	147	91 (62)	56 (38)	
Distal	307	204 (66)	103 (34)	
T-Kategorie, n (%)				0,682
pT1a	8	6 (75)	2 (25)	
pT1b	43	32 (74)	11 (26)	
pT2	55	33 (60)	22 (40)	
pT3	190	119 (63)	71 (37)	
pT4a	128	83 (65)	45 (35)	
pT4b	41	28 (68)	13 (32)	
Lymphknoten, n (%)				0,913
Keine Metastasen	127	82 (65)	45 (35)	
Metastasen	324	206 (64)	118 (36)	
N -Kategorie, n (%)				0,600
pN0	131	86 (66)	45 (34)	
pN1	70	39 (56)	31 (44)	
pN2	76	51 (67)	25 (33)	
pN3	68	43 (63)	25 (37)	
pN3a	68	44 (65)	24 (35)	
pN3b	49	35 (71)	14 (29)	
UICC, n (%)				0,175
IA	41	31 (76)	10 (24)	
IB	30	19 (63)	11 (37)	
IIA	55	33 (60)	22 (40)	
IIB	50	27 (54)	23 (46)	
IIIA	54	36 (67)	18 (33)	
IIIB	79	54 (68)	25 (32)	
IIIC	68	50 (74)	18 (26)	
IV	78	44 (56)	34 (44)	
Grading, n (%)				0,248
G1	8	6 (75)	2 (25)	
G2	100	58 (58)	42 (42)	
G3/G4	343	228 (66)	115 (34)	

Korrelation der FZD7-Expression mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. Die p-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher berechnet. FZD7 positiv: Anzahl (n) und Prozentsatz (%) der FZD7-positiven Fälle. MW = Mittelwert; SA = Standardabweichung.

4.3 LGR5 in der humanen Tumorigenese

4.3.1 Die LGR5-Expression ist im Magenkarzinom erhöht

4.3.1.1 Untersuchung der differentiellen mRNA-Expression von LGR5

Der Vergleich der LGR5-Expression im Magenkarzinom zeigt keine signifikanten Unterschiede in den analysierten Vergleichsgruppen. Allerdings steigt die Expression von LGR5 in nodal-positiven im Vergleich zu nodal-negativen Magenkarzinomen mit einem *fold change* Faktor von 1,55 deutlich an. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse des in Vorarbeiten durchgeführten GeneChip Arrays. Zwischen dem neoplastischen (TU) und nicht-neoplastischen Gewebe (NT) eines Patienten ist der Unterschied der LGR5 mRNA-Expression ebenfalls sichtbar (siehe Abbildung 4.13).

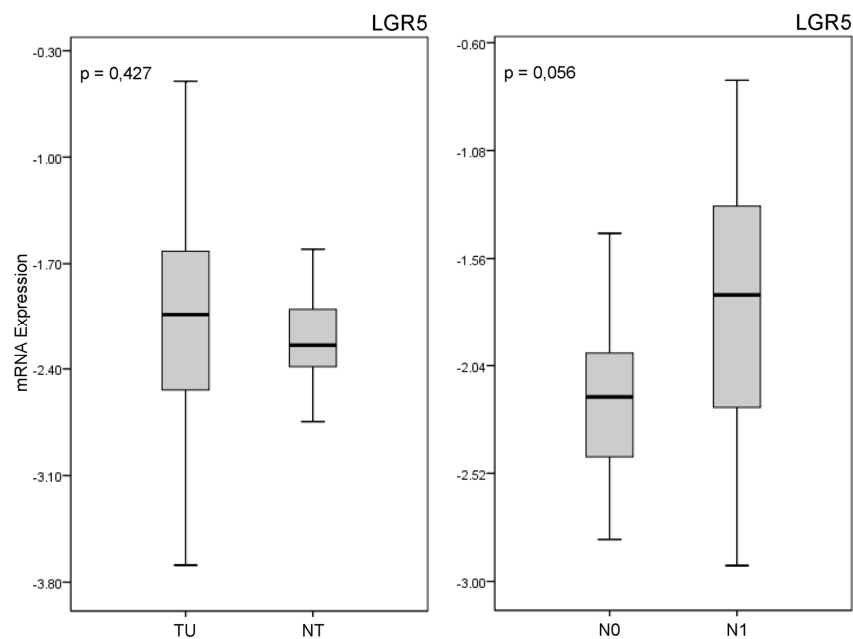


Abbildung 4.13 Boxplots LGR5.

Die LGR5 mRNA-Expression in 40 Magenkarzinompatienten. Links der Vergleich zwischen Tumor- (TU) und den jeweils dazugehörigen Nicht-Tumorproben (NT) desselben Patienten. Rechts der Vergleich von Gewebeproben der Patienten mit (N1) und ohne (N0) Lymphknotenmetastasen. Die Ober- und Untergrenze der Box repräsentiert die 25. und 75. Perzentile; Linien (fett): Median; die *Whiskers* zeigen das Minimum und Maximum.

4.3.1.2 Validierung des selbst hergestellten Anti-LGR5-Antikörpers

Die klinisch-pathologische Bedeutung von LGR5 und seine histoanatomische Verteilung in humanem Gewebe sollte mithilfe eines spezifischen Antikörpers aufgedeckt werden. Da die zu Beginn dieser Arbeit kommerziell erhältlichen Antikörper keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten (siehe Abbildung 4.14), wurde in Zusammenarbeit mit Pineda-abservice ein spezifischer, zweifach aufgereinigter polyklonaler Anti-LGR5-Antikörper hergestellt, der den immunhistochemischen Nachweis von LGR5 ermöglichte (siehe Abschnitt 3.3.5).

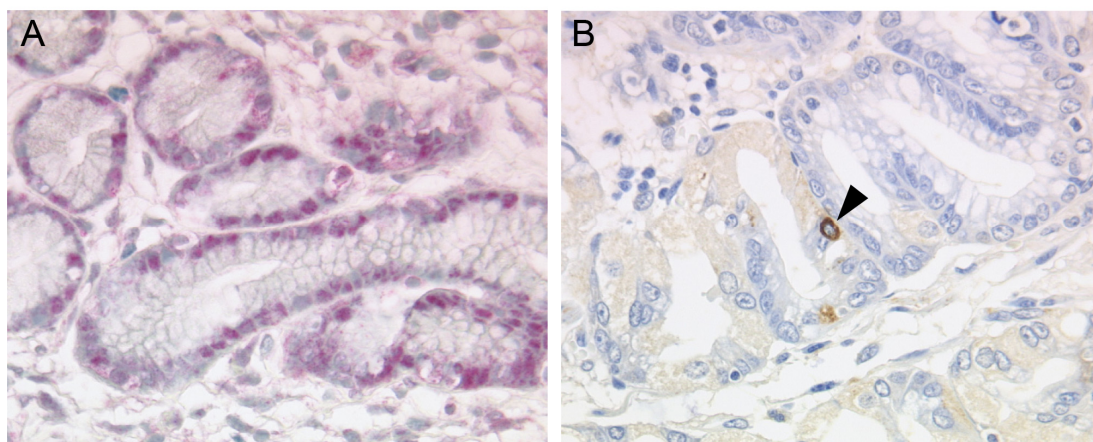


Abbildung 4.14 Vergleichende Immunfärbung von LGR5-Antikörpern.

Repräsentative Bilder einer relativ unspezifischen Immunfärbung mit dem kommerziellen Anti-LGR5-Antikörper LGR5^{com} (in Rot, A) und der selektiven Immunreaktion nach Inkubation mit dem selbst hergestellten Anti-LGR5-Antikörper (in Braun, B) im Magengewebe. Originalvergrößerung x 400.

Der polyklonale Anti-LGR5-Antikörper detektiert humanes LGR5 in transfizierten HEK293- und Magenkarzinomzellen

Um die Spezifität des LGR5-Antikörpers darzustellen wurde die vollständige cDNA-Sequenz von LGR5 in den Vektor pcDNA3.1(-) kloniert, transient in HEK293 EBNA-Zellen transfiziert (LGR5/HEK293) und so als positive Zielstruktur für die anschließende Immunfluoreszenz-Analyse verwendet.

Die LGR5 cDNA ist mit einem c-Myc-Epitop versehen und ermöglicht damit die Überprüfung der erfolgreichen Transfektion über einen entsprechenden Antikörper. Die Immunfluoreszenz der transient transfizierten Zellen zeigt eine Bindung des Anti-c-Myc-Antikörpers nach Inkubation mit LGR5/HEK293-Zellen. In Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden (Vektor/HEK293) oder in

untransfizierten HEK293-Zellen ist hingegen kein Fluoreszenzsignal detektierbar. Auch die Negativkontrolle der LGR5/HEK293-Zellen, die mit Antibody Diluent anstelle des Antikörpers inkubiert wurden, zeigt keine Fluoreszenz. Analog dazu detektiert der Anti-LGR5-Antikörper ebenfalls nur Zellen, die zuvor mit LGR5 transfiziert wurden und bestätigt so dessen spezifische Bindung an das LGR5-Protein (siehe Abbildung 4.15).

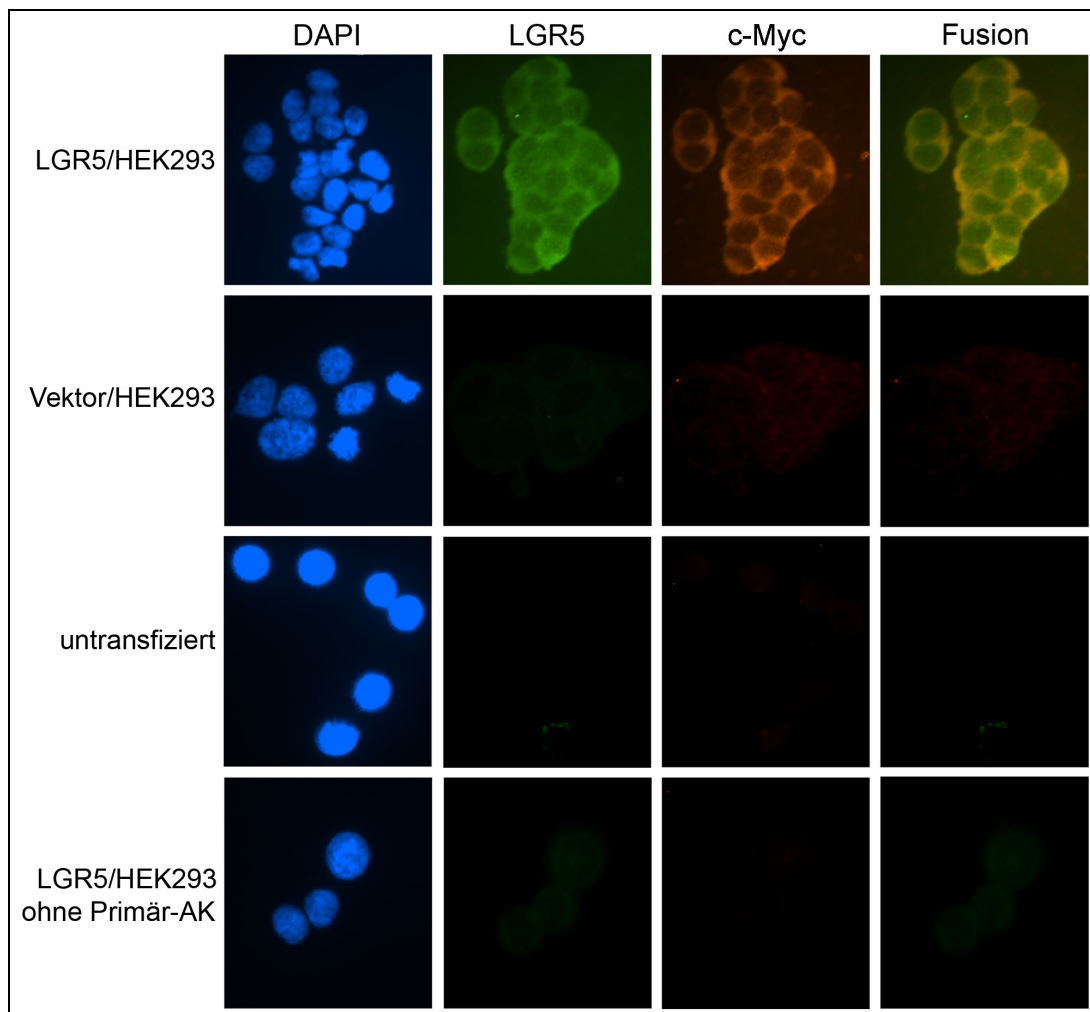


Abbildung 4.15 Immunfluoreszenzfärbung von HEK293 EBNA.

Immunfluoreszenzfärbung von HEK293 EBNA-Zellen mit dem LGR5-spezifischen Antikörper (Grün) und dem Anti-c-Myc-Antikörper (Rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (Blau). Die Abbildung zeigt HEK293-Zellen, transfiziert mit der c-Myc-markierten LGR5 cDNA (LGR5/HEK293, erste Bildreihe) im Vergleich zu den Kontrollen aus Leervektor-transfizierten Zellen (Vektor/HEK293), untransfizierten Zellen oder LGR5/HEK293-Zellen, die ohne die primären Antikörper inkubiert wurden (LGR5/HEK293 ohne Primär-AK). Originalvergrößerung x 400.

Da der Anti-LGR5-Antikörper in nachfolgenden Studien für immunhistochemische Untersuchungen an Paraffin-Schnitten eingesetzt werden sollte, musste seine Spezifität auch für diese Anwendung validiert werden. Stabil transfizierte, Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Magenkarzinomzellen der Linie MKN45 und MKN74 wurden in der gleichen Weise wie klinische Gewebeproben aufbereitet und gefärbt, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf immunhistochemische Analysen zu gewährleisten (siehe Abschnitt 3.3.7).

Die immunzytochemischen Experimente zeigen eine spezifische Immunreaktion des Anti-LGR5-Antikörpers an Paraffinschnitten der stabil mit LGR5 transfizierten MKN45- und MKN74-Zellen (LGR5/MKN45, LGR5/MKN74). Im Gegensatz dazu wird in den Paraffinschnitten von Leervektor-transfizierten Zellen (Vektor/MKN45, Vektor/MKN74) sowie in der Negativkontrolle (Inkubation ohne den Primärantikörper) und der Peptidkontrolle (Blockierung des Antikörpers durch das spezifische Peptid) von LGR5/MKN45- und LGR5/MKN74-Zellen keine Bindung des Antikörpers nachgewiesen (Abbildung 4.16).

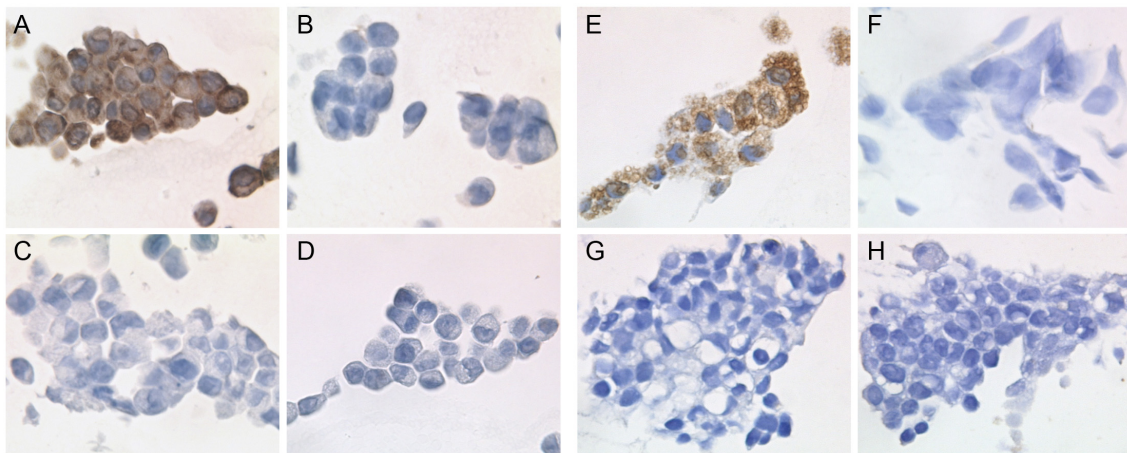


Abbildung 4.16 Immunzytochemie an stabil transfizierten MKN45- und MKN74-Zellen.

Immunzytochemische LGR5-Färbung von MKN45- (A-D) und MKN74-Zellen (E-F). LGR5-Immunreaktivität von MKN45- und MKN74-Zellen, die stabil mit LGR5 cDNA transfiziert wurden (LGR5/MKN45 A, LGR5/MKN74 E), im Vergleich mit den Leervektor-transfizierten Zellen (Vektor/MKN45 B, Vektor/MKN74 F). Die unteren Abbildungen zeigen jeweils LGR5/MKN45- bzw. LGR5/MKN74-Zellen nach der Inkubation ohne den Primärantikörper (C, G) bzw. nach der Färbung mit dem Anti-LGR5-Antikörper, der zuvor mit seinem immunisierenden Peptid blockiert wurde (D, H). Originalvergrößerung x 600.

Im Western Blot können auch geringe Proteinmengen mit dem Anti-LGR5-Antikörper detektiert werden

Im Western Blot wurde die Reaktivität und Spezifität des neuen Anti-LGR5-Antikörpers auf Proteinebene untersucht. Aufgrund der in der Real-time RT-PCR gemessenen mRNA-Expressionlevel, wurden Proteinlysate von Leervektor-transfizierten humanen MKN74-Zellen (Vektor/MKN74) mit geringer LGR5-Expression, von humanem nicht-neoplastischen Magen mit einer sehr niedrigen LGR5-Expression und von LGR5-transfizierten MKN74-Zellen (LGR5/MKN74) für die Charakterisierung ausgewählt. Die Western-Blot-Experimente zeigen, dass das LGR5-Protein selbst bei einer Antikörper-Verdünnung von 1:20.000 noch spezifisch detektiert wird. Der Anti-LGR5-Antikörper macht in MKN74-Zelllysaten eine einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa sichtbar, die der berechneten molekularen Masse des LGR5-Proteins entspricht.

In Übereinstimmung mit den zuvor erhobenen mRNA-Expressionsdaten (hier nicht dargestellt) zeigt sich in LGR5/MKN74-Zelllysaten eine stärkere Expression des LGR5-Proteins als in Lysaten von Vektor/MKN74-Zellen. Im Gegensatz dazu kann in den Proteinlysaten aus humanem nicht-neoplastischen Magengewebe keine Bande detektiert werden, wodurch eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit zellulären Proteinen ausgeschlossen werden kann. Weder die Negativ- noch die Peptidkontrolle zeigen eine LGR5-spezifische Proteinbande. Durch den Nachweis des β -Aktin-Proteins (etwa 43 kDa) ist sichergestellt, dass alle Spuren mit der gleichen Proteinmenge beladen wurden (Abbildung 4.17).

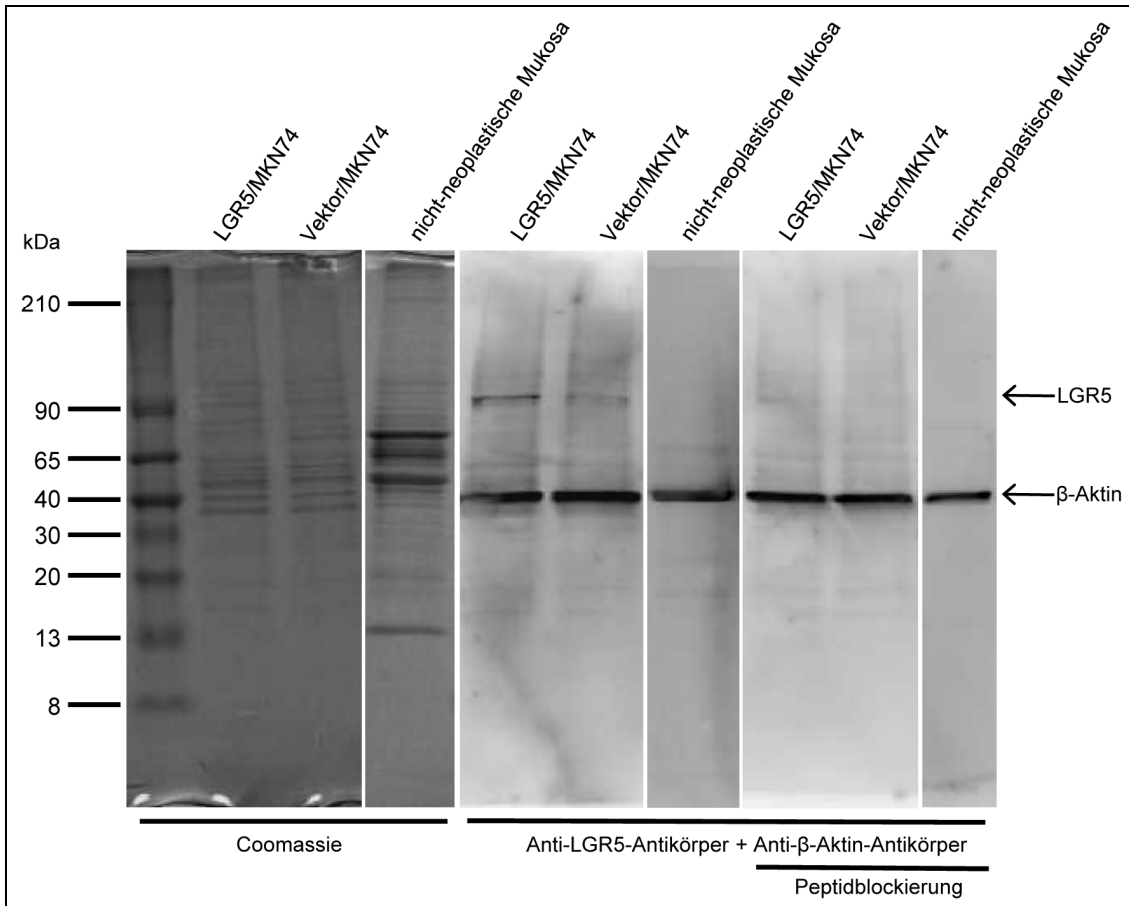


Abbildung 4.17 Validierung des Anti-LGR5-Antikörpers im Western Blot.

Die Qualität der geladenen Gesamt-Proteinlysate wird durch die Färbung mit Coomassie-Brilliantblau (Coomassie) dargestellt. Im Western Blot detektiert der Anti-LGR5-Antikörper (Verdünnung 1:20.000) eine einzelne Bande in Proteinlysaten der LGR5-überexprimierenden MKN74-Zellen (LGR5/MKN74), eine schwächere Bande in Leervektor-transfizierten Zellen (Vektor/MKN74) und gar keine Bande in Lysaten humaner nicht-neoplastischer Magenschleimhaut. In einem parallel beladenen Blot sind keine Zielbanden sichtbar, wenn der Anti-LGR5-Antikörper zuvor mit seinem spezifischen Peptid blockiert wurde (Peptidblockierung). Die jeweils oberen Banden (100 kDa, Pfeil) zeigen das LGR5-Protein, bei den unteren Banden (~ 43 kDa, Pfeil) handelt es sich um den Nachweis der Ladekontrolle β -Aktin.

4.3.1.3 Analyse der Proteinexpression von LGR5 im Magenkarzinom

Mit dem selbst generierten Antikörper konnte nun auch die Proteinexpression von LGR5 und dessen Bedeutung für die Tumorzellbiologie des Magenkarzinoms an 487 Tissue Microarrays überprüft werden. Die Beurteilung der LGR5-Immunfärbungen wurde von der Pathologin Dr. Christine Böger im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel vorgenommen [150].

LGR5 wird in den Tumorzellen von 244 der 487 Patienten (50 %) exprimiert (Tabelle 4.6). In 36 Fällen (7,5 %) zeigt sich eine starke zytoplasmatische und membranäre Immunreaktion, in 208 Fällen (43 %) ist die Färbung nur schwach bis mäßig stark (Abbildung 4.18). Die übrigen 243 Tumoren (50 %) weisen keine LGR5-Immunreaktivität auf. Zudem wird LGR5 nicht nur von Tumorzellen, sondern teilweise auch von Zellen des desmoplastischen Stromas (169 Fälle) und von Endothelzellen der Tumorgefäße (83 Fälle) exprimiert (siehe Abbildung 4.19).

Die Auswertung der klinischen Daten zeigt keinerlei Korrelation der LGR5-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern und ermöglicht auch keine Vorhersage des Patientenüberlebens (Tabelle 4.6 und 4.7). Vergleicht man die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von LGR5 mit denen von ADAM17, zeigt sich aber, dass die Expression beider Proteine im Magenkarzinomkollektiv hoch signifikant miteinander korreliert ist ($p < 0.001$) (Tabelle 4.6).

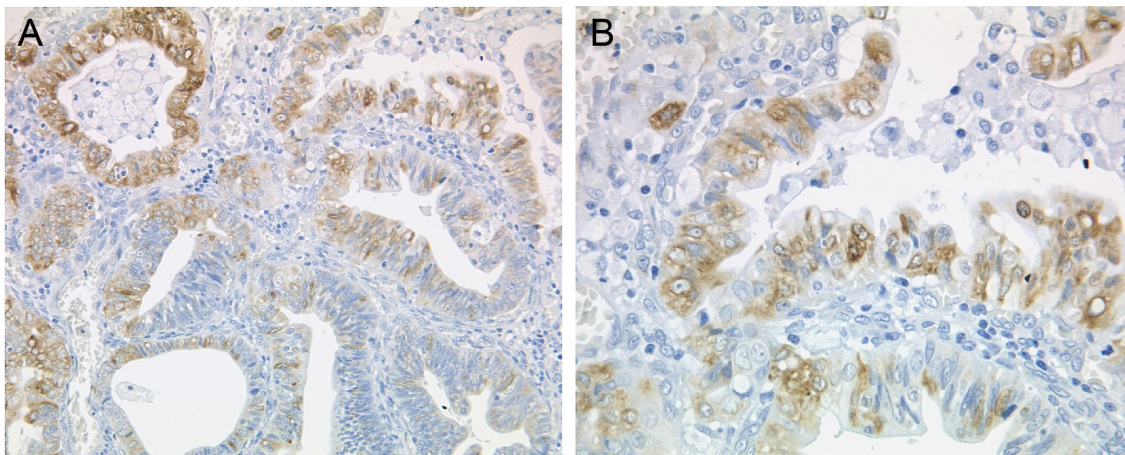


Abbildung 4.18 LGR5-Expression in Magenkarzinom-TMAs.

Repräsentative Bilder der LGR5-Immunreaktivität von Tumorzellen im Magenkarzinom. Originalvergrößerung x 200 (A) und x 400 (B).

Tabelle 4.6 Proteinexpression von LGR5 im Magenkarzinom.

Magenkarzinom	Total	LGR5 negativ	LGR5 positiv	p-Wert
Patienten, n (%)	487	243 (50)	244 (50)	
Alter (MW ± SA)		68 ± 10,8	68 ± 11,4	
Alter, Jahre, n (%)				0,643
< 68	217	103 (47)	114 (53)	
≥ 68	252	126 (50)	126 (50)	
Geschlecht, n (%)				0,575
Männer	304	155 (51)	149 (49)	
Frauen	183	88 (48)	95 (52)	
Tumortyp, n (%)				0,527
Intestinal	242	131 (54)	111 (46)	
Diffus	146	87 (60)	59 (40)	
Mischtyp	28	13 (46)	15 (54)	
Unklassifiziert	52	28 (54)	24 (46)	
Lokalisation, n (%)				1,000
Proximal	149	74 (50)	75 (50)	
Distal	315	156 (50)	159 (50)	
T-Kategorie, n (%)				0,704
pT1a	14	7 (50)	7 (50)	
pT1b	46	21 (46)	25 (54)	
pT2	56	23 (41)	33 (59)	
pT3	193	102 (53)	91 (47)	
pT4a	133	66 (50)	67 (50)	
pT4b	43	23 (53)	20 (47)	
Lymphknoten, n (%)				0,414
Keine Metastasen	134	62 (46)	72 (54)	
Metastasen	335	170 (51)	165 (49)	
N-Kategorie, n (%)				0,884
pN0	138	65 (47)	73 (53)	
pN1	71	38 (54)	33 (46)	
pN2	82	40 (49)	42 (51)	
pN3	69	38 (55)	31 (45)	
pN3a	71	34 (48)	37 (52)	
pN3b	50	25 (50)	25 (50)	
Grading, n (%)				0,088
G1	10	6 (60)	4 (40)	
G2	103	41 (40)	62 (60)	
G3/G4	357	183 (51)	174 (49)	
FZD7				0,059
Negativ (=0)	299	156 (52)	143 (48)	
Positiv (>0)	165	71 (43)	94 (57)	
ADAM17				<0,001
Negativ (=0)	343	190 (80)	153 (20)	
Positiv (>0)	126	39 (61)	87 (39)	

Korrelation der LGR5-Expression mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika, analysiert mit dem exakten Test nach Fisher. Berechnung des Korrelationskoeffizienten zwischen der LGR5-, FZD7- und ADAM17-Expression im Magenkarzinomkollektiv mit der Rangkorrelation nach Kendalls Tau. LGR5 positiv: Anzahl (n) und Prozentsatz (%) der LGR5-positiven Fälle. MW = Mittelwert; SA = Standardabweichung.

Tabelle 4.7 Überlebenszeitanalyse im TMA-Kollektiv.

	Patienten	Ereignisse	Medianes Überleben, Monate (95 % KI)	p-Wert
Generelles Überleben	469	336	15,5 (13,1-17,8)	
Alter, Jahre				0,078
< 68	234	160	16,6 ± 2,0 (12,6-20,6)	
≥ 68	235	176	13,4 ± 1,5 (10,5-16,3)	
Tumortyp				0,012
Intestinal	240	169	17,9 ± 1,9 (14,1-21,7)	
Diffus	146	110	14,2 ± 2,0 (10,3-18,0)	
Mischtyp	30	24	10,0 ± 4,2 (1,8-18,2)	
Unklassifiziert	50	32	16,8 ± 4,6 (7,8-25,8)	
Lokalisation				0,144
Proximal	148	113	12,6 ± 1,0 (10,6-14,6)	
Distal	321	223	17,2 ± 2,0 (13,3-21,2)	
T Kategorie				<0,001
pT1a	13	2	123,5 ± 49,7 (26,1-220,9)	
pT1b	47	18	64,9 ± 16,1 (33,3-96,5)	
pT2	51	29	35,2 ± 8,6 (18,4-51,9)	
pT3	188	139	16,7 ± 2,0 (12,8-20,6)	
pT4a	130	111	9,7 ± 1,8 (6,1-13,3)	
pT4b	40	37	9,3 ± 1,4 (6,5-12,1)	
Lymphknoten				<0,001
Keine Metastasen	134	56	55,5 ± 10,0 (35,9-75,0)	
Metastasen	332	277	11,7 ± 1,0 (9,9-13,6)	
N -Kategorie				<0,001
pN0	134	56	55,5 ± 10,0 (35,9-75,0)	
pN1	65	45	20,0 ± 3,6 (12,9-27,1)	
pN2	82	64	16,6 ± 2,0 (12,7-20,5)	
pN3	68	61	8,3 ± 1,1 (6,1-10,6)	
pN3a	67	59	9,8 ± 1,3 (7,2-12,3)	
pN3b	50	48	5,8 ± 1,5 (3,0-8,7)	
UICC				<0,001
IA	47	16	74,6 ± 32,7 (10,5-138,8)	
IB	30	11	52,0 ± 17,4 (17,9-86,1)	
IIA	56	32	35,8 ± 4,2 (27,6-44,1)	
IIB	48	28	26,1 ± 5,2 (15,9-36,3)	
IIIA	51	40	14,1 ± 3,0 (8,1-20,0)	
IIIB	82	71	13,4 ± 1,5 (10,4-16,5)	
IIIC	64	57	8,2 ± 2,6 (3,0-13,3)	
IV	82	79	6,4 ± 0,8 (4,8-8,0)	
Grading				<0,001
G1	10	4	56,0 ± 21,0 (14,8-97,0)	
G2	104	60	34,0 ± 8,1 (18,1-49,8)	
G3/G4	340	260	12,7 ± 0,8 (11,1-14,3)	
ADAM17-Expression TMA				0,440
ADAM17-positive Tumorzellen	119	91	14,7 ± 2,1 (10,5-18,7)	
ADAM17-negative Tumorzellen	331	235	15,6 ± 1,6 (12,6-18,7)	
FZD7-Expression TMA				0,007
FZD7-positive Tumorzellen	156	120	12,5 ± 1,5 (9,6-15,4)	
FZD7-negative Tumorzellen	288	203	17,7 ± 3,3 (13,2-22,3)	
LGR5-Expression TMA				0,915
LGR5-positive Tumorzellen	237	172	15,5 ± 1,5 (12,6-18,3)	
LGR5-negative Tumorzellen	228	160	14,7 ± 1,5 (11,7-17,7)	
LGR5 GF, Tumorzentrum und/oder Invasionsfront				0,100
LGR5-positive Tumorzellen	58	40	28,0±8,6 (11,0-44,9)	
LGR5-negative Tumorzellen	35	16	54,5±6,3 (42,2-66,9)	

Patientenüberleben im Zusammenhang mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern und der Expression von ADAM17, FZD7 und LGR5 in Tissue Microarrays (TMA) bzw. von LGR5 in Großflächenschnitten (GF). Die p-Werte wurden mit dem Log-Rang-Test (Mantel-Cox) und einem Konfidenzintervall (KI) von 95 % berechnet.

4.3.1.4 Charakterisierung der LGR5-positiven Zellen im Magen

Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor LGR5 erlangte kürzlich Bekanntheit als Marker Wnt-regulierter adulter Stammzellpopulationen im Haarfollikel, Darm und im Magen von Mäusen [220]. Die Identifizierung und Charakterisierung LGR5-positiver Zellen im humanen Magen scheiterte jedoch bislang am Fehlen eines spezifischen Markers [143].

Alle Untersuchungen mit dem hier generierten und validierten Anti-LGR5-Antikörper weisen darauf hin, dass im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich ein hoch spezifischer und selektiver Antikörper hergestellt werden konnte. Um die durch den Antikörper markierten, LGR5-positiven Zellen im Tumor- und Normalgewebe besser charakterisieren zu können, wurden eine Reihe von Einzel- und auch Doppelfärbungen durchgeführt.

LGR5 wird nur in wenigen Zellen der gesunden Magenmukosa exprimiert

Zur Beurteilung der LGR5-Expression in Normalgewebe wurden Serienschnitte eines Sleeve-Gastrektomie-Präparats angefertigt. Diese Präparate werden gewöhnlich bei der Behandlung von Übergewicht entnommen und zeigen keinen histologischen Hinweis eines Magenkarzinoms oder einer chronischen Gastritis. Bei den Färbungen von Normalgewebe wurden nur einzelne LGR5-positive Zellen im Übergangsbereich zwischen der Foveole und dem Drüsenkörper detektiert (siehe Abbildung 4.22 A und E).

LGR5 ist kein genereller Endothelzellmarker

Die umfangreiche Validierung der LGR5-Expression an 487 Magenkarzinom-TMAs zeigt, dass eine LGR5-Immunreaktivität nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in Zellen des Desmoplastischen Stromas und in Endothelzellen der Tumorgefäße vorkommt (Abschnitt 4.3.1.3). Um sicherzustellen, dass LGR5 nicht lediglich als Gefäßmarker fungiert, wurden vergleichende Immunfärbungen mit einem Anti-CD34-Antikörper an Serienschnitten von Kolongewebe

durchgeführt. Das CD34-Protein ist vor allem in Gefäßstrukturen und unreifen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert und dient als Endothelzellmarker. Während der CD34-Antikörper sämtliche Gefäßstrukturen zuverlässig anfärbt, zeigt die Immunhistochemie mit dem Anti-LGR5-Antikörper sowohl LGR5-immunreaktive als auch LGR5-negative Endothelzellen (Abbildung 4.19). Somit bestätigt sich, dass es sich bei LGR5 nicht um einen generellen Marker von Gefäßendothelien handelt.

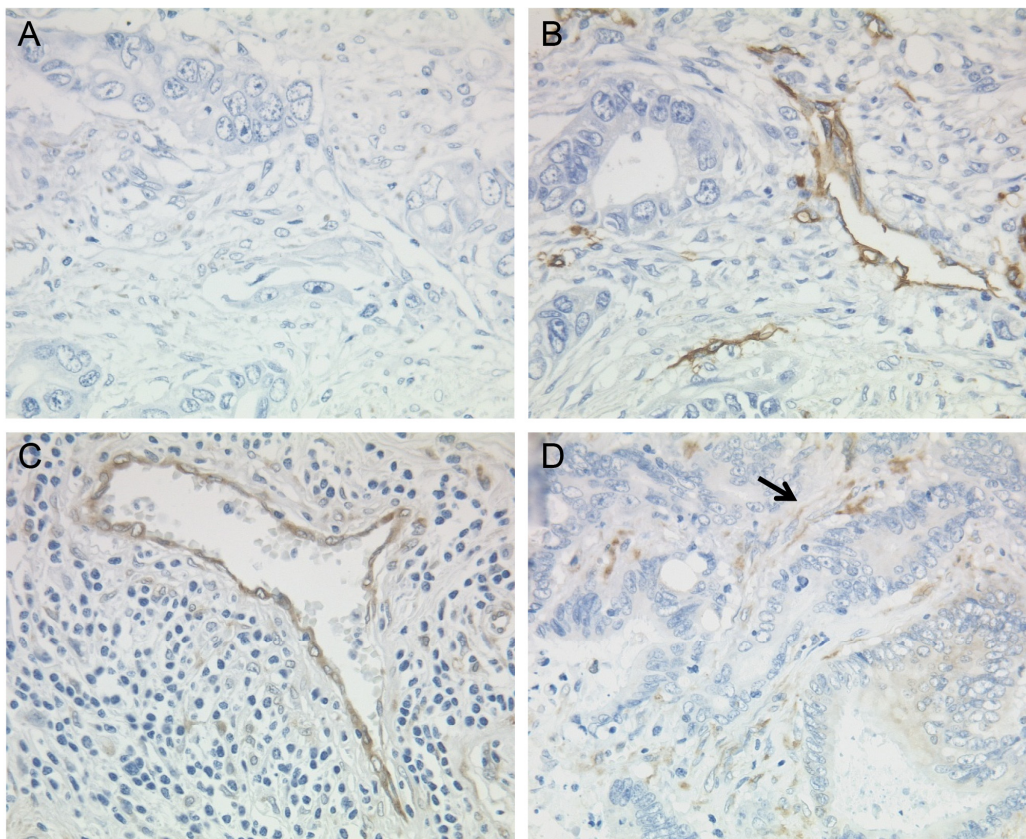


Abbildung 4.19 Färbungsmuster von LGR5 in Endothel- und Stromazellen.

Im Kolongewebe wird eine unterschiedliche LGR5-Expression der Endothelzellen beobachtet: Durch den Nachweis des Gefäßmarkers CD34 (B) können in aufeinanderfolgenden Serienschnitten LGR5-immunonegative Endothelzellen (A) identifiziert werden. Dagegen ist in einem Kolonkarzinomfall eine starke endotheliale LGR5-Immunreaktivität (C) detektierbar. LGR5 wird außerdem in Zellen des desmoplastischen Stromas exprimiert (D). Originalvergrößerung x 400.

Im Magenkarzinom existieren aktiv proliferierende LGR5-positive Zellen

Barker und Kollegen zeigten, dass LGR5-positive Zellen im Magen von Mäusen aktiv proliferieren [221]. Aus diesem Grund sollte im Folgenden untersucht werden, ob es sich bei den in dieser Studie identifizierten LGR5-positiven Zellen

des humanen Magens ebenfalls um aktiv proliferierende Zellen handelt. Zu diesem Zweck wurden Doppelfärbungen mit LGR5 und dem Proliferationsmarker Ki67 der gesunden und neoplastischen Magenschleimhaut angefertigt.

Das Ki67-Antigen wird zur Markierung sich teilender humaner Zellen verwendet und färbt die sogenannte Wachstumsfraktion an. Die Färbung mit Ki67 wird in der Routinediagnostik verwendet, um Aufschluss über die Proliferationsaktivität eines Tumors zu geben und hat somit neben der diagnostischen auch eine prognostische Relevanz [222].

In der Doppelfärbung des Normalgewebes werden etwa 10 % LGR5-positive ($Ki67^-/LGR5^+$) und 90 % Ki67-positive ($Ki67^+/LGR5^-$) Zellen detektiert, doppelt positive Zellen sind nur mit einem Anteil unter 1 % zu finden (Abbildung 5.20 A, B). Die anschließende Immunfärbung eines Magenkarzinoms zeigt zunächst einmal eine deutlich vermehrte Expression von Ki67 und LGR5 im Tumorgewebe. Neben einigen $Ki67^+/LGR5^-$ -Zellen (ca. 50 %), werden auch viele doppelt positive $Ki67^+/LGR5^+$ -Zellen detektiert (ca. 45 %). Nur ein geringer Anteil der immunreaktiven Zellen exprimiert ausschließlich LGR5 (5 %) ($Ki67^-/LGR5^+$). Der immunhistochemische Nachweis zeigt, dass im Gegensatz zum Normalgewebe im Magenkarzinom viele LGR5-positive Zellen aktiv proliferieren.

LGR5 wird nicht in den neuroendokrinen Zellen des Magens exprimiert

Es ist aus der Literatur bekannt, dass Synaptophysin die vereinzelt vorkommenden neuroendokrinen Zellen der humanen Magenschleimhaut markiert [223]. Da sich die Expressionsmuster von Synaptophysin und LGR5 im Magen stark ähneln, sollte sichergestellt werden, dass der hier verwendete Anti-LGR5-Antikörper nicht lediglich die neuroendokrinen Zellen nachweist. Aus diesem Grund wurden Serienschnitte gesunder und neoplastischer Magenschleimhaut mit einem Antikörper gegen Synaptophysin und einem Antikörper gegen LGR5 doppelgefärbt. In Gewebeschnitten der gesunden Magenschleimhaut finden sich Synaptophysin-positive Zellen dicht neben LGR5-positiven Zellen, eine Koexpression wird jedoch nicht beobachtet (Abbildung 4.20 D). Erwartungsgemäß ist im Magenkarzinomgewebe keine Synaptophysin-Expression zu beobachten (Abbildung 4.20 E). Mit diesen Ergebnissen wird bestätigt, dass der Anti-LGR5-Antikörper zwar selektiv einzelne Zellen der Magenschleimhaut anfärbt, es sich bei diesen aber nicht um die neuroendokrinen Zellen handelt.

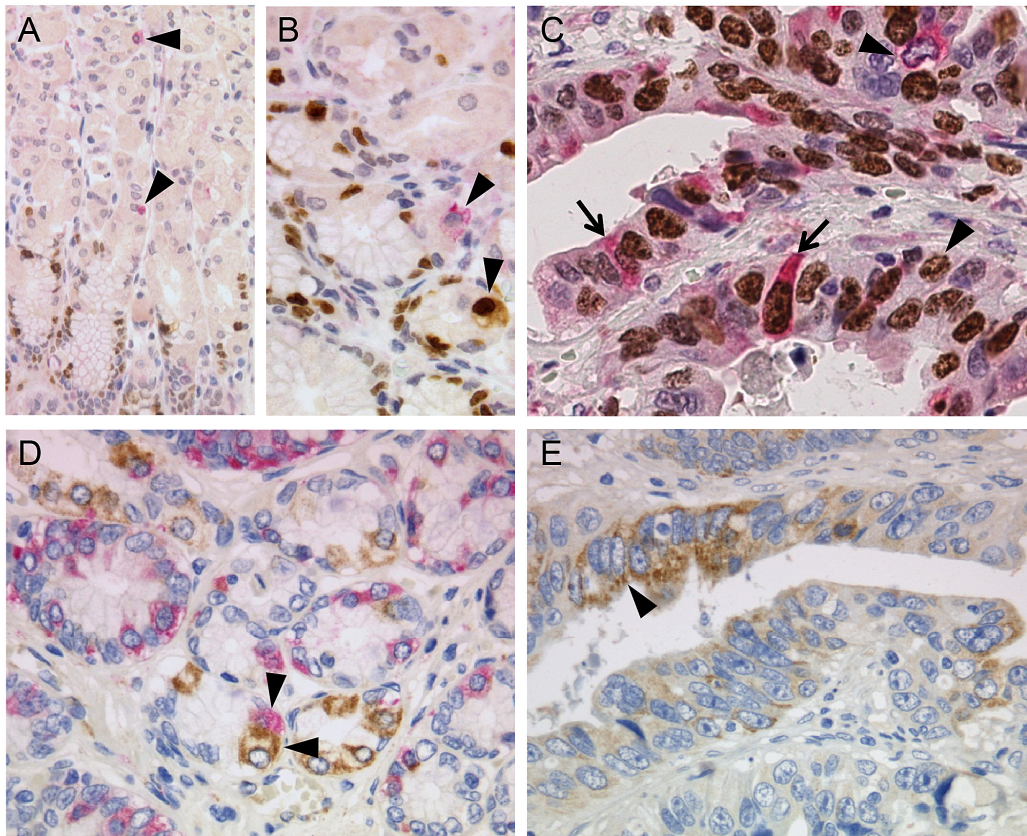


Abbildung 4.20 LGR5-Doppelfärbungen mit Ki67 und Synaptophysin.

Die Doppelfärbung von LGR5 (Rot) und Ki67 (Braun) zeigt in der gesunden Magenschleimhaut (A und B) fast nur Ki67/LGR5⁺- oder Ki67⁺/LGR5⁻-Zellen. Im Magenkarzinom (C) sind hingegen auch viele doppelt positive Zellen zu beobachten. Die unteren Bilder zeigen die Doppelfärbung von LGR5 (Braun) und Synaptophysin (Rot) an einem Serienschnitt gesunder Magenschleimhaut (D) und einem Magenkarzinom (E). Die Pfeilspitzen weisen auf einfach gefärbte Zellen hin, Pfeile markieren doppelt positive Zellen. Originalvergrößerung x 200 (A) und x 400 (B-E).

LGR5 wird mit anderen potentiellen Stammzell- bzw. Krebsstammzellmarkern im Magen koexprimiert

Haegebarth und Clevers beschreiben LGR5 als einen globalen Marker adulter Stammzellen [224]. In der Regel werden Stammzellen ebenso wie Krebsstammzellen durch die Expression von mehr als nur einem Marker identifiziert und validiert [34,225]. Um das Expressionsmuster LGR5-positiver Zellen des Magens näher zu untersuchen, wurden Doppelfärbungen von LGR5 mit anderen potentiellen Stammzell- bzw. Krebsstammzellmarkern, wie zum Beispiel ADAM17, CD44 und Musashi-1, angefertigt [133,225-231].

Die Immunfärbungen wurden an seriellen Paraffinschnitten eines Magenkarzinoms und eines gesunden, nicht entzündeten Magenschleimhautpräparats (*Sleeve*-Gastrektomie) durchgeführt.

ADAM17 wurde ausgewählt, da das Gen in vorhergehenden Studien bereits als möglicher Stammzellmarker des Magens identifiziert werden konnte [133]. Die Doppelfärbungen der gesunden Magenschleimhaut mit ADAM17 und LGR5 zeigen in etwa gleichen Anteilen wenige vereinzelte Zellen, die für den einen und/oder den anderen Marker positiv sind. Interessanterweise finden sich in der neoplastischen Magenschleimhaut überwiegend ADAM17⁻/LGR5⁺-Zellen (ca. 85 %), neben wenigen ADAM17⁺/LGR5⁻ (etwa 9 % der immunreaktiven Zellen) und ADAM17⁺/LGR5⁺-Zellen (6 %) (Abbildung 4.21 A-C).

In der Literatur wird Musashi-1 (*Msi1*) als möglicher Stammzellmarker im Darm von Mäusen, im humanen Magen [228,232] sowie als ein Krebsstammzellmarker in Tumoren beschrieben [233]. Die Doppelfärbungen zeigen, dass sich die immunreaktiven Zellen im gesunden Magengewebe und im Magenkarzinom hauptsächlich aus Msi1⁺/LGR5⁻ (etwa 80 %), in einem geringeren Maße aus doppelt positiven Msi1⁺/LGR5⁺ (15 %) und aus wenigen Msi1⁻/LGR5⁺-Zellen (ca. 5 % der immunreaktiven Zellen) zusammensetzen (Abbildung 4.21 D-F).

CD44, der Oberflächenmarker kolorektaler und gastraler Krebsstammzellen [231,234], weist schließlich ein besonderes Färbeverhalten auf. Während sich in den immunhistochemischen Doppelfärbungen der gesunden Magenschleimhaut fast ausschließlich doppelt positive CD44⁺/LGR5⁺-Zellen nachweisen lassen, werden im Magenkarzinomgewebe drei unterschiedlich gefärbte Zellpopulationen detektiert. Neben einzelnen CD44⁻/LGR5⁺-Zellen (1 %) finden sich auch viele CD44⁺/LGR5⁻ (59 %) und doppelt positive CD44⁺/LGR5⁺-Zellen (40 %) (Abbildung 4.21 G, H).

Insgesamt wird im Magenkarzinomgewebe eine Steigerung der Marker-Expression gegenüber dem Normalgewebe beobachtet (Abbildung 4.21). Die Ergebnisse der Doppelfärbungen stützen die Annahme, dass der Anti-LGR5-Antikörper Zellen mit Stammzell-spezifischen Expressionsmustern in der humanen Magenschleimhaut nachweist.

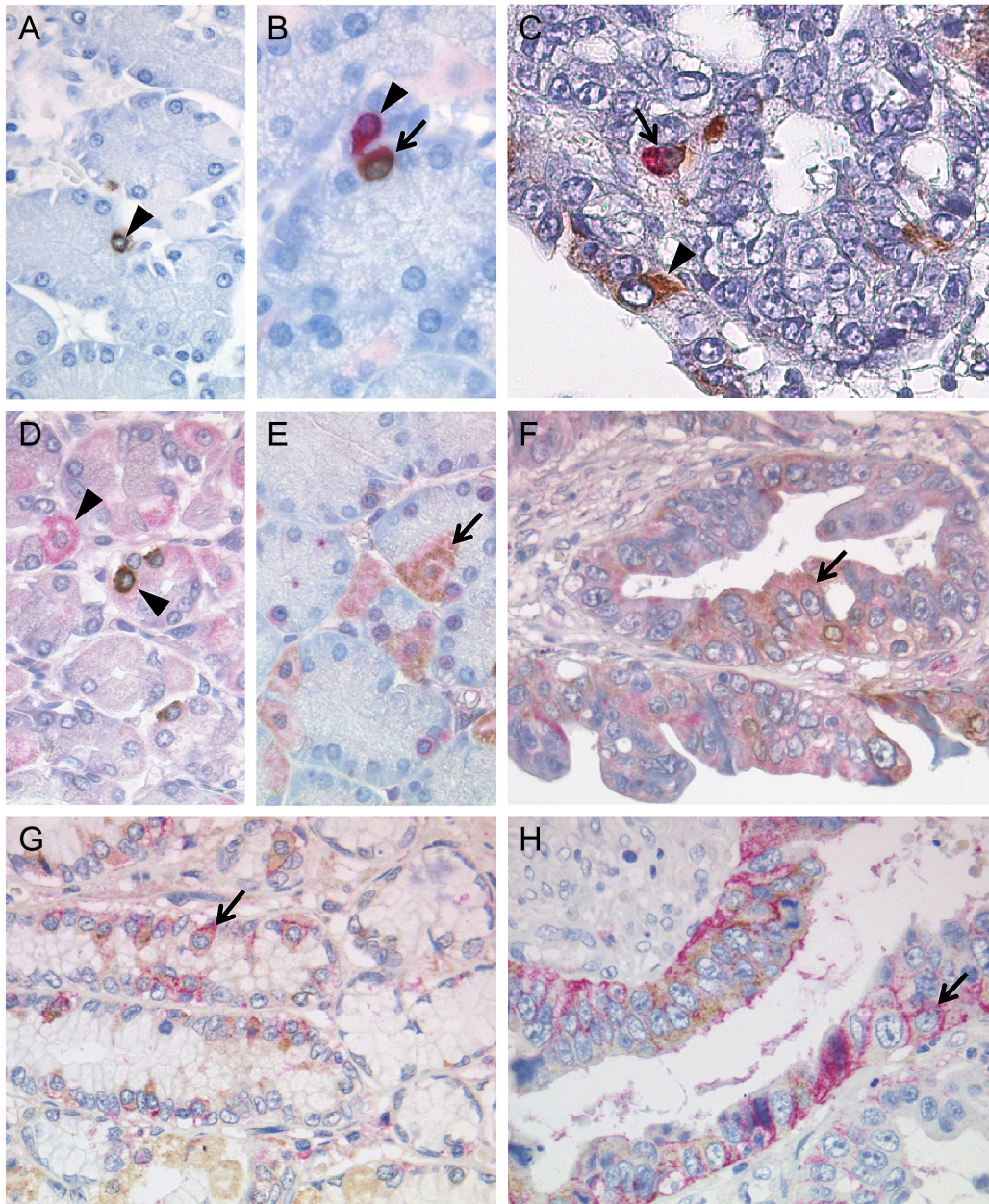


Abbildung 4.21 LGR5-Doppelfärbungen mit ADAM17, Musashi-1 und CD44.

Repräsentative Bilder immunhistochemischer Doppelfärbungen für LGR5 (Braun) und ADAM17 (Rot) an einem Serienschnitt gesunder Magenschleimhaut (A, B) und an einem Magenkarzinomfall (C). In der gesunden Magenmukosa (D, E) und dem neoplastischen Magengewebe (F), sind sowohl $Msi1^+/LGR5^-$ (Rot), $Msi1^-/LGR5^+$ (Braun, D) als auch $Msi1^+/LGR5^+$ -Zellen (Pfeil in E und F) zu sehen. Vorwiegend $CD44^+/LGR5^+$ -Zellen in den Doppelfärbungen für CD44 (Rot) und LGR5 (Braun) an gesunder (G) und neoplastischer (H) Magenschleimhaut. Doppelt positive Zellen werden durch Pfeile gekennzeichnet, Pfeilspitzen markieren einfach positiv gefärbte Zellen. Originalvergrößerung x 400 (A-H) und x 600 (B).

4.3.2 Die Lokalisation der LGR5-positiven Zellen verändert sich während der Tumorigenese

Entsprechend dem Correa-Modell entwickelt sich das Magenkarzinom sequentiell als mehrstufiger Prozess, ausgehend von der gesunden Magenschleimhaut, die zunächst in eine chronische Gastritis übergeht und über eine multifokale Atrophie in einer intestinalen Metaplasie mündet, sich weiter zur Dysplasie und schließlich zu einem invasiven Karzinom entwickelt [10,28].

Mit dem folgenden Versuchsansatz sollte die Hypothese getestet werden, dass diese zuvor erwähnten histopathologischen Veränderungen der Magenschleimhaut mit einer Umverteilung der LGR5-positiven Zellen einhergehen. Daher wurde die histoanatomische Verteilung der LGR5-positiven Zellen systematisch an 100 Patienten mit einem Magenkarzinom vom intestinalen Typ nach Laurén untersucht. Für die Analyse wurden Großflächenschnitte der Paraffingewebe verwendet, die aus dem Patientenpool des TMA-Kollektivs stammten und Bereiche von nicht-neoplastischem, metaplastischem und neoplastischem Karzinomgewebe enthielten. Die LGR5-Immunfärbungen wurden von der Pathologin Dr. Christine Böger im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, beurteilt [150].

Diese Studien zeigten, dass LGR5 nicht zufällig im Gewebe verteilt ist. Während im gesunden Magengewebe einzelne wenige Zellen im Übergangsbereich zwischen der Foveole und dem Drüsenkörper LGR5 exprimieren (Abbildung 4.22 A, E), finden sich in der intestinalen Metaplasie eine leicht erhöhte Anzahl LGR5-positiver Zellen nur noch an der Foveolenbasis (Abbildung 4.22 B, F). Im intestinalen Magenkarzinom hingegen ist die Lokalisation und Anzahl der LGR5-positiven Zellen auffallend verändert. Sie befinden sich erstmals an der Oberfläche der neoplastischen Schleimhaut (Abbildung 4.22 C), im Tumorzentrum (zwischen der Oberfläche und der Invasionsfront) und an der Invasionsfront des Karzinoms (Abbildung 4.22 G, D). Die Verteilung der LGR5-positiven Magenkarzinomzellen weist zudem charakteristische Muster auf. Zellen, die LGR5 exprimieren, treten in zusammenhängenden Gruppen unterschiedlicher Anzahl auf. Die Intensität der Immunreaktion nimmt dabei zur abluminalen Seite hin ab (Abbildung 4.22 C). Insgesamt nimmt die Anzahl und Intensität der LGR5-exprimierenden Zellen vom nicht-neoplastischen Epithel bis zum Magenkarzinom hin zu.

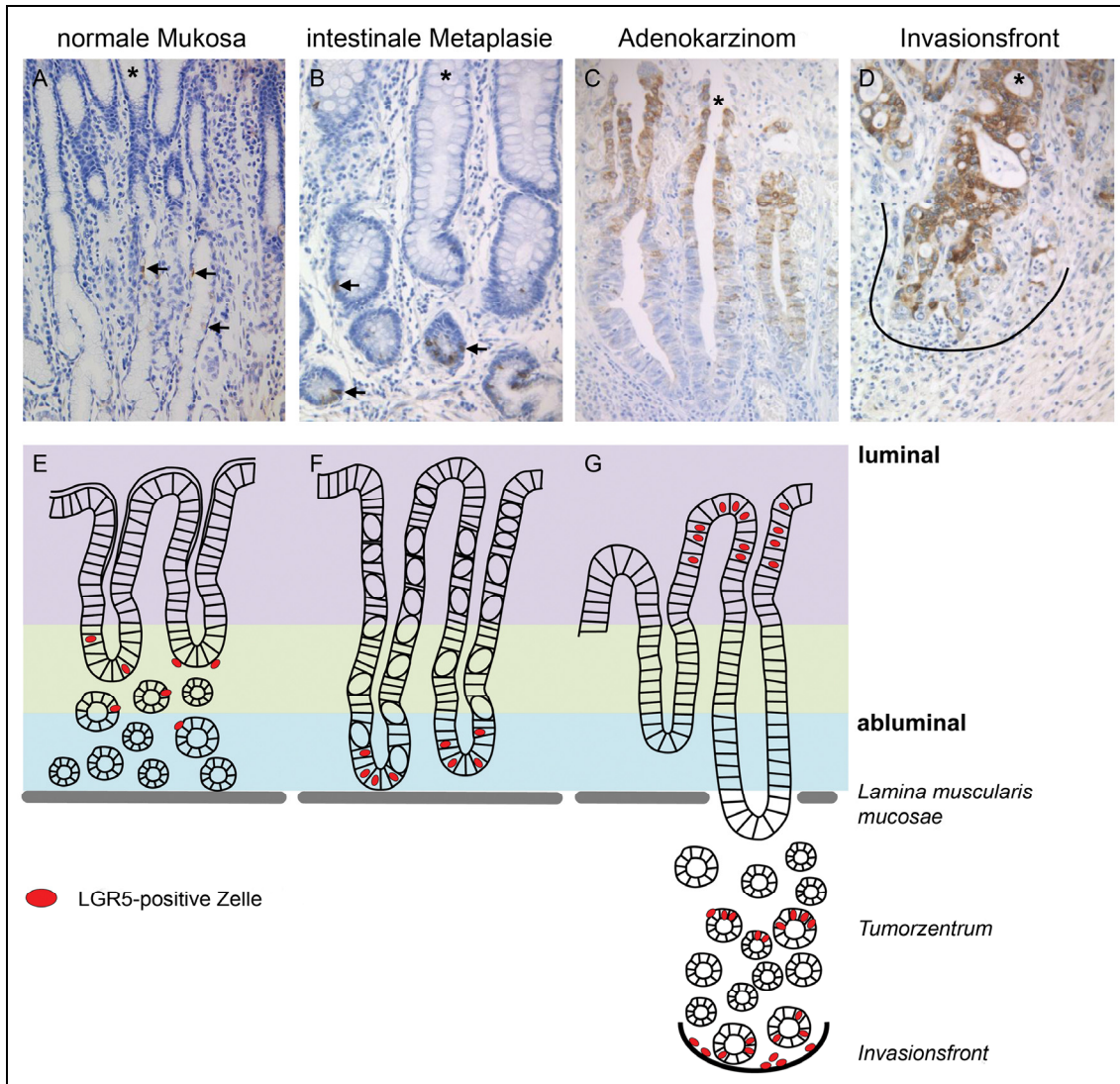


Abbildung 4.22 Die LGR5-Expression während der gastralen Karzinogenese.

Histoanatomische Verteilung LGR5-positiver Zellen in der normalen Magenschleimhaut (A, E), der intestinalen Metaplasie (B, F), einem Magenkarzinom (C, G) und der Invasionsfront des Karzinoms (D). Die oberen Felder zeigen immunhistochemische Färbungen mit dem Anti-LGR5-Antikörper an Großflächenschnitten intestinaler Magenkarzinome. Die unteren Felder stellen das dazugehörige schematische Modell der LGR5-Verteilung in den unterschiedlichen Stadien der gastralen Tumorigenese dar. LGR5-positive Zellen werden durch Pfeile angezeigt, das Sternchen (*) markiert die luminalen Seite, die Invasionsfront wird durch eine schwarze Linie gekennzeichnet. Originalvergrößerung x 200.

Die Expression von LGR5 korreliert im intestinalen Magenkarzinom mit dem lokalen Tumorwachstum und der nodalen Ausbreitung

Krebsstammzellen beeinflussen die Prognose des Patienten, und ihre Fähigkeit, Tumorzellkolonien zu bilden, ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Metastasierung und Rezidivierung des Tumors [36]. Um die Bedeutung von LGR5 für die Tumorigenese weiter zu ergründen, wurde die LGR5-Expression im Magenkarzinom des intestinalen Typs mit verschiedenen klinisch-pathologischen Patientencharakteristika in Beziehung gesetzt. Da die räumliche Verteilung LGR5-positiver Tumorzellen und somit die putative Stammzellnische wichtig für die tumorbiologische Bedeutung sein könnte, wurde jedes Kompartiment (luminale Oberfläche, Tumorzentrum, Invasionsfront) getrennt voneinander untersucht.

Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen LGR5-positiven Krebszellen im Tumorzentrum und dem lokalen Tumorwachstum (T-Kategorie, Tabelle 4.8). Die detaillierte Analyse des Patientenüberlebens zeigt, dass Patienten, deren Karzinomproben LGR5-positive Tumorzellen an der luminalen Oberfläche der Magendrüse aufweisen, länger leben als solche mit LGR5-negativen Tumorzellen. Im Gegensatz dazu leben Patienten mit LGR5-positiven Krebszellen im Tumorzentrum oder an der Invasionsfront des Tumors kürzer im Vergleich mit den entsprechenden LGR5-negativen Fällen (Abbildung 4.23 und Tabelle 4.8).

Im nächsten Schritt wurden die Patientengruppen mit LGR5-positiven Krebszellen im Tumorzentrum und/oder an der Invasionsfront vereint und gemeinsam analysiert. Hier zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der LGR5-Expression und dem lokalen Tumorwachstum (T-Kategorie), der Lymphknotenbeteiligung (N-Kategorie) sowie dem Tumorstadium (UICC) (Tabelle 4.8). Darüber hinaus leben Patienten, deren Karzinomproben LGR5-positive Krebszellen im Tumorzentrum und/oder an der Invasionsfront aufweisen, deutlich kürzer, als solche mit LGR5-negativen Tumorzellen (28.0 ± 8.6 Monate verglichen mit 54.5 ± 6.3 Monaten). Obwohl diese Differenz keine statistische Signifikanz erreicht, ist es doch interessant zu sehen, dass die Konfidenzintervalle der LGR5-positiven und -negativen Fälle kaum überlappen (Abbildung 4.23 und Tabelle 4.8).

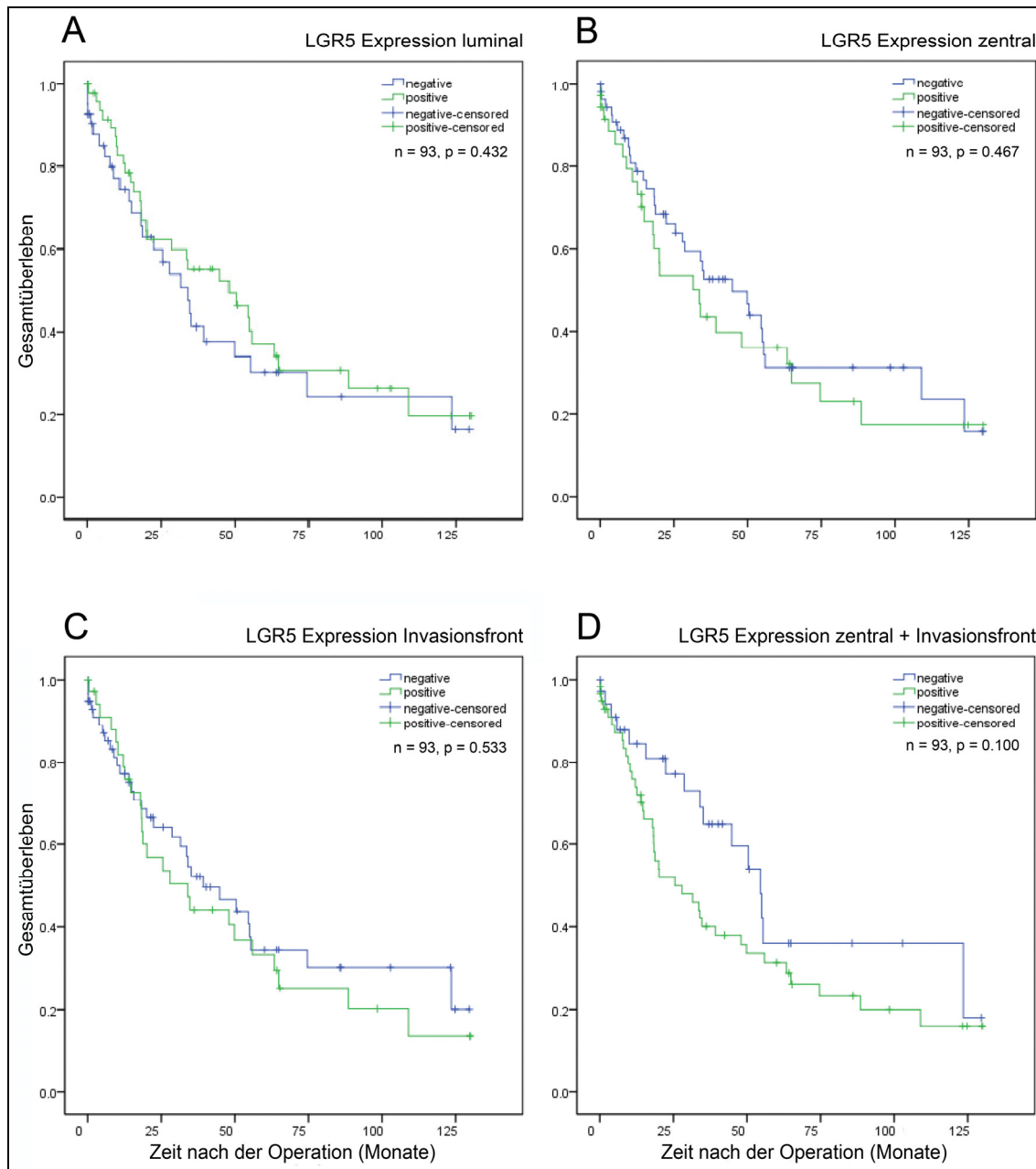


Abbildung 4.23 Einfluss der lokalen LGR5-Expression auf das Patientenüberleben.

Die Kaplan-Meier Kurven stellen das Gesamtüberleben des Validierungskollektivs entsprechend der Verteilung von LGR5-positiven Magenkarzinomzellen an der luminalen Oberfläche (A), dem Tumorzentrum (B) und der Invasionsfront (C) dar. (D) zeigt das Überleben gruppiertes Patienten mit LGR5-positiven Tumorzellen im Tumorzentrum und/oder an der Invasionsfront. Die p-Werte wurden mit dem Log-Rang-Test berechnet. n = Anzahl der Patienten.

Tabelle 4.8 Die lokale Proteinexpression von LGR5 im intestinalen Magenkarzinom.

		Luminale Oberfläche		Tumorzentrum		Invasionsfront		Tumorzentrum und Invasionsfront	
Magenkarzinom	Tot.	LGR5 neg.	LGR5 pos.	LGR5 neg.	LGR5 pos.	LGR5 neg.	LGR5 pos.	LGR5 neg.	LGR5 pos.
Patienten, n (%)	100	49 (49)	51 (51)	61 (61)	39 (39)	63 (63)	37 (37)	39 (39)	61 (61)
Alter (MW \pm SA)		69 \pm 11,8	70 \pm 9,7	69 \pm 9,9	71 \pm 11,8	69 \pm 11,3	72 \pm 9,4	68 \pm 10,4	71 \pm 10,8
Alter, n (%)									
p-Wert			0,530*		0,282*		0,050*		0,030*
< 68	37	19 (51)	18 (49)	25 (68)	12 (32)	28 (76)	9 (24)	19 (51)	18 (49)
\geq 68	57	25 (44)	32 (56)	31 (54)	26 (46)	31 (54)	26 (46)	16 (28)	41 (72)
Geschlecht, n (%)									
p-Wert			0,655*		0,063*		0,648*		0,645*
Männer	73	37 (51)	36 (49)	49 (67)	24 (33)	47 (64)	26 (36)	30 (41)	43 (59)
Frauen	27	12 (44)	15 (56)	12 (44)	15 (56)	16 (59)	11 (41)	9 (33)	18 (67)
Lokalisation, n (%)									
p-Wert			1,000*		1,000*		0,369*		0,129*
Proximal	32	16 (50)	16 (50)	20 (63)	12 (37)	18 (56)	14 (44)	9 (28)	23 (72)
Distal	65	33 (51)	32 (49)	40 (62)	25 (28)	44 (68)	21 (32)	29 (45)	36 (55)
T-Kategorie, n (%)									
p-Wert			0,402 [§]		0,004 [§]		0,889 [§]		0,021 [§]
T1a	6	4 (67)	2 (33)	5 (83)	1 (17)	4 (67)	2 (33)	4 (67)	2 (33)
T1b	30	14 (47)	16 (53)	21 (70)	9 (30)	20 (67)	10 (33)	15 (50)	15 (50)
T2	17	5 (29)	12 (71)	12 (71)	5 (29)	9 (53)	8 (47)	6 (35)	11 (65)
T3	32	16 (50)	16 (50)	19 (59)	13 (41)	19 (59)	13 (41)	11 (34)	21 (66)
T4a	11	6 (55)	5 (45)	3 (27)	8 (73)	7 (64)	4 (39)	2 (18)	9 (82)
T4b	4	4 (100)	0 (0)	1 (25)	3 (75)	4 (100)	0 (0)	1 (25)	3 (75)
N-Kategorie, n (%)									
p-Wert			0,352 [§]		0,090 [§]		0,951 [§]		0,038 [§]
N0	55	26 (47)	29 (53)	37 (67)	18 (33)	35 (64)	20 (36)	26 (47)	29 (53)
N1	15	6 (40)	9 (60)	11 (73)	4 (27)	10 (67)	5 (33)	7 (47)	8 (53)
N2	12	7 (58)	5 (42)	4 (33)	8 (67)	8 (67)	4 (33)	3 (25)	9 (75)
N3/a/b	16	10 (63)	6 (37)	8 (50)	8 (50)	10 (63)	6 (37)	3 (19)	13 (81)
UICC, n (%)									
p-Wert			0,551 [§]		0,046 [§]		0,968 [§]		0,022 [§]
IA	30	15 (50)	15 (50)	22 (73)	8 (27)	19 (63)	11 (37)	16 (53)	14 (47)
IB	13	5 (39)	8 (62)	9 (69)	4 (31)	10 (77)	3 (23)	7 (54)	6 (42)
IIA	18	8 (44)	10 (56)	11 (61)	7 (39)	9 (50)	9 (50)	5 (28)	13 (72)
IIB	7	3 (43)	4 (57)	5 (71)	2 (29)	5 (71)	2 (29)	4 (57)	3 (43)
IIIA	10	6 (60)	4 (40)	3 (30)	7 (70)	5 (50)	5 (50)	1 (10)	9 (90)
IIIB	8	3 (38)	5 (62)	7 (88)	1 (12)	5 (63)	3 (37)	4 (50)	4 (50)
IIIC	4	3 (75)	1 (25)	0 (0)	4 (4)	3 (75)	1 (25)	0 (0)	4 (100)
IV	8	5 (63)	3 (37)	4 (50)	4 (50)	6 (75)	2 (25)	2 (25)	6 (75)
Überleben									
p-Wert			0,432 [€]		0,467 [€]		0,533 [€]		0,100 [€]
n Total	93	43	50	56	37	58	35	35	58
n Ereignisse	56	26	30	32	24	31	25	16	40
Median		34,0 \pm 6,2	48,0 \pm 13,5	44,8 \pm 9,2	33,6 \pm 9,3	39,3 \pm 9,5	34,0 \pm 10,2	54,5 \pm 6,3	28,0 \pm 8,6
95 % KI		22,0-46,1	21,5-74,5	26,9-62,8	15,3-52,0	20,7-57,8	14,1-53,9	42,2-66,9	11,0-44,9

Korrelation der räumlichen Verteilung von LGR5-positiven Tumorzellen an der luminalen Oberfläche, dem Tumorzentrum und der Invasionsfront mit den klinisch-pathologischen Patientencharakteristika. P-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher (*) und dem Kendalls tau Rangkorrelationskoeffizienten (§) berechnet. Das Patientenüberleben wurde mit dem Log-Rang-Test (£, Mantel-Cox) mit einem 95 % Konfidenzintervall (KI) berechnet. LGR5 pos.: Anzahl (n) und Prozentsatz (%) der LGR5-positiven Fälle. MW = Mittelwert; SA = Standardabweichung.

4.3.3 Die Expression von LGR5 ist in verschiedenen hepato-gastrointestinalen Karzinomen erhöht

Sowohl die Plausibilitätsprüfung *in silico* als auch die umfangreichen transkriptionellen und translationalen Untersuchungen weisen darauf hin, dass LGR5 eine primäre Rolle in der gastralen Tumorigenese spielt. Initial wurde LGR5 als Stammzellmarker intestinal differenzierter Zellen beschrieben, der in murinen Stammzellen der Darmkrypten exprimiert ist [235]. Später wurde die Überexpression von LGR5 auch in zahlreichen weiteren Tumoren sowie in Kolonkarzinomzelllinien berichtet [66,206,213-215].

Aus diesem Grund sollte in einer anschließenden Studie die Expression von LGR5 systematisch an einem umfangreichen Kollektiv hepato-gastrointestinaler Karzinome analysiert werden. Die Expression von LGR5 wurde auf transkriptioneller (Real-time RT-PCR) und translationaler (Immunhistochemie) Ebene in Tumoren aus sechs verschiedenen Lokalisationen (Ösophagus, Magen, Pankreas, Leber, Kolon und Rektum) von 127 Patienten im Vergleich zum korrespondierenden nicht-neoplastischen Gewebe untersucht.

4.3.3.1 Analyse der mRNA-Expression von LGR5 in hepato-gastrointestinalem Gewebe

Die Real-time RT-PCR Analyse wurde an einer Serie von 105 Patienten durchgeführt und umfasste sowohl Tumor- als auch das zugehörige Nicht-Tumorgewebe eines Patienten. In der Studie wurden acht verschiedene Tumortypen berücksichtigt: Ösophagus (neun Patienten mit einem Barrett-Adenokarzinom und sieben mit einem Plattenepithelkarzinom), Magen (19 intestinale und 21 diffuse Fälle), Leber (vier hepatozelluläre Karzinome, sechs Cholangiokarzinome), Kolon (19) und Rektum (20).

Die Analyse der mRNA-Expression zeigt, dass LGR5 in Adenokarzinomen des Ösophagus ($p = 0,007$), Magens (intestinal: $p = 0,006$) (diffus: $p = 0,013$),

der Leber (CC: $p = 0,022$) sowie des Kolons ($p < 0,001$) und Rektums ($p = 0,002$) im Vergleich mit dem zugehörigen nicht-neoplastischen Gewebe signifikant differentiell exprimiert ist (Abbildung 4.24, Tabelle 4.9). Im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (SCC, $p = 0,503$) und dem hepatozellulären Karzinom (HCC, $p = 0,545$) ergibt der Mittelwertvergleich mit dem doppelseitigen t-Test für gepaarte Stichproben jedoch keine Signifikanzen (Abbildung 4.24 B und E, Tabelle 4.9). Während Tumorgewebe vom Ösophagus, Magen, HCC, Kolon und Rektum eine höhere mRNA-Expression als das zugehörige Normalgewebe aufweist, wird LGR5 im Cholangiokarzinom gegenüber dem Normalgewebe vermindert exprimiert (Abbildung 4.24).

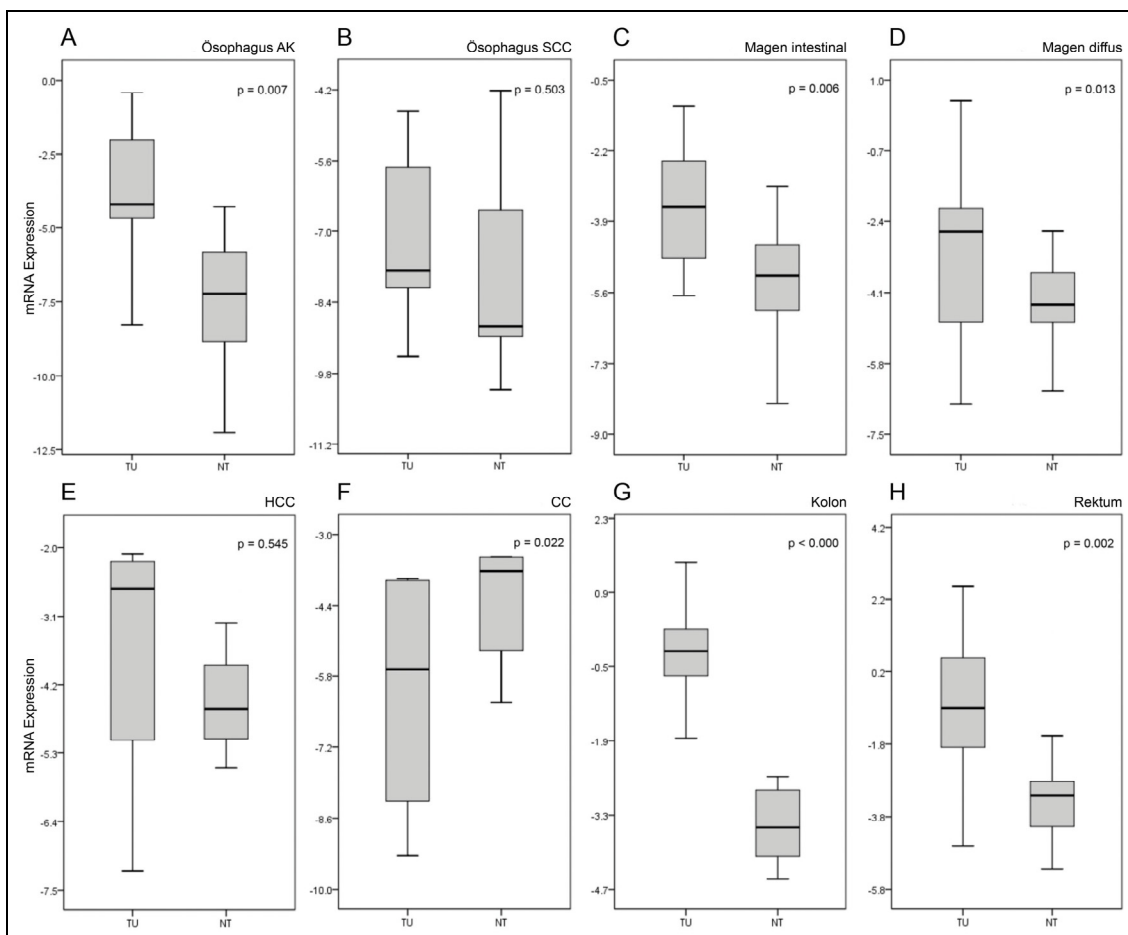


Abbildung 4.24 Boxplots der LGR5-Expression in hepato-gastrointestinalem Gewebe.

Die Boxplots zeigen die generelle Verteilung von LGR5 mRNA zwischen neoplastischem und angrenzenden nicht-neoplastischem Gewebe im (A) Barrett-Adenokarzinom (AK) und (B) Plattenepithelkarzinom (SCC) des Ösophagus, (C) dem Magenkarzinom des intestinalen (D) und diffusen Typs, (E) dem hepatozellulären Karzinom (HCC), (F) Cholangiokarzinom (CC) sowie dem (G) Kolon- und (H) Rektumkarzinom.

4.3.3.2 Untersuchung der Proteinexpression von LGR5 in hepato-gastrointestinalem Gewebe

Die Expression und histoanatomische Verteilung des LGR5-Proteins wurde anschließend immunhistochemisch an einer Serie von 127 Gewebeschnitten des Hepato-Gastrointestinaltrakts untersucht. Die Färbungen wurden von Diana Petke im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit angefertigt und von der Pathologin Dr. Viktoria Warneke am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel beurteilt [150]. Auch hier standen Tumor- und zugehöriges Nicht-Tumorgewebe desselben Patienten vom Ösophagus (14 Patienten), Magen (32), Pankreas (17), Kolon (20), Rektum (20) und von der Leber (24) zur Verfügung. Von 105 Patienten aus diesem Kollektiv waren außerdem Frischgewebeproben vorhanden, die auch auf transkriptioneller Ebene untersucht wurden (siehe Abschnitt 4.3.3.1).

Nimmt man alle Entitäten zusammen, so kann im vorliegenden Kollektiv eine LGR5-Expression in 65 (51 %) Normalgewebe- und 103 (81 %) Karzinomgewebeproben detektiert werden. Die Immunfärbungen zeigen, dass LGR5 vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert ist, sporadisch aber auch an der Zell- oder Kernmembran auftritt (Abbildung 4.26 D und E).

Zudem wird LGR5 nicht nur von Tumorzellen, sondern von allen Gewebekomponenten wie z. B. Stromazellen, Endothelzellen oder den Zellen des nicht-neoplastischen Epithels exprimiert (siehe Abbildung 4.19). Eine LGR5-Immunreaktivität der Stromazellen kann in 49 (39 %) der untersuchten Normalgewebeproben und in 80 (63 %) aller Karzinomgewebeproben beobachtet werden. Eine endotheliale Immunreaktion tritt in 42 (33 %) Fällen auf.

Im nicht-neoplastischen Epithel wird LGR5 von wenigen vereinzelt Zellen nahe der Basalmembran der Magenschleimhaut (Abbildung 4.22), der Pankreasgänge und der kolorektalen Krypten exprimiert (Abbildung 4.26). Im Plattenepithel des Ösophagus (Abbildung 4.25 A), den intrahepatischen Gallengängen (Abbildung 4.25 F) und den Hepatozyten (Abbildung 4.25 D) wird LGR5 nicht exprimiert.

Mit Ausnahme vom Ösophagus ist der Mittelwert des IRS in allen hepato-gastrointestinalen Karzinomen signifikant höher als im korrespondierenden Normalgewebe (Tabelle 4.9). Diese Ergebnisse unterstützen die auf transkriptioneller Ebene gewonnenen Daten.

Tabelle 4.9 LGR5-Expression im hepato-gastrointestinalen Patientenkollektiv.

	Quantitative Real-time RT-PCR				Immunhistochemie							
	Tot.	Alter, MW (Min-Max)	M:F	p- Wert*	Tot.	Alter, MW (Min-Max)	M:F	TU		NT		p- Wert†
								LGR5 ⁺ n (%)	IRS (MW)	LGR5 ⁺ n (%)	IRS (MW)	
	105				127							
Ösophagus AK	9	63 (51-74)	4:5	0,007	8	64 (51-78)	5:3	5 (63)	2,83	2 (25)	0,75	0,140
Ösophagus SCC	7	64 (48-73)	4:3	0,503	6	66 (48-73)	4:2	3 (50)	2,00	2 (33)	1,00	0,317
Magen intestinal	19	69 (54-85)	13:6	0,006	13	67 (54-85)	8:5	12 (92)	3,54	9 (69)	2,00	0,020
Magen diffus	21	68 (43-82)	11:10	0,013	19	69 (55-82)	9:10	17 (90)	3,00	6 (32)	0,95	0,003
HCC	4	62 (43-73)	4:0	0,545	16	59 (17-82)	8:8	8 (50)	2,19	5 (31)	0,88	0,028
CC	6	63 (46-77)	4:2	0,022	8	64 (46-77)	4:4	6 (75)	2,38	0 (0)	0,00	0,026
Pankreas	0	n.d.	n.d.	n.d.	17	62 (50-78)	7:10	17 (100)	4,29	12 (71)	2,47	0,013
Kolon	19	70 (45-85)	9:10	<0,001	20	74 (45-89)	9:11	18 (90)	3,80	12 (60)	1,65	<0,001
Rektum	20	64 (40-84)	9:11	0,002	20	64 (40-84)	10:10	17 (85)	3,90	17 (85)	2,35	0,011

Statistische Auswertung der differentiellen Expression von LGR5 auf transkriptioneller (Real-time RT-PCR) und translationaler (Immunhistochemie) Ebene. P-Werte wurden mit dem zweiseitigen t-Test für gepaarte Stichproben (*) oder dem Wilcoxon Test (†) berechnet. Die immunhistochemischen Daten stellen die Gesamtexpression von LGR5 im Tumor- (TU) und dem dazugehörigen Nicht-Tumorgewebe (NT) dar. Immunreaktivitätsscores (IRS) wurden nur für Tumorzellen berechnet. AK = Adenokarzinom. SCC = Plattenepithelkarzinom. HCC = hepatozelluläres Karzinom. CC = Cholangiokarzinom. n.d. = nicht detektiert. M = Männer. F = Frauen. MW = Mittelwert. Min = Minimum. Max = Maximum. LGR5⁺ = Anzahl (n) und Prozentsatz (%) LGR5-positiver Fälle.

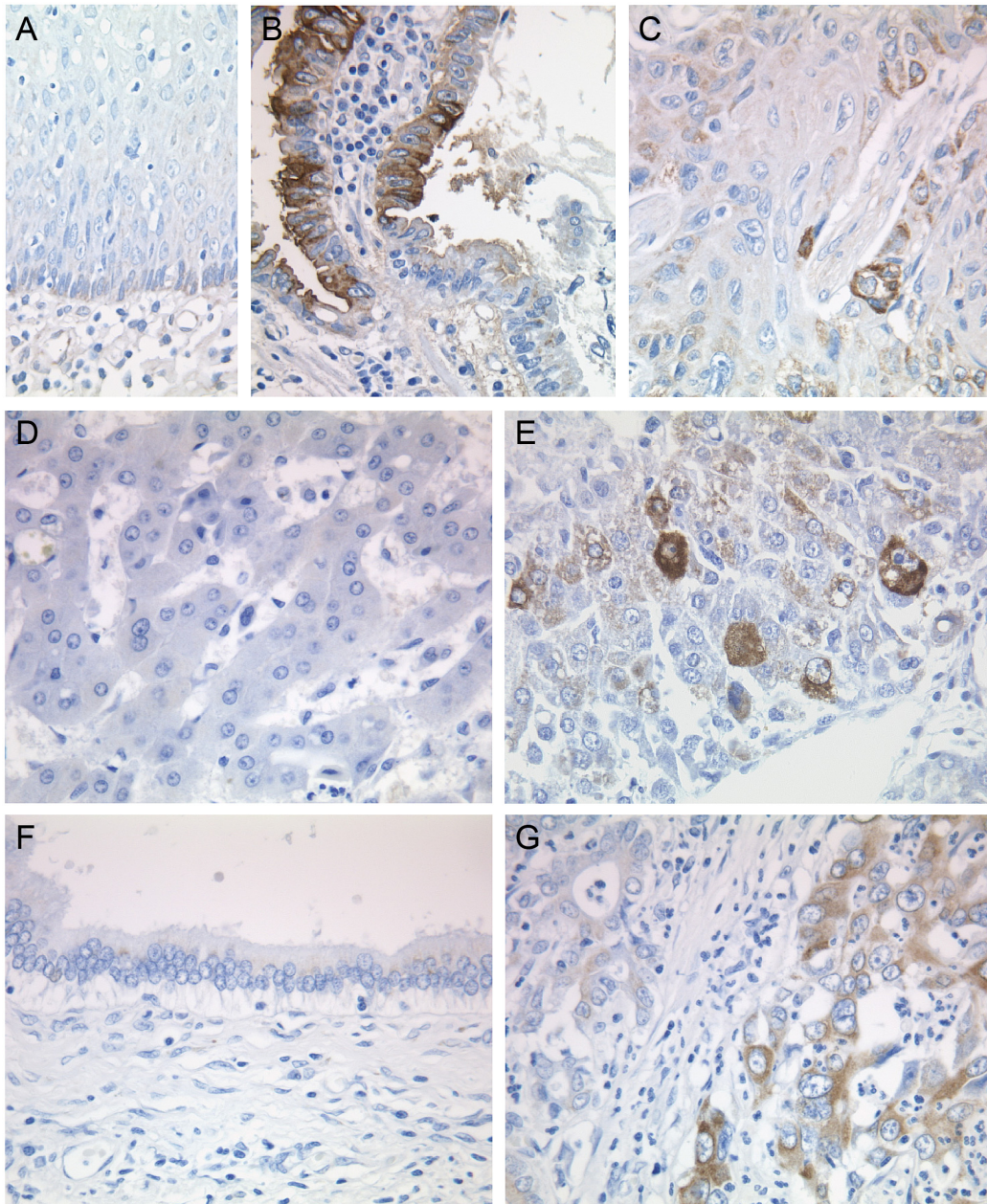


Abbildung 4.25 LGR5-Immunreaktivität in hepato-gastrointestinalem Gewebe.

Expression von LGR5 im gesunden Gewebe des Ösophagus (A) verglichen mit einem Adenokarzinom (B) und einem Plattenepithelkarzinom (C). Im Vergleich außerdem die LGR5-Expression der normalen Leber (D) mit dem hepatozellulären Karzinom (E) sowie in gesundem (F) und malignem (G) Epithel des Gallengangs. Originalvergrößerung x 400.

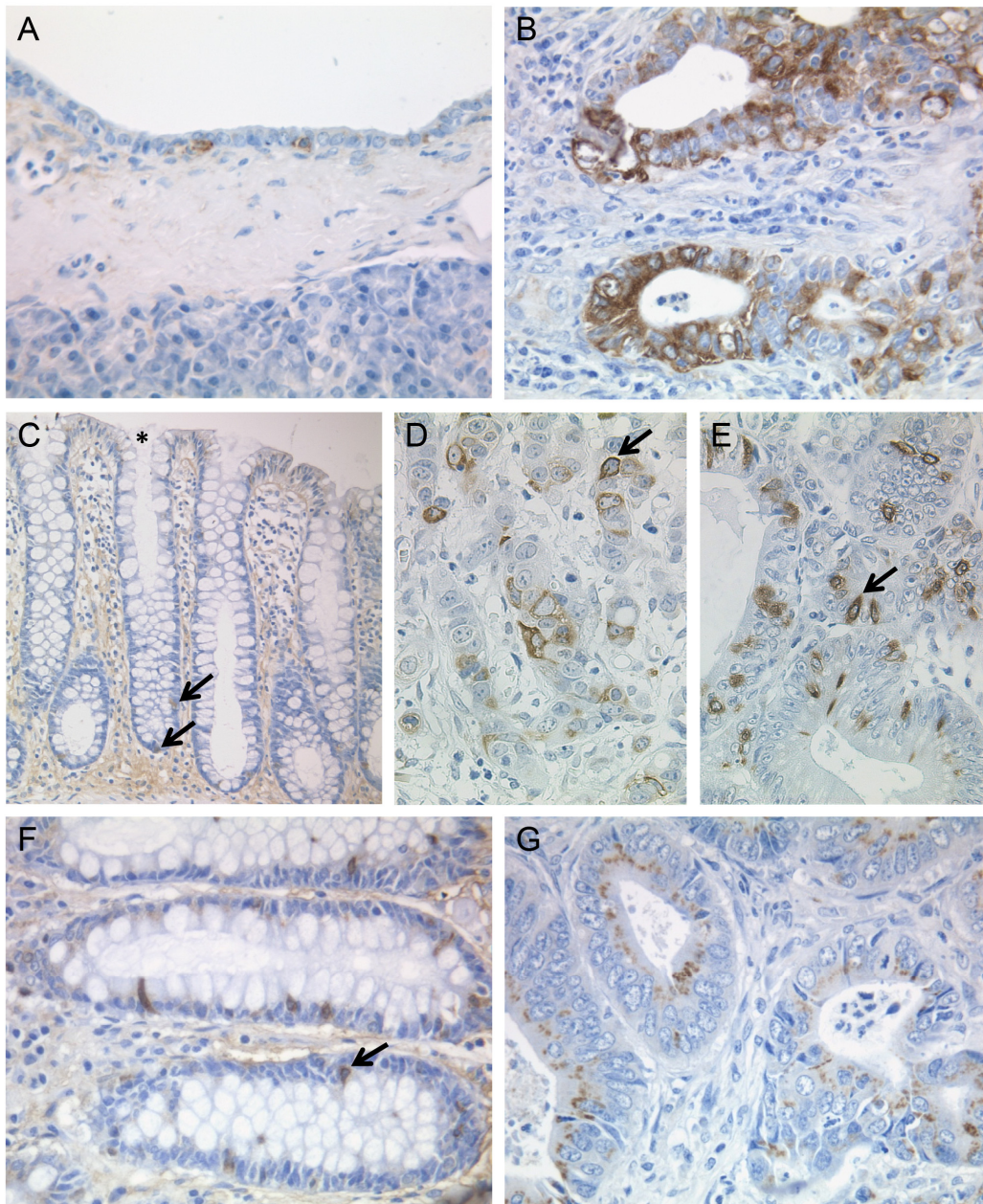


Abbildung 4.26 LGR5-Immunreaktivität in hepato-gastrointestinalem Gewebe.

Expression von LGR5 in nicht-neoplastischem (A) und neoplastischem Pankreasgewebe (B). Die nächste Bildreihe zeigt normale Kolonschleimhaut mit LGR5-positiven Zellen (C) sowie eine membranäre (D) und zytoplasmatische (E) LGR5-Färbung in den dazugehörigen Kolonkarzinomzellen. Des Weiteren wird die LGR5-Expression im gesunden Rektum (F) und einem Rektumkarzinom (G) dargestellt. Die Pfeile markieren verstreute immunreaktive Zellen. Das Sternchen (*) kennzeichnet die luminalen Seite. Originalvergrößerung x 400.

4.3.4 Die funktionelle Relevanz von LGR5 im Magenkarzinom

Im Verlauf dieser Studie konnte auf mRNA- und Proteinebene belegt werden, dass LGR5 eine wichtige Bedeutung in der hepato-gastrointestinalen und insbesondere in der gastralen Tumorigenese hat. Als Konsequenz daraus sollte nun auch die Funktion von LGR5 in zellphysiologischen und -pathologischen Prozessen des Magenkarzinoms näher beleuchtet werden.

Überexpression von LGR5 in Magenkarzinomzellen

Zunächst wurde die LGR5-Genexpression mit einem Überexpressionskonstrukt erhöht, um die daraus resultierenden Effekte auf die Zellproliferation, Migration, Invasion und Apoptose von Magenkarzinomzellen analysieren zu können. Die Magenkarzinomzelllinien MKN45 und MKN74 wurden jeweils entweder mit dem Überexpressionskonstrukt aus LGR5 cDNA, kloniert in den Vektor pcDNA3.1(-), oder aber allein mit dem Leervektor pcDNA3.1(-) stabil transfiziert. Mithilfe des Western Blots (Abbildung 4.17) und der Immunzytochemie (Abbildung 4.16) wurde die erfolgreiche Transfektion auf Proteinebene verifiziert.

Die Expressionslevel der LGR5 mRNA wurden anschließend in allen Transfektanten mittels Real-time RT-PCR bestimmt. Beide Zelllinien exprimieren geringe Mengen endogenes LGR5. Nach der stabilen Transfektion mit dem Überexpressionskonstrukt kann in der Zelllinie MKN45 eine 45-fache Erhöhung und in der Zelllinie MKN74 sogar eine über 60.700-fache Erhöhung der mRNA-Expression von LGR5 gegenüber den Leervektor-transfizierten Zellen gemessen werden (siehe Abbildung 4.27).

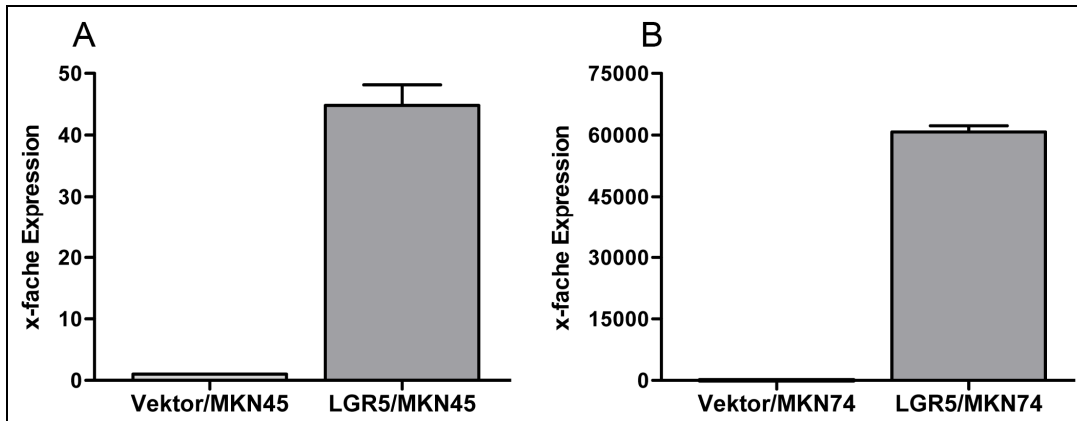


Abbildung 4.27 mRNA-Expression von LGR5 in Magenkarzinomzelllinien.

Quantifizierung der mRNA-Expression von LGR5 mittels Real-time RT-PCR in MKN45 und MKN74. Die mit dem Leervektor pcDNA3.1(-) transfizierten Magenkarzinomzellen (hellgrau) zeigen das Expressionslevel von endogenem LGR5 (Vektor/MKN45 und Vektor/MKN74). Dagegen ist eine starke Überexpression von LGR5 in den stabil transfizierten Zellen zu erkennen (dunkelgrau, LGR5/MKN45 und LGR5/MKN74).

Die Überexpression von LGR5 steigert die Proliferationsrate der Magenkarzinomzellen

Eine wichtige Eigenschaft von Tumorzellen ist ihre gesteigerte Proliferationsfähigkeit, die zu einem schnellen Tumorstadium führt [6].

Doppelfärbungen mit dem Proliferationsmarker Ki67 zeigen, dass einige LGR5-exprimierende Tumorzellen in der Lage sind, aktiv zu proliferieren (siehe Abbildung 4.20 C). Inwieweit die Expression von LGR5 selbst Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Magenkarzinomzellen nimmt, sollte nun näher analysiert werden. Nach der stabilen Transfektion mit dem Überexpressionskonstrukt bzw. der Leervektor-Kontrolle wurde das Wachstumsverhalten der Magenkarzinomzelllinien über einen Zeitraum von vier Tagen mittels MTT-Assay untersucht.

Für beide Zelllinien zeigt sich ein deutlicher Effekt der LGR5-Überexpression auf das Wachstumsverhalten. LGR5-transfizierte MKN45-Zellen (LGR5/MKN45) weisen im Durchschnitt eine doppelt so hohe Proliferationsrate und eine signifikant kürzere Verdopplungszeit im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Zellen auf (Vektor/MKN45, Abbildung 4.28 A und C). Auch bei der Zelllinie MKN74 proliferieren die LGR5/MKN74-Zellen im Schnitt um 24 % stärker als die Leervektor-Kontrollen (Vektor/MKN74) und zeigen eine kürzere Verdopplungszeit (Abbildung 4.28 B und D).

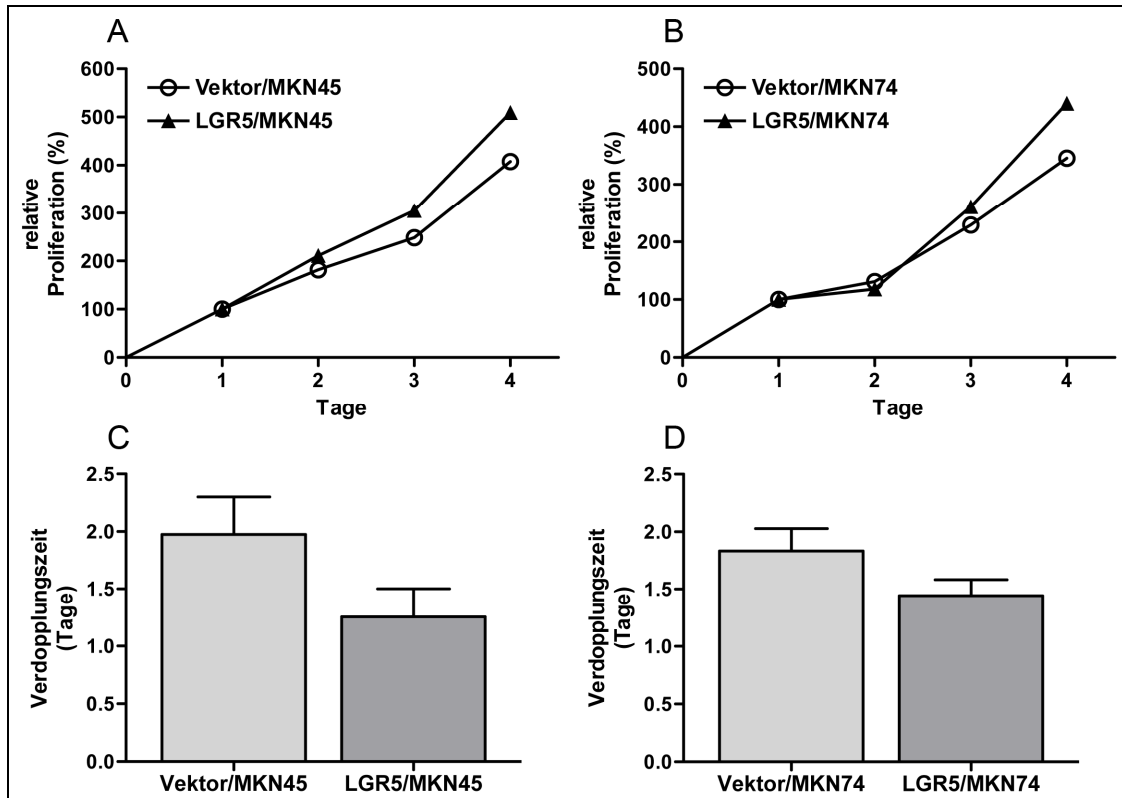


Abbildung 4.28 Proliferation der Zelllinien MKN45 und MKN74.

Die Proliferation von Leervektor-transfizierten Zellen wurde gegenüber LGR5-überexprimierenden LGR5/MKN45- (A) und LGR5/MKN74-Zellen (B) im MTT-Assay bestimmt (dargestellt ist jeweils nur ein Einzelversuch). Die unteren Diagramme zeigen die durchschnittliche Dauer bis zur Verdopplung der Zellzahl von Vektor/MKN45- und Vektor/MKN74-Zellen (C und D, hellgrauer Balken) im Vergleich zu LGR5/MKN45 und LGR5/MKN74-Zellen (C und D, dunkelgrauer Balken).

LGR5/MKN45-Zellklone haben ein verändertes Wachstumsmuster

Die Zelllinie MKN45 wächst teilweise adhärent als Monolayer, aber auch in Form von Zellclustern in Suspension. Nach der stabilen Transfektion mit dem LGR5-Überexpressionskonstrukt zeigen diese Zellklone ein optisch verändertes Wachstumsmuster. Während Leervektor-transfizierte MKN45-Zellen verstärkt in Gruppen und Zellclustern wachsen, zeigen die LGR5-überexprimierenden LGR5/MKN45-Zellen ein gleichmäßigeres Wachstum in Form eines Monolayers (Abbildung 4.29 A und B).

Bei der Zelllinie MKN74 kann keine Veränderung des Wachstumsmusters nach Überexpression von LGR5 festgestellt werden (Abbildung 4.29 C und D).

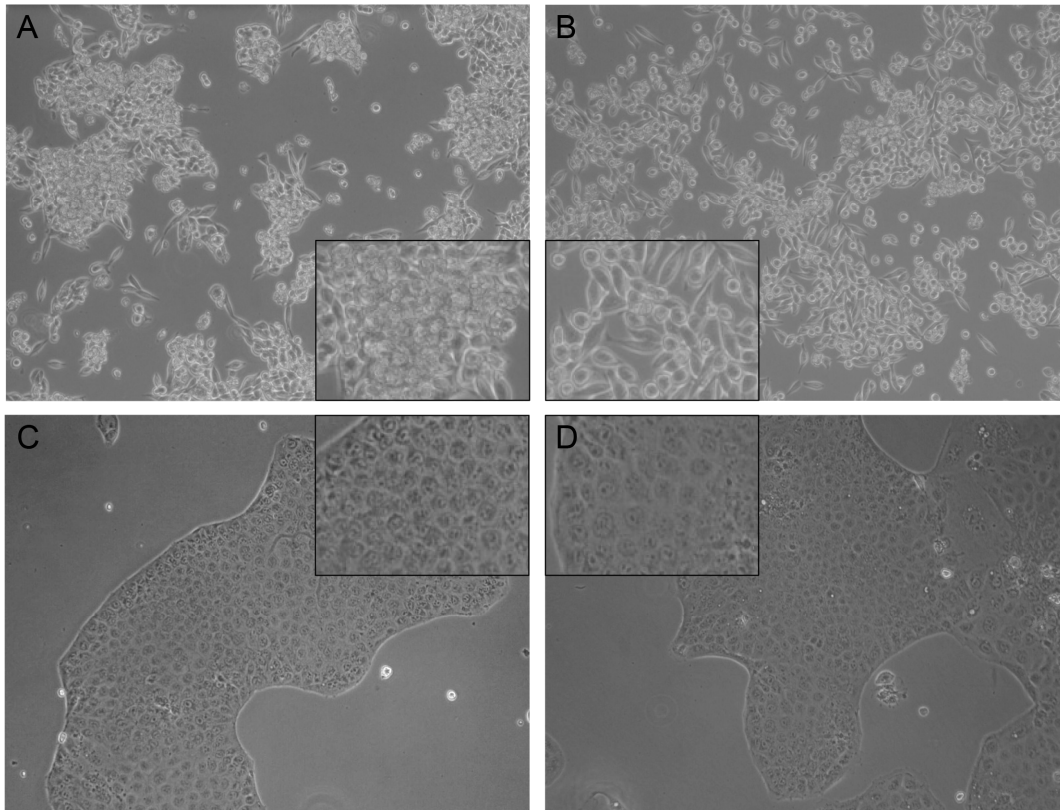


Abbildung 4.29 Wachstumsmuster der Zelllinien MKN45 und MKN74.

Während Vektor/MKN45-Zellen (A) vermehrt als Zellcluster in Erscheinung treten, weisen LGR5/MKN45-Zellen (B) ein gleichmäßigeres Wachstum auf. Vektor/MKN74 (C) und LGR5/MKN74-Zellen (D) zeigen keinen Unterschied in ihrem Wachstumsmuster. Originalvergrößerung x 10. *Insets* mit höherer Vergrößerung.

LGR5 fördert die Migration von Magenkarzinomzellen

Der Metastasierungsprozess stellt eine Hauptursache für das Versterben von Krebspatienten dar und wird entscheidend durch die koordinierte Migration und Invasion von Tumorzellen bestimmt [36,236]. Mithilfe des Wundheilungsassays (*Scratch Assay*) wurde der Einfluss der LGR5-Überexpression auf die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen untersucht. Der Versuchsansatz unter Zugabe von Serum führte zu den gleichen Ergebnissen, wie unter Serum-freien Bedingungen. In beiden Zelllinien migrieren die LGR5-überexprimierenden Zellen schneller als die Leervektor-Kontrollen. Bei LGR5/MKN45-Zellen ist die Migrationsfähigkeit sogar hoch signifikant um das 2,5-fache gegenüber den Kontrollzellen (Vektor/MKN45) erhöht (Abbildung 4.30 A). Auch Zellen der Linie MKN74 mit erhöhter LGR5-Expression zeigen einen 1,2-mal schnelleren Wundverschluss im Vergleich zu den Kontrollzellen (Vektor/MKN74).

Dieser Wachstumsunterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 4.30 B). Die gesteigerte Expression von LGR5 hat in diesem Versuchsansatz folglich einen migrationsfördernden Effekt auf die Magenkarzinomzellen.

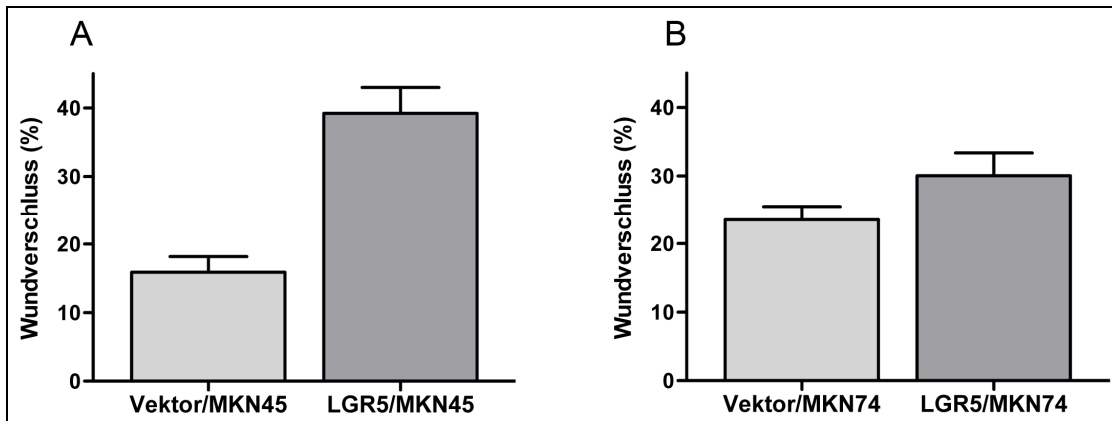


Abbildung 4.30 Migration von MKN45 und MKN74 im Wundheilungsassay.

Die Balkendiagramme zeigen den prozentualen Wundverschluss in MKN45- (A) und MKN74-Zellen (B) nach 5 Tagen. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm imageJ. Hellgraue Balken stellen die Vektor-transfizierten Zellen, dunkelgraue Balken die LGR5-transfizierten Zellen dar.

Die Überexpression von LGR5 erhöht die Invasivität der Karzinomzellen

Neben Proliferation und Migration erfordert die Tumormetastasierung außerdem die Invasion der Tumorzellen durch eine extrazelluläre Matrix und den Eintritt in die Zirkulation (Blut- oder Lymphgefäße) [236].

Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Studie auch der Einfluss von LGR5 auf die Invasionsfähigkeit untersucht. MKN45- und MKN74-Zellen, deren LGR5-Expression durch stabile Transfektion mit einem LGR5-Expressionskonstrukt gesteigert wurde, zeigen eine erhöhte Invasivität im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 4.31). LGR5/MKN45-Zellen sind im Schnitt doppelt so invasiv wie die Leervektor-transfizierten Zellen (Vektor/MKN45). Auch in diesem Versuch fällt der Effekt in der Zelllinie MKN74 etwas geringer aus. Dennoch ist eine um 36 % höhere Invasivität von LGR5-überexprimierenden gegenüber Leervektor-transfizierten MKN74-Zellen messbar (Abbildung 4.31 B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass LGR5 möglicherweise die Invasivität von Magenkarzinomzellen fördert.

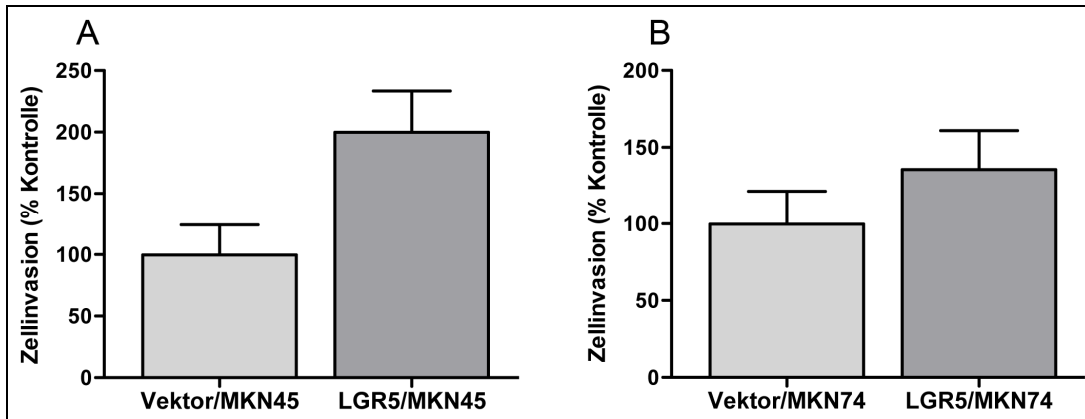


Abbildung 4.31 Invasion von MKN45 und MKN74 im Matrigel-Invasionsassay.

Die Balkendiagramme zeigen die Zellinvasion von LGR5/MKN45- (A) und LGR5/MKN74-Zellen (B, jeweils dunkelgraue Balken) prozentual zu den Leervektor-transfizierten Kontrollen (hellgraue Balken).

Die Überexpression von LGR5 vermindert die Sensitivität gegenüber Apoptose-induzierenden Medikamenten

Als natürliches Hindernis für die Entstehung von Krebs gilt der programmierte Zelltod durch Apoptose. In Krebszellen wird Apoptose normalerweise als Reaktion auf physiologischen Stress während der Tumorigenese oder durch chemotherapeutische Behandlung ausgelöst. Krebsstammzellen sind jedoch resistenter gegenüber Chemotherapeutika und besitzen zudem die Fähigkeit, den Tumor nach Beendigung der Therapie erneut zu bilden [6].

Die Magenkarzinomzellen wurden zunächst mit dem Apoptose-Induktor und Chemotherapeutikum Mitomycin C (MMC) [148] behandelt, um anschließend die Apoptoserate zu messen. Die Überexpression von LGR5 führt in LGR5/MKN45- und LGR5/MKN74-Zellen zu einer verminderten Sensitivität gegenüber Apoptose-induzierenden Medikamenten, detektierbar durch eine geringere Caspase-3/7-Aktivität. In den Vektor/MKN45 ist eine um 34 % höhere Caspase-3/7-Aktivität gegenüber den LGR5-transfizierten Zellen messbar (Abbildung 4.32 A). Die Magenkarzinomzelllinie MKN74 zeigt in den Leervektor-Kontrollen nur eine etwa 6 % höhere Aktivität der Caspase-3 und -7 im Vergleich zu den LGR5/MKN74-Zellen (siehe Abbildung 4.32 B). Die Expression von LGR5 hat also möglicherweise einen Einfluss auf die Apoptose-Resistenz gegenüber Chemotherapeutika.

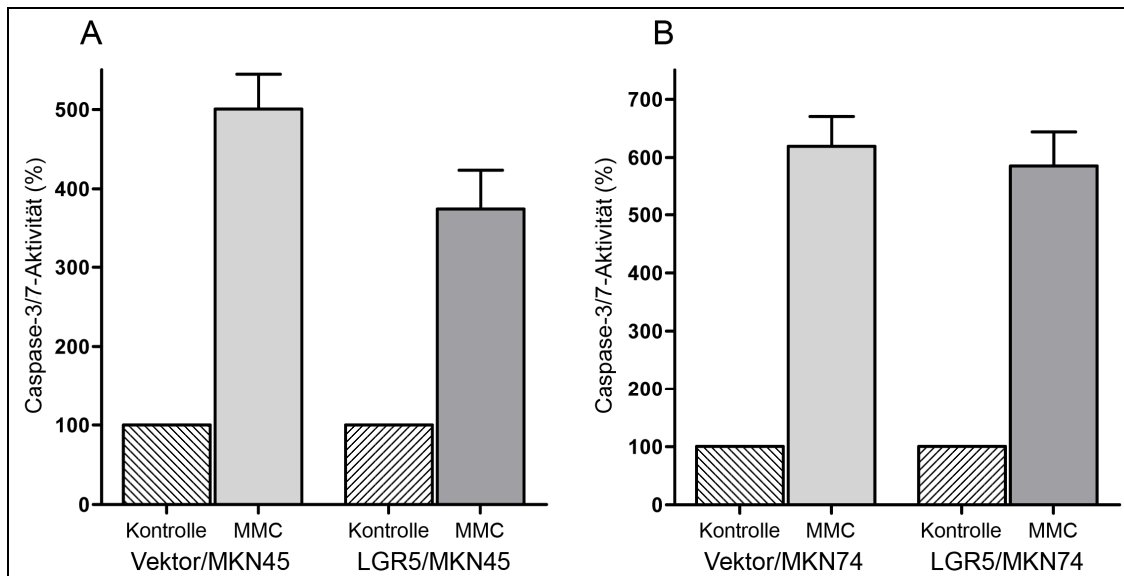


Abbildung 4.32 Apoptose von MKN45 und MKN74 im Caspase-3/7-Assay.

Die Diagramme stellen die Aktivität der Caspase-3 und -7 in MMC-behandelten MKN45 (A) und MKN74-Zellen (B) prozentual im Verhältnis zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen dar. Die LGR5/MKN45 und LGR5/MKN74-Zellen (dunkelgraue Balken) zeigen eine geringere Caspase-3/7-Aktivität als die Vektor/MKN45 und Vektor/MKN74-Zellen (hellgraue Balken).

Abschließend kann vermerkt werden, dass die Überexpression von LGR5 in diesen Experimenten zu einem Apoptose-resistenteren Phänotyp führt und mit einer Steigerung der proliferativen, invasiven und migratorischen Eigenschaften der Magenkarzinomzellen einhergeht.

Weiterführende Studien sind nun geplant, um die Funktion und Regulation von LGR5 im Magenkarzinom intensiver zu erforschen. Diese werden in der Diskussion (Abschnitt 5.4.5) näher beschrieben.

5 Diskussion

Karzinome des Hepato-Gastrointestinaltrakts führen immer noch die Statistik der tumorbedingten Todesursachen weltweit an [5]. Neue zielgerichtete molekulare Therapien werden daher dringend benötigt, um ihre schlechte Prognose zu verbessern. Die Bekämpfung von Krebsstammzellen könnte ein neuartiger Ansatz sein, um den Zustand der Patienten zu verbessern. Ebenso wie normale Gewebestammzellen sind Krebsstammzellen zur Selbsterneuerung und Differenzierung fähig, wodurch sie nach Transplantation in einen Wirt (z. B. eine Maus) effizient neue Tumoren initiieren können [6,37]. Sie sind vermutlich auf eine Stammzellnische angewiesen, da die Expression von Stammzellmarkern durch die lokale zelluläre und azelluläre Umgebung beeinflusst und reguliert wird [237]. Eine große Hürde stellt momentan noch die Identifizierung der Stammzellmarker sowie die Charakterisierung und Validierung von Krebsstammzellen solider Tumoren dar. Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bietet mit über 900 Mitgliedern eine reichhaltige Auswahl potentieller Zielstrukturen, die konventionell immunhistologisch am Biopsat oder Resektat nachgewiesen werden können [55]. Inzwischen ist belegt, dass GPCRs auch eine Rolle in der Regulation diverser Stammzellfunktionen, wie der Pluripotenz und Differenzierung, spielen [238]. Obwohl GPCRs pharmakologisch bereits intensiv erforscht sind (etwa 60 % aller zugelassenen Arzneimittel wirken auf GPCRs ein), werden immer neue biologische Funktionen und therapeutische Anwendungen ermittelt [238]. Aufgrund ihrer Vielseitigkeit stellen sie erfolgversprechende Ziele für die Stammzell- und Krebsstammzellforschung dar und werden aktuell auf ihre Einsetzbarkeit für die Behandlung von Krebs überprüft [55,65,238].

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Doktorarbeit untersucht werden, ob die GPCRs und GPCR-bezogenen Proteine CXCL12, CXCR4, FZD7, ADAM17 und LGR5 eine Rolle in der Tumorpathologie des Magenkarzinoms spielen und die Identifizierung und Charakterisierung von Krebsstammzellen ermöglichen. Die Ergebnisse dieser Studien werden nachfolgend ausführlich diskutiert.

5.1 Die Rolle von CXCL12 und CXCR4 im Magenkarzinom

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die transkriptionelle und translationale Expression von CXCL12 und seinem Rezeptor CXCR4 im Magenkarzinom untersucht. Die Validierungsstudien in einer umfangreichen Patientenkohorte zeigen, dass die Mehrzahl aller untersuchten Magenkarzinome eine Proteinexpression des GPCR-Liganden CXCL12 in den Tumorzellen aufweist. Die CXCL12-Expression korreliert dabei negativ mit dem Tumorgrad und dem Vorhandensein von Fernmetastasen. Im Gegensatz dazu zeigen nur 17 % der untersuchten Magenkarzinome eine CXCR4-Expression der Tumorzellen, die mit einer höheren lokalen Tumorausdehnung assoziiert ist. Interessanterweise enthalten etwa ein Drittel der Karzinome CXCR4-positive Tumor-Mikrogefäße, deren Proteinexpression signifikant mit einer höheren lokalen Tumorausbreitung und höheren UICC-Stadien assoziiert ist.

Die hier durchgeführten Analysen der mRNA-Expression von CXCL12 haben überraschend gezeigt, dass CXCL12 im nicht-neoplastischen Magen signifikant stärker als im Magenkarzinom exprimiert wird. Dies scheint zunächst nicht plausibel, da CXCL12 außerdem mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen korreliert und in nodal-positiven Magenkarzinomen mehr CXCL12-mRNA nachweisbar ist. Anders als CXCL12 zeigt sein Rezeptor CXCR4 eine erhöhte mRNA-Expression im Tumorgewebe und ist darüber hinaus im Magenkarzinomgewebe von Patienten mit Lymphknotenmetastasen, gegenüber Patienten ohne Lymphknotenmetastasen verstärkt exprimiert.

Innerhalb der GPCR-Familie trägt das Chemokinsystem über die Regulierung der lokalen Entzündungsreaktion, der Tumorzellproliferation und -migration, des Überlebens sowie der Neoangiogenese maßgeblich zur Progression eines Tumors bei [57]. Insbesondere der CXCL12-CXCR4-Signalweg stellt einen Schlüsselfaktor in der Metastasierung von Prostata-, Kolorektal- und Brustkrebs dar [171-173] und wird in Organen, die häufige Lokalisationen von Fernmetastasen sind, wie Lunge, Leber und Lymphknoten, stark exprimiert [239]. Während bisher nur wenige experimentelle Daten zum CXCL12-CXCR4-Signalweg im Magenkarzinom verfügbar waren, können diese und andere aktuelle Studien nun zeigen, dass der GPCR und sein Ligand auch im Magenkarzinom eine wichtige Rolle in der Tumorprogression einnehmen und mit der Metastasierung

in Leber und Lymphknoten assoziiert sind [132,240,241]. Da CXCL12-positive Magenkarzinome allgemein ein aggressiveres Verhalten zeigen, wird die Verwendung von CXCL12 als unabhängigem Prognosefaktor für das Magenkarzinom diskutiert [242]. Des Weiteren kann CXCR4 über die Interaktion mit dem EGF-Rezeptor den ERK-Signalweg aktivieren und induziert so unter anderem Angiogenese, Tumorwachstum und Tumorprogression [243].

Die hier diskutierten Ergebnisse stützen zuvor publizierte Studien [171-173,240-242] und liefern neue Erkenntnisse über die Rolle von CXCR4 und CXCL12 im Magenkarzinom [132]. Der Vergleich zwischen den im Gene Array, mittels Real-time RT-PCR und Immunhistochemie erworbenen Daten zeigt, dass die erhöhte Expression von CXCL12 in nodal-positiven Magenkarzinomen auf transkriptioneller Ebene, nicht aber auf translationaler Ebene, bestätigt werden kann. Das CXCL12-Protein wird nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in Endothel- und Stromazellen detektiert [244]. Da die transkriptionelle Analyse sämtliche CXCL12-exprimierenden Zellen mit einbezieht, könnte dies die gemessene mRNA-Expression beeinflussen. Möglicherweise ist aber auch die mittels TMA-Stanzen beurteilte Proteinexpression nicht repräsentativ für den kompletten Gewebebereich und erklärt so die fehlende Kongruenz. Des Weiteren könnte der tumorbiologische Effekt von CXCL12 ebenso von der Anwesenheit und histoanatomischen Verteilung von CXCR4 abhängen.

Entgegen dieser Ergebnisse berichten Lee und Kollegen von einer starken CXCR4-Expression im Magenkarzinom, die signifikant mit der lymphogenen Metastasierung, höheren UICC-Stadien und einer reduzierten 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert ist [245]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nur in etwa 17 % der Tumorproben eine oftmals schwache, CXCR4-Immunreaktivität detektiert, die lediglich mit der lokalen Tumorausdehnung (T-Stadium) korreliert. Der verwendete CXCR4-Antikörper wurde zuvor gründlich überprüft und weist zudem eine höhere Spezifität als kommerziell verfügbare Antikörper auf [246]. Weder die von Yoshitake und Kollegen berichtete nukleäre CXCR4-Expression, die mit der lymphogenen Metastasierung im kolorektalen Karzinom korreliert [247], noch eine von Saigusa *et al.* beobachtete CXCR4-Positivität der Stromazellen [248] konnte hier bestätigt werden. Allein die Auswahl des Antikörpers könnte ursächlich für die beobachteten Abweichungen im Färbungsmuster und der daraus abgeleiteten klinisch-pathologischen

Relevanz von CXCR4 sein. Um die Bedeutung des CXCR4-CXCL12-Signalwegs, insbesondere für die lymphogene Metastasierung des Magenkarzinoms eindeutig zu klären, sind weitere Studien nötig.

In etwa einem Drittel aller hier untersuchten Magenkarzinome werden CXCR4-positive Mikrogefäße nachgewiesen, die den Tumor umgeben. Das Wachstum eines Primärtumors ist abhängig von einer angepassten Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff über die Tumorgefäße [3]. Von CXCR4 weiß man, dass es ein durch Sauerstoffmangel induzierbares Gen ist, dessen Expression beispielsweise in schnell wachsenden Tumoren durch HIF1 α (*Hypoxia-induced factor 1 α*) verstärkt wird [249]. Über die Stimulation seines Liganden CXCL12 entfaltet CXCR4 seine proangiogene Wirkung und trägt so zur Tumorausdehnung bei [250]. Die hier vorliegenden Ergebnisse untermauern diese Beobachtungen, da eine CXCR4-Expression der Mikrogefäße mit der lokalen Tumorausdehnung und einem höheren UICC-Stadium der Magenkarzinome korreliert. Es ist anzunehmen, dass die Expression von CXCR4 in höheren Tumorstadien aufgrund von Sauerstoffknappheit gesteigert wird, um so die Gefäßneubildung voranzutreiben. Durch die Bindung des Chemokins CXCL12 an seinen Rezeptor CXCR4 wird eine biologische Achse generiert, die mit Tumorprogression, Angiogenese, Metastasierung und dem Zellüberleben in Beziehung steht [160]. Die Inhibierung dieser CXCL12/CXCR4-Achse und ihrer nachgeschalteten Signalwege könnte hilfreich bei der Therapie des Magenkarzinoms sein [251].

5.2 Die Bedeutung von ADAM17 für das Magenkarzinom

ADAM17 wurde auf mRNA-Ebene aber auch auf Proteinebene im Hinblick auf seine klinisch-pathologische Relevanz untersucht. Die mRNA-Analyse zeigt, dass ADAM17 in den untersuchten Magenkarzinomen im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe stark induziert ist. Die nodal-positiven Magenkarzinome weisen zudem eine etwas höhere ADAM17-Expression auf als solche ohne Lymphknotenmetastasen. Bei der Bewertung der Proteinexpression konnten nur in 27 % der untersuchten Magenkarzinomproben eine ADAM17-Expression der Tumorzellen detektiert werden, die statistisch mit keinem

klinisch-pathologischen Parameter korreliert und auch keinen Einfluss auf das Patientenüberleben zeigt.

Die Matrixmetalloprotease ADAM17 ist ein unverzichtbarer Regulator fast aller zellulären Vorgänge von Proliferation über Migration, bis hin zur malignen Entartung [177,178,252]. Durch die Spaltung (*Shedding*) verschiedener Oberflächenmoleküle setzt ADAM17 Liganden frei, die in der Tumorprogression, Invasion und dem Tumorwachstum eine Rolle spielen [178,253]. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit wurde in vielen humanen Karzinomen eine Überexpression von ADAM17 detektiert, die häufig mit einer schlechten Prognose einherging [187-192]. In Studien über humane Brustkrebszellen wirkte sich die Überexpression von ADAM17 förderlich auf die Tumorproliferation, -migration und Angiogenese aus und führte über die Aktivierung des EGFR-PI3K-Akt-Signalwegs zum Fortschreiten der Krebserkrankung [191].

Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde eine signifikante Steigerung der ADAM17-Expression im Magenkarzinom festgestellt. Später veröffentlichte Studien anderer Gruppen bestätigten diese Beobachtungen und konnten darüber hinaus zeigen, dass die gesteigerte ADAM17-Expression signifikant mit dem Grad der Tumordifferenzierung, der Invasionstiefe, dem TNM-Stadium, der lymphogenen Ausbreitung und dem Vorhandensein von Fernmetastasen assoziiert ist [252,254]. Nacheinander proklamierten Shou *et al.* sowie Zhang und Mitarbeiter ADAM17 als unabhängigen Prognosefaktor im Magenkarzinom, da eine hohe Expression von ADAM17 signifikant mit einer schlechten Patientenprognose einherging [252,254]. Aufgrund der zuvor beschriebenen tumorbiologischen Funktionen von ADAM17 erscheinen diese Beobachtungen evident, konnten in der vorliegenden Analyse an 473 Magenkarzinomen jedoch nicht bestätigt werden.

Interessanterweise werden in den hier untersuchten Gewebeschnitten ADAM17-positive Zellen an der Basis der intestinalen Metaplasie gefunden. Dieser Bereich bildet die Regenerationszone des Epithels, aus der, beispielsweise nach einer Gewebeschädigung, neue Epithelzellen hervorgehen [219]. Nagao und Kollegen detektierten eine vergleichbare ADAM17-Expression in murinen Haarfollikeln. Ebenso wie die Magendrüse verfügen diese über eine Stammzellnische, die eine Regeneration ermöglicht [255]. In Vorarbeiten zu dieser Studie entdeckten Schmuck und Mitarbeiter außerdem eine gesteigerte

Expression von ADAM17 in der *Side Population* von Magenkarzinomzelllinien [133]. Diese *Side Population* Zellen weisen Stammzellcharakteristika auf, sind resistent gegenüber Chemotherapeutika und exprimieren Stammzellgene [43]. Das vermehrte Vorkommen von ADAM17-positiven Zellen in der Regenerationszone der intestinalen Metaplasie liefert unter Berücksichtigung der Erkenntnisse von Schmuck und Mitarbeitern und Nagao und Kollegen erste Hinweise auf die Funktion von ADAM17 als potentiellstem Stammzellmarker.

Trotz fehlender klinisch-pathologischer und prognostischer Aussagekraft in diesem Versuchsansatz konnte im Hinblick auf ADAM17 eine Relevanz für die Tumorigenese des Magenkarzinoms gezeigt werden. Schließlich legen die Erkenntnisse anderer Wissenschaftler nahe, dass ADAM17 als Prognosefaktor Magenkarzinompatienten mit einem erhöhten Risiko zur Tumorinvasion und -progression identifizieren kann [254]. Außerdem erlangte ADAM17 als möglicher Stammzellmarker und Indikator therapieresistenter Kolonkarzinome Aufmerksamkeit [133,184]. Zusammengenommen verdeutlichen diese Erkenntnisse, dass ADAM17 eine wichtige Rolle in der humanen Tumorphathologie spielt und eine pharmakologische Intervention daher vielversprechend sein könnte.

Die Metalloprotease ADAM17 hat neben ihrer bekannten Funktion im Notch-Signalweg auch essentielle Bedeutung im *Triple-membrane-passing*-Signal-Mechanismus (TMPS-Mechanismus) [126,128]. Die Genexpressionsdaten aus dem GeneChip Array weisen auf eine verstärkte Expression von *ADAM17*, *LGR5* und *FZD7* im Magenkarzinom hin (siehe Abschnitt 4.1). Daher sollte die Hypothese überprüft werden, dass neben ADAM17 auch die GPCRs LGR5 und FZD7 Komponenten des TMPS-Mechanismus sind. Auf Proteinebene wurde zunächst eine hoch signifikante Korrelation zwischen der ADAM17- und LGR5-Expression sowie der ADAM17- und FZD7-Expression in Tumorzellen derselben Magenkarzinomfälle des TMA-Kollektivs beobachtet. In weiterführenden Untersuchungen konnte außerdem eine teilweise Kolo-kalisation von ADAM17 und LGR5 in gesunder und neoplastischer Magenschleimhaut festgestellt werden.

Unabhängige Studien bestätigten die maßgebliche Bedeutung von ADAM17 für die GPCR-induzierte EGFR-Transaktivierung in den Kopf-Hals-Karzinomen

(HNSCC) experimentell [126,128,256]. Die ADAM17-abhängige Freisetzung der EGF-Liganden proAmphiregulin, proHB-EGF und proTGF- α war dabei funktionell relevant für die Aktivierung des EGF-Rezeptors und seiner nachgeschalteten Signalwege und wirkte sich förderlich auf die Tumorzellproliferation, -migration und Apoptoseresistenz aus [126,128,257]. Im Magenkarzinom vermutet man, dass die *H. pylori*-induzierte Überexpression der TMPS-Komponenten ADAM17 und HB-EGF ebenfalls über die Aktivierung des EGFR-Signalwegs zur Tumorprogression führt [129]. Eine gesteigerte Expression von ADAM17 konnte auch in der vorliegenden Arbeit am Magenkarzinom beobachtet werden. Sollte diese ADAM17-Induktion bereits die Verfügbarkeit der EGF-like Liganden steigern, könnten so nachfolgende Tumor-relevante Prozesse in Gang gesetzt werden.

Studien von Civenni und Kollegen beschreiben erstmals eine Metalloprotease-vermittelte EGFR-Transaktivierung als Reaktion auf die Wnt-Expression im Mammakarzinom und zeigen so einen alternativen Mechanismus der Wnt-induzierten Onkogenese auf [258]. LGR5 ist als optionaler Korezeptor von Wnt imstande, Signale des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zu verstärken [259]. In der vorliegenden Studie wird LGR5 mit ADAM17 koexprimiert. Trotz intensiver Nachforschungen fehlte bislang die Verbindung zwischen der Metalloprotease ADAM17 und ihrem aktivierenden GPCR. Diese Erkenntnisse und die Analysen von Civenni und Kollegen bieten nun erste Anhaltspunkte für eine Beteiligung von LGR5 an der ADAM17-vermittelten EGFR-Transaktivierung.

Um die Annahme zu bestätigen, dass eine gemeinsame Regulation von LGR5 und ADAM17 stattfindet, wurde eine computergestützte Promotoranalyse durchgeführt. Die Suche nach Konsensusbindestellen für Transkriptionsfaktoren identifizierte eine gemeinsame potentielle Bindestelle für den Transkriptionsfaktor SP1 im LGR5- und ADAM17-Promotor (Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4). Aus der Summe dieser Beobachtungen wird die Hypothese abgeleitet, dass LGR5 als GPCR und ADAM17 als Sheddase Teile einer stammzell-spezifischen *triple-membrane-passing*-Signaltransduktionskaskade sind, die Wnt- und Tyrosinkinase-Signalwege einbezieht. Dieses modifizierte *triple-membrane-passing*-Signal-Konzept beinhaltet die Stimulation des GPCRs LGR5 durch seinen Liganden. Die Aktivierung von LGR5 induziert über einen noch immer unbekanntem Mechanismus das durch ADAM17-vermittelte *Shedding* der

proEGF-like Liganden zu reifen Wachstumsfaktoren (HB-EGF, Amphiregulin, TGF- α). Anschließend können nun der EGF-Rezeptor und seine typischen intrazellulären Signalwege (MAPK, PI3K/Akt, STAT, PLC- γ) aktiviert werden, die eine Vielzahl biologischer Reaktionen, wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose kontrollieren [126-128]. Weiterführende Analysen sind nötig, um diese Hypothese zu belegen.

LGR5 ist als Zielgen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs bekannt, kann aber durch Ausbildung eines Superkomplexes mit LRP5/6 und Frizzled (z. B. FZD5) auch als optionaler Wnt-Korezeptor agieren [259]. Über die Verbindung mit LGR5 und dem Wnt-Signalweg wäre es auch denkbar, dass FZD7 Teil des TMPS-Mechanismus ist. Im Rahmen dieser Studie konnte im Magenkarzinom keine Verbindung zwischen LGR5 und FZD7 gefunden werden. Jedoch korreliert die Proteinexpression von ADAM17 und FZD7 im selben Patienten-Kollektiv signifikant miteinander.

Aufgrund der Expressions-Daten wird in der vorliegenden Arbeit lediglich eine Arbeitshypothese für kommende Versuche aufgestellt, eine funktionelle Untersuchung ist in diesem Rahmen bisher noch nicht erfolgt. In weiterführenden Genregulationsstudien soll aufgedeckt werden, ob und inwiefern ADAM17, LGR5 und FZD7 über eine TMPS-Transduktionskaskade verknüpft sind und sich als Therapieziele für das Magenkarzinom eignen.

5.3 Die Expression von FZD7 im Magenkarzinom

Des Weiteren wurde die Expression von FZD7 auf transkriptioneller und translationaler Ebene analysiert. Die Validierung mittels Real-time RT-PCR zeigt eine erhöhte FZD7-Expression im Magenkarzinom, verglichen mit dem dazugehörigen Normalgewebe. Außerdem wird FZD7 in nodal-positiven gegenüber nodal-negativen Magenkarzinomen vermehrt exprimiert. Untersuchungen zur Proteinexpression in TMA-Gewebeschnitten ergeben, dass die FZD7-Expression signifikant mit dem Tumortyp nach Laurén korreliert. Ein Zusammenhang mit dem lokalen Tumorwachstum (T-Status), der Lymphknotenbeteiligung (N-Status) oder dem Differenzierungsgrad des Tumors (G-Status) besteht nicht. Diese Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass FZD7 im Magenkarzinom

induziert ist und eine wichtige Rolle in der Tumordifferenzierung und -metastasierung spielt.

FZD7 ist einer der bedeutendsten Rezeptoren der Frizzled-Familie, da er wichtige Funktionen in der Stammzellbiologie sowie der Krebsentstehung und -progression einnimmt [194]. Seine Überexpression konnte, ergänzend zu dieser Arbeit, noch in einer Vielzahl weiterer Tumoren bestätigt werden [195,197,203,260,261]. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass die gesteigerte FZD7-Expression die Tumorentstehung und -metastasierung im kolorektalen und hepatozellulären Karzinom sowie im hormonresistenten Brustkrebs (*triple negative breast cancer*, TNBC) über die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs begünstigt [194].

Die Beobachtung, dass FZD7 im nodal-positiven Magenkarzinom hochreguliert ist, wird auch durch unabhängige Studien belegt. Ueno und Kollegen stellten beispielsweise fest, dass FZD7 eine Bedeutung für die Invasivität, das Überleben und die Metastasierung von Kolonkarzinomzellen hat. In siRNA-Experimenten konnte diese FZD7-Wirkung reduziert und somit erste Ansätze für eine zielgerichtete Krebstherapie geliefert werden [203].

In der vorliegenden Arbeit sind Magenkarzinome vom intestinalen Typ nach Laurén signifikant häufiger FZD7-positiv (43 %) als Tumoren vom diffusen Typ (27 %), was auf eine unterschiedliche Rolle des Frizzled bei der Tumorentwicklung dieser histogenetisch unterschiedlichen Tumortypen hinweisen könnte. Interessanterweise leben Patienten mit FZD7-negativen Tumoren signifikant länger als solche mit einer FZD7-Expression in den Tumorzellen (17,7 gegenüber 12,5 Monaten, Tabelle 4.7). Diese Ergebnisse gehen mit den Beobachtungen von Ueno und Kollegen im kolorektalen Karzinom konform und eröffnen neue Möglichkeiten für den Einsatz von FZD7 als prognostischem Marker im Magen- und Kolorektalkarzinom [203].

Im Rahmen der immunhistochemischen Analysen im Magenkarzinom wird auch eine FZD7-Expression in den inflammatorischen Zellen des angrenzenden nicht-neoplastischen Gewebes detektiert. Da der Karzinogenese nicht selten eine chronische Entzündung vorangeht [6], könnte diese Beobachtung darauf hindeuten, dass die Induktion der FZD7-Expression ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung ist.

Weitere Beobachtungen zeigen, dass FZD7 ebenso wie ADAM17 an der Übergangszone zwischen Foveole und Drüsenkörper zu finden ist, der Regenerationszone des Epithels. In Vorarbeiten zu dieser Studie wurde von Schmuck *et al.* bestätigt, dass FZD7 in den *Side Population* Zellen verschiedener Magenkarzinomzelllinien verstärkt exprimiert ist [133]. Diese ersten Hinweise auf eine Bedeutung von FZD7 als möglichen Biomarker von Stamm- oder Krebsstammzellpopulationen werden von weiteren unabhängigen Studien unterstützt [201,262]. Vincan *et al.* sowie Gregorieff und Kollegen haben bereits gezeigt, dass die FZD7-Proteinexpression im Kolon und Dünndarm auf die proliferativ aktiven Bereiche begrenzt ist und insbesondere in den Stammzellen der Kolonkrypten verstärkt exprimiert wird. Sie konnten eindrucksvoll zeigen, dass die FZD7-Expression im Zuge der Ausdifferenzierung in eine reife Zelle graduell abnimmt [217,263].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine Assoziation der FZD7-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern und dem Überleben von Magenkarzinompatienten belegt. Die Ergebnisse legen nahe, dass FZD7 eine tumorbiologische Bedeutung in der Karzinogenese und Lymphknotenmetastasierung des Magenkarzinoms besitzt und als möglicher prognostischer Marker den Krankheitsverlauf vorhersagen könnte. Diese und andere Studien zeigen, dass FZD7 zudem Potential als Stammzell-, Krebsstammzell- und Differenzierungsmarker aufweist [133,201,262,263]. Ein besseres Verständnis seiner funktionellen Bedeutung für die Krebsstammzellbiologie könnte FZD7 zu einem effizienten Therapieziel im Magenkarzinom machen [194].

5.4 Die Rolle von LGR5 in der humanen Tumorigenese

5.4.1 Die Expression von LGR5 im Magenkarzinom

Im Magenkarzinom wurde die mRNA- und Proteinexpression von LGR5 untersucht. Auf transkriptioneller Ebene ist die LGR5 mRNA im neoplastischen Magen gegenüber dem angrenzenden nicht-neoplastischen Gewebe höher exprimiert. In nodal-positiven Magenkarzinomen wurde außerdem ein starker Anstieg der mRNA-Expression im Vergleich zu den nodal-negativen Karzinomen detektiert. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass LGR5 während der Tumorigenese und der lymphogenen Metastasierung induziert wird. Die

Untersuchungen an 487 Magenkarzinomen im TMA ergaben allerdings keine Korrelation zwischen der LGR5-Proteinexpression und einem klinisch-pathologischen Parameter. Ein Zusammenhang zwischen LGR5 und dem Patientenüberleben konnte in diesem Versuchsansatz ebenfalls nicht festgestellt werden.

LGR5 ist als GPCR und Zielgen des Wnt-Signalwegs beschrieben [206]. In den bedeutenden Arbeiten von Barker und Kollegen wurde LGR5 als Marker adulter Stammzellen in intestinalen Krypten, im Magen und in Haarfollikeln von Mäusen identifiziert [143]. Angeregt durch diese Ergebnisse begannen auch andere Wissenschaftler den Glykoprotein-Hormon-Rezeptor LGR5 in Mäusen, Zellkulturen und Karzinomproben eingehend zu untersuchen [214,264,265]. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wird LGR5 derzeit als der selektivste und vielversprechendste Marker von Stammzellen und Krebsstammzellen im intestinalen Epithel angesehen [226].

Die Analysen der vorliegenden Arbeit zeigen eine gesteigerte Expression von LGR5 im Magenkarzinom, die so auch durch andere Studien im humanen hepatozellulären Karzinom, Basalzell-, Kolon-, Kolorektal- und Ovarialkarzinom bestätigt wird [66,206,213-215]. Interessanterweise zeigten Yamamoto *et al.*, dass die LGR5-Überexpression in Maus-Hepatozyten durch das Einbringen einer β -Catenin-Mutation induziert werden kann [206]. Vermutlich ist die gesteigerte Expression von LGR5 in zahlreichen Karzinomen also Ausdruck eines aktivierten Wnt-Signalwegs. Die Studien von Uchida und Kollegen untermauern den hier beobachteten Zusammenhang zwischen LGR5-Expression und Lymphknotenmetastasierung. Sie zeigen, dass die erhöhte Expression von LGR5 im kolorektalen Karzinom signifikant mit der Anzahl von Lymphknotenmetastasen und der Invasion in Lymph- und Blutgefäße assoziiert ist [214].

Des Weiteren konnte bereits in zahlreichen Tumoren eine LGR5-Überexpression nachgewiesen werden, die häufig im Zusammenhang mit dem Vorschreiten der Tumorerkrankung steht [66,206,213-215]. Trotz allem bleibt die klinisch-pathologische Bedeutung der Wnt-gesteuerten LGR5-positiven Zellen in dieser und anderen Studien weitestgehend unklar [234]. So wie in der vorliegenden Arbeit konnten auch in den TMA-basierten Untersuchungen von Ziskin und Mitarbeitern [266] sowie Fan und Kollegen keine statistisch signifikante Assoziation zwischen der LGR5-Expression und klinisch-pathologischen

Parametern im kolorektalen Karzinom gefunden werden, wenngleich LGR5 mit der β -Catenin-Expression korreliert [265].

Während der Tumortyp nach Laurén, die Invasionstiefe (T-Kategorie), der Lymphknotenstatus (N-Kategorie), das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, das UICC-Stadium und der Differenzierungsgrad des Tumors (Grading) in dieser Studie signifikant mit dem Überleben korrelieren, lässt die hier detektierte LGR5-Expression keine Prognose auf das Patientenüberleben zu (Tabelle 4.7). Entgegen dieser Ergebnisse beobachteten Takahashi und Kollegen, dass die LGR5-Expression mit einer schlechteren Prognose für ein krankheitsfreies Überleben assoziiert [234]. Nach den bisherigen Ergebnissen ist die LGR5-Expression zwar in der gastralen Karzinogenese involviert, hat als vermutlich frühes Ereignis in der Tumorinitiation aber keine prognostische Aussagekraft.

Der selbst hergestellten Anti-LGR5-Antikörper wurde zuvor sehr umfangreich und gewissenhaft nach gängigen Standards validiert [150,267]. Im Vergleich mit kommerziell erhältlichen Produkten zeigt er ein deutlich selektiveres und spezifischeres Färbemuster (siehe Abbildung 4.14). Aufgrund dessen werden die unerwarteten Ergebnisse nicht auf die Verwendung dieses Anti-LGR5-Antikörpers zurückgeführt und in den folgenden Abschnitten eingehender diskutiert.

5.4.2 Die Charakterisierung LGR5-positiver Zellen im Magen

Im Anschluss an die Analysen zur tumorbiologischen Bedeutung der LGR5-positiven Zellen wurden diese umfassend charakterisiert.

In den letzten Jahren wurde die Krebsstammzelltheorie intensiv diskutiert und erforscht. Im Zuge dessen stellte man die Vermutung an, dass GPCRs in der Tumorigenese eng mit Krebsstammzellen assoziiert sind [66,268]. LGR5, ebenfalls ein bedeutendes Mitglied der GPCR-Familie, ist als Marker Wnt-regulierter adulter Stammzellpopulationen im Haarfollikel, Darm und Magen von Mäusen bekannt [220]. Da Krebsstammzellen und Stammzellen in der Regel durch die Expression von mehr als einem Marker identifiziert und validiert werden [34], ist auch LGR5 mit großer Sicherheit nicht der einzige Marker von Stammzelleigenschaften im Magen. Um das Expressionsmuster LGR5-positiver Zellen im Magen näher zu charakterisieren, wurden Doppelfärbungen von LGR5 mit anderen

potentiellen Stammzell- bzw. Krebsstammzellmarkern des Gastrointestinaltrakts, wie ADAM17 [133], CD44 [229] und Musashi-1 [269] durchgeführt.

ADAM17 wurde in vorhergehenden Studien von Schmuck *et al.* bereits als potentieller Stammzellmarker im Magen identifiziert [133]. Die Metalloprotease ist in der *Side Population* von Magenkarzinomzelllinien hochreguliert und wird an der Basis der intestinalen Metaplasie und in der Stammzellnische muriner Haarfollikel exprimiert [133,255]. In den vorliegenden Untersuchungen wurden drei unterschiedliche Zellpopulationen identifiziert. Neben einigen ADAM17⁺/LGR5⁻- und ADAM17⁻/LGR5⁺-Zellen wurden in der neoplastischen und nicht-neoplastischen Magenschleimhaut auch einige Zellen detektiert, die beide Marker koexprimieren (ADAM17⁺/LGR5⁺). Im Rahmen dieser Arbeit konnte in den TMAs von 487 Magenkarzinomen bereits eine signifikante Korrelation zwischen der LGR5- und ADAM17-Immunreaktivität festgestellt werden, die nun durch die beschriebene Koexpression der beiden Proteine wie erwartet bestätigt wird.

Das RNA-bindende Protein Musashi-1 (Msi1) wurde ursprünglich als Marker neuraler Stammzellen identifiziert und spielt darüber hinaus eine zentrale Rolle in der posttranskriptionellen Regulation von Genen für die Zellzyklusregulation, Proliferation und Apoptose [270,271]. In der *Side Population* von humanen Brustepithelzellen, die Stammzelleigenschaften aufweisen, ist Musashi-1 hochreguliert [272]. Weitere Studien beschreiben Musashi-1 bereits als möglichen Stammzellmarker des murinen Darms und humanen Magens [228,232] sowie als einen Krebsstammzellmarker humaner Tumoren [233]. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich die immunreaktiven Zellen im gesunden Magen und im Magenkarzinom hauptsächlich aus Msi1⁺/LGR5⁻-, in einem geringeren Maße aus doppelt positiven Msi1⁺/LGR5⁺- und aus wenigen Msi1⁻/LGR5⁺-Zellen zusammensetzen.

Takaishi und Kollegen identifizierten eine CD44-positive Subpopulation aus Magenkarzinomzelllinien, die alle Fähigkeiten von Stammzellen aufwies. Nach Transplantation in eine Maus waren diese Zellen zur Tumorentstehung befähigt [229]. CD44 wird in der Leukämie und den Karzinomen des Pankreas, Brust, Prostata und Kopf-Hals-Bereichs bereits als Krebsstammzellmarker eingesetzt [273].

In der vorliegenden Koexpressionsstudie wurden sowohl im Normalgewebe als auch im Magenkarzinom eine größere Anzahl CD44⁺/LGR5⁺-Zellen detektiert.

Alles in allem konnte in der vorliegenden Studie eine Expressionssteigerung aller potentiellen Stammzell- bzw. Krebsstammzellmarker im Magenkarzinom gegenüber dem Normalgewebe beobachtet werden. Unterstützend zu diesen Ergebnissen berichten Wang und Kollegen von einer Koexpression der Marker CD44 und Msi1 in Zellen prekanzeröser Läsionen des Magenkarzinoms, die möglicherweise eine Rolle in der Tumoringenese spielen [232]. Kagara und Kollegen vermuten außerdem, dass die Aktivierung der Gene *CD44* und *Msi1* in Folge einer Hypomethylierung der Promotor-CpG-Regionen zu einem aggressiven Phänotyp führt [274].

Klassischer Weise werden Stamm- und Krebsstammzellen als langlebige, proliferativ inaktive oder sehr langsam proliferierende Zellen definiert [275]. Ihre Resistenz gegenüber Bestrahlung und chemotherapeutischer Behandlung wird mit der geringen proliferativen Aktivität erklärt [276]. Neuesten Erkenntnissen zufolge ist dieser inaktive Zustand für adulte Stammzellen nicht endgültig. Barker und Kollegen zeigten mithilfe von *lineage tracing* Experimenten (*in vivo* Verfolgung der Abstammung einer Zelllinie) anhand der lacZ-Reportergenaktivität im *LGR5-lacZ*-Knockin-Mausmodell, dass LGR5-positive Zellen alle Stammzeleigenschaften aufweisen und sich dennoch aktiv teilen [221].

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden daher Doppelfärbungen mit LGR5 und dem Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt. Das Magenkarzinom weist in diesen Untersuchungen drei unterschiedliche Zellpopulationen auf. Als erstes findet sich eine Zellfraktion von proliferativ aktiven, aber LGR5-negativen Tumorzellen (Ki67⁺/LGR5⁻). Des Weiteren konnte eine geringe Anzahl von Tumorzellen detektiert werden, die den potentiellen Stammzellmarker LGR5 exprimieren, aber proliferativ inaktiv sind (Ki67⁻/LGR5⁺). Nimmt man an, dass LGR5 Zellen mit Stammzeleigenschaften markiert, so könnten diese Zellen als ruhende Stammzellen oder Krebsstammzellen betrachtet werden. Zusätzlich findet sich noch eine Untergruppe von Zellen, die LGR5 und den Proliferationsmarker Ki67 koexprimieren (Ki67⁺/LGR5⁺). Unter der oben genannten Annahme würde diese Fraktion die aktiv proliferierende Stammzell- oder Krebsstammzellpopulation darstellen. Im Unterschied zum Magenkarzinom werden in der

gesunden Magenschleimhaut jedoch fast keine aktiv proliferierenden LGR5-positiven Zellen detektiert.

Tatsächlich werden diese Erkenntnisse in einer anderen Studie am Ösophaguskarzinom und Barrett-Ösophagus ebenso bestätigt [277]. Da die Subpopulation von Ki67⁺/LGR5⁺-Zellen bereits im Barrett-Ösophagus detektiert wird, scheint die proliferative Reaktivierung der adulten Stammzellen ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung zu sein [277].

Entgegen der allgemeinen Meinung proliferieren LGR5-positive putative Stammzellen im Magenkarzinom aktiv. Ergänzend zu den Berichten von Barker *et al.* [221] deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine Subpopulation der LGR5-positiven Zellen womöglich erst nach der Transformation in Krebsstammzellen proliferativ aktiv wird und infolge dessen vermutlich zur Tumorentstehung und zum Tumorwachstum beitragen könnte [215,216]. Die proliferativ inaktiven LGR5-positiven Zellen (Ki67⁻/LGR5⁺) könnten dann als eine Art Reservepopulation dienen, die für die Zellregeneration z. B. im Fall einer Gewebeschädigung aus dem Ruhezustand reaktiviert werden [224].

Die Spezifität des eigens hergestellten Anti-LGR5-Antikörpers wurde zunächst durch Western Blot, Immunfluoreszenz und Immunzytochemie bestätigt. Die offensichtliche Koexpression und Kolo-kalisation der oben genannten potentiellen Stammzell- bzw. Krebsstammzellmarker mit LGR5 untermauert die Vermutung, dass der Anti-LGR5-Antikörper diese wiederholt beschriebenen LGR5-positiven Zellen mit Stammzeleigenschaften im humanen Magen identifiziert [143,221]. Alles in allem ist die Expression von LGR5, ADAM17, Msi1 und α -catenin in diesen Zellen ein Hinweis auf die Stammzeleigenschaften. In Kombination mit diesen untersuchungsbedingten Tumormarkern sind LGR5-Positive Spindelzellen identifiziert worden, die sich in ihrem Expressionsmuster unterscheiden. Angewendet auf das Magenkarzinom und unter der Annahme, dass es sich bei diesen Zellen um Krebsstammzellen handelt, wird die Hypothese aufgestellt, dass innerhalb eines Tumors parallel mehrere Krebsstammzell-Subpopulationen existieren, die möglicherweise unterschiedliche Aufgaben bei der Tumorentstehung, -progression und -invasion übernehmen [278-280]. Anhand des Expressionsmusters im Gewebe könnte so zukünftig die Prognose und das

Verhalten eines Tumors vorhergesagt werden. Weitere umfangreiche Studien werden notwendig sein, um die funktionelle Bedeutung des „Marker-Codes“ im Tumor- und Normalgewebe zu entschlüsseln.

5.4.3 Die klinische Relevanz der Lokalisation von LGR5-positiven Zellen im Magenkarzinom

Aufgrund aktueller Publikationen wird angenommen, dass LGR5 als Stammzell- bzw. Krebsstammzellmarker des neoplastischen sowie nicht-neoplastischen Magenepithels fungiert [221]. Die Expression von LGR5 in intestinalen Stammzellen, seine Abhängigkeit von aktiven Wnt-Signalen und seine Rolle in der Tumorzellinvasion führen zu der Vermutung, dass der GPCR auch in der Transition vom Adenom zum invasiven Karzinom involviert sein könnte [226]. Inwiefern die histoanatomische Verteilung der LGR5-positiven Zellen mit der fortschreitenden gastralen Karzinogenese korreliert, wurde hier an 100 Großflächenschnitten untersucht, die Bereiche von nicht-neoplastischem, metaplastischem und neoplastischem Karzinomgewebe enthielten.

LGR5 ist als Teil der kanonischen Wnt-Signalkaskade beschrieben [259], die einen Signalgradienten in den intestinalen Krypten bildet, wodurch Zellproliferation und -differenzierung reguliert werden [281]. Die LGR5-exprimierenden Magen-Stammzellen sind am Drüsengrund angesiedelt und schieben ihre differenzierenden Nachkommen aufwärts. Ein Verlust der LGR5-Expression zeigt daher die Wachstumsrichtung der Zell-Abkömmlinge an [143]. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass LGR5 von Zellen an der Basis der humanen Magendrüse exprimiert wird, die vermutlich eben jene Stammzellen darstellen, die von Barker und Kollegen im Mäusemagen beschrieben wurden [221]. Wie die vorliegenden immunhistochemischen Untersuchungen zeigen, ist die Anzahl und histoanatomische Verteilung der LGR5-positiven Zellen variabel. In der nicht-neoplastischen Schleimhaut differenzieren sie einerseits aufwärts zur luminalen Oberfläche, die das Foveolarepithel bildet, und andererseits in Richtung des abluminalen Bereichs, der die Magendrüse darstellt [143]. Diese bidirektionale Differenzierung geht möglicherweise bereits in der intestinalen Metaplasie verloren, da sich hier LGR5-positive Zellen nur noch an der Basis der metaplastischen Krypte finden. Die Differenzierungsrichtung der Zellen scheint sich also zu ändern und zeigt nun in Richtung der luminalen Oberfläche.

Während in der nicht-neoplastischen Mukosa kaum ein Expressionsgradient von LGR5 erkennbar ist, zeigen Magenkarzinome einen solchen besonders häufig. Überraschenderweise wird im Magenkarzinom erstmals eine starke LGR5-Expression an der Oberfläche der neoplastischen Schleimhaut detektiert, mit abnehmender Farbeintensität nach Abluminal. Des Weiteren wird eine starke LGR5-Positivität im Tumorzentrum und an der Invasionsfront des Karzinoms detektiert. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass die vermutliche Stammzellnische durch den Erwerb migratorischer Fähigkeiten nun deutlich mobiler und im Hinblick auf die räumliche Orientierung ihrer Abkömmlinge weniger beschränkt ist. Diese können nun auch in Richtung der abluminalen Seite der Mukosa proliferieren, was eine invasive Wachstumsrichtung unterstützt. Die ungleiche Verteilung der mutmaßlichen Krebsstammzellen und die scheinbar unkontrollierte oder chaotische Wachstumsrichtung ihrer Abkömmlinge könnte die grundlegende Basis der Krebsmorphologie bilden, die letztendlich für die histopathologische Klassifikation maligner Tumoren verwendet wird [22]. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit aktuellen Studien, die LGR5-exprimierende Zellen als Ursprungszellen intestinaler Tumoren identifizierten [215].

Walker und Kollegen berichten, dass der Verlust der LGR5-Expression Tumorwachstum und -invasion im kolorektalen Karzinom induziert. Sie schlussfolgern daraus, dass LGR5 dazu beiträgt, Stammzellen auf ihre Nische zu begrenzen [226]. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen nun, dass die Anzahl der LGR5-positiven Zellen zunimmt. Unter der Annahme, dass es sich bei diesen Zellen um Stammzellen handelt, wird während der Karzinogenese eine Neuordnung der mutmaßlichen Stammzellnische, nämlich in Richtung der luminalen Oberfläche, dem Tumorzentrum und der Invasionsfront beobachtet. LGR5-positive Zellen verlieren also die Beschränkung auf die vermutliche Stammzellnische, wie sie zunächst in der nicht-neoplastischen Mukosa vorherrscht [143]. Diese Beobachtungen werden von Takeda *et al.* und Becker *et al.* unterstützt [280,282].

Interessanterweise korreliert die LGR5-Expression im Tumorzentrum und an der Invasionsfront signifikant mit dem Patientenalter, dem lokalen Tumorwachstum, der nodalen Ausbreitung und dem UICC-Stadium. Außerdem leben Patienten mit LGR5-positiven Magenkarzinomen im Mittel kürzer (28.0 ± 8.6 Monate)

als Patienten mit LGR5-negativen Tumoren (54.5 ± 6.3 Monate). Neuere Stammzellmodelle postulieren, dass die Tumorprogression und -metastasierung hauptsächlich von den Krebsstammzellen bzw. Tumor-initiierenden Zellen angetrieben wird [283]. Die Ergebnisse der vorliegenden Analysen bestärken diese Annahme.

An der invasiven Front hat die Neoplasie bereits die Basalmembran durchbrochen, die Krebszellen erhalten im Zuge der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) einen hoch-malignen mesenchymalen Phänotyp, lösen sich vom Primärtumor und können dann in die Lymph- oder Blutgefäße invadieren und metastasieren [6,284,285]. In der Studie von Takahashi und Kollegen wurde ebenfalls eine LGR5-Expression im Tumorzentrum und an der Invasionsfront kolorektaler Karzinome beobachtet, die mit einer schlechten Überlebensprognose korreliert [234]. Da die LGR5-positiven Tumoren in der Studie einen eher mesenchymalen Charakter aufwiesen, wurde vermutet, dass die LGR5-exprimierenden Krebsstammzellen möglicherweise eine Rolle in der Migration und Metastasierung einnehmen [234].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Zunahme der Anzahl und Färbeintensität LGR5-positiver Zellen vom nicht-neoplastischen Epithel zum Magenkarzinom beobachtet. Die insgesamt auffällig veränderte histoanatomische Lage dieser Zellen (nichtneoplastische Schleimhaut versus intestinale Metaplasie versus Karzinom) könnte eine wichtige Beobachtung zum Verständnis der Tumorentstehung und -progression sein. LGR5 könnte das Stammzellkompartiment und die daraus resultierende Veränderung der Differenzierungs- und Wachstumsrichtung neoplastischer Zellen sichtbar machen, die im Karzinom nicht mehr geordnet nach luminal, sondern nach abluminal gerichtet sind und die Invasion bedingen [280,286]. Es wird also angenommen, dass die tumorbiologische Bedeutung LGR5-positiver Zellen von ihrer räumlichen Verteilung innerhalb der Tumormasse abhängt.

Als Reaktion auf die Entdeckungen von Barker *et al.* wurde in dieser und anderen Studien auch die klinisch-pathologische Relevanz von LGR5 an Patientenmaterial erforscht. Während auf transkriptioneller Ebene bereits eine signifikante Korrelation der LGR5-Expression mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika gezeigt werden konnte [66,214], gelang dies in

immunhistochemischen Untersuchungen bislang nicht [265,266]. Dies führte in den entsprechenden Publikationen zu der Annahme, dass LGR5 zwar durchaus eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielt, jedoch keine Bedeutung für die Tumorprogression oder eine prognostische Aussagekraft besitzt [265,266]. Grund für die Diskrepanz könnte der Einsatz von Tissue Microarrays (TMAs) bei immunhistochemischen Untersuchungen sein.

Die TMA-Technik ermöglicht die Analyse umfangreicher Patientenkollektive unter geringem Material- und Zeitaufwand und wird daher standardmäßig für die Beurteilung der tumorbiologischen Bedeutung neuer Biomarker von vielen Instituten eingesetzt [287]. Die Grenzen der TMA-Technik liegen in der Repräsentierbarkeit des Gesamtgewebes durch die jeweils drei bis vier 0,6 mm messenden Gewebezylinder und in ihrer Anwendbarkeit bei der Analyse eines inhomogen exprimierten Proteins [288,289]. Durch die Aufarbeitung von mehr als 20 Studien konnten Skacel und Kollegen eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der TMAs und den entsprechenden Gewebeschnitten ermitteln. Selbst für heterogen strukturierte Tumoren, wie dem Prostatakarzinom, konnte eine gute Repräsentierbarkeit durch die TMA-Zylinder gewährleistet werden [289-291]. Im Gegensatz dazu verdeutlicht die Studie von Merseburger *et al.*, dass der prognostische Wert von inhomogen exprimierten Biomarkern wie p53 und bcl-2 im Prostatagewebe mithilfe der TMA-Technik nicht korrekt erfasst werden kann [292].

Die hier durchgeführte Überprüfung der LGR5-Expression an Großflächenschnitten zuvor untersuchter TMA-Stanzen zeigt, dass die histoanatomische Verteilung LGR5-positiver Zellen nicht zufällig ist. Der tumorbiologische Effekt hängt von ihrer räumlichen Verteilung im Tumorgewebe ab. Vergleicht man die statistischen Ergebnisse der Großflächenschnitte mit denen der zugehörigen TMA-Stanzen, so wird deutlich, dass die TMAs nur einen zufälligen Bereich des Tumors darstellen, ohne Berücksichtigung der räumlichen Verteilung der LGR5-positiven Zellen. Wie anhand der Großflächenschnitte gezeigt werden konnte, ist die räumliche Verteilung im Magenkarzinom jedoch von tumorbiologischer Bedeutung und bedingt die Überlebensprognose. Daher ist die TMA-Technik für die Bewertung der LGR5-Immunreaktion nicht geeignet.

Diese Beobachtungen unterstreichen die Notwendigkeit, die histoanatomische Verteilung von LGR5-positiven Zellen in gewebebasierten Studien zu

berücksichtigen, da deren tumorbiologische Bedeutung eindeutig mit der räumlichen Verteilung assoziiert ist. Dies wird von aktuellen Studien weitestgehend ignoriert, was das Risiko einer Fehlinterpretation der Ergebnisse birgt und zu fragwürdigen Schlussfolgerungen führen kann. Unter Umständen ist die begrenzte klinisch-pathologische Aussagekraft von CXCL12, CXCR4, ADAM17 und FZD7 in dieser Studie ebenfalls auf ein inhomogenes Expressionsmuster zurückzuführen, was allerdings hier nicht näher untersucht wurde. Die TMA-Technik ist grundsätzlich eine ökonomische und zuverlässige Methode, um die klinisch-pathologische Bedeutung eines homogen exprimierten Proteins in einer großen Anzahl von Fällen zu beurteilen [289]. Die Beobachtungen im Magenkarzinom legen jedoch nahe, dass TMAs für die Untersuchung inhomogen verteilter Marker wie LGR5 nicht geeignet sind.

5.4.4 Die LGR5-Expression in hepato-gastrointestinalen Karzinomen

Die Überexpression von LGR5 ist zwar bereits für einige Tumorentitäten beschrieben [66,206,213-215], eine systematische Analyse an einer großen Auswahl humaner hepato-gastrointestinaler Karzinome und den dazugehörigen Normalgeweben fehlte jedoch bislang. Aus diesem Grund wurde die differentielle Expression von LGR5 auf transkriptioneller und translationaler Ebene in malignem und dazugehörigen nicht-malignem Gewebe von sechs verschiedenen Tumor-Lokalisationen (Ösophagus, Magen, Pankreas, Leber, Kolon und Rektum) untersucht.

Die Analyse der mRNA-Expression zeigt, dass LGR5 in Adenokarzinomen des Ösophagus, dem intestinalen und diffusen Magenkarzinom sowie dem Kolon- und Rektalkarzinom im Vergleich zum Normalgewebe signifikant verstärkt exprimiert wird. Im Cholangiokarzinom (CC) wird LGR5 überraschenderweise signifikant geringer als im dazugehörigen Normalgewebe exprimiert.

Mit einem monospezifischen Anti-LGR5-Antikörper war es außerdem möglich, die LGR5-exprimierenden Zellen in hepato-gastrointestinalen Geweben zu identifizieren. Einige wenige LGR5-positive Zellen wurden in räumlicher Nähe zur Basalmembran der nicht-neoplastischen Pankreasgänge, der Magenschleimhaut und der kolorektalen Krypten detektiert. Dies entspricht der von Barker *et al.* beschriebenen Verteilung LGR5-positiver Stammzellen in Mäusen und stimmt mit der histoanatomischen Lage von Stammzellen im Menschen

überein [221,280,293,294]. Im Plattenepithel des Ösophagus, den intrahepatischen Gallengängen und Hepatozyten wird LGR5 nicht exprimiert. Die Karzinome des Magens, Pankreas, Kolon, Rektums und der Leber weisen im Vergleich mit dem zugehörigen nicht-neoplastischen Gewebe signifikant mehr LGR5-positive Zellen auf. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen berichten auch Uchida und Kollegen sowie Fan *et al.*, dass LGR5 im kolorektalen Karzinom signifikant hochreguliert wird und mit der Aktivierung des Wnt-Signalwegs und dem malignen Potential des Tumors assoziiert ist [214,265]. Zwei weitere Studien zeigen eine LGR5-Überexpression im Adenokarzinom des Ösophagus und den vorangehenden präneoplastischen Läsionen. Da die LGR5-Expression dort mit einer schlechten Überlebensprognose korrelierte, wurde geschlussfolgert, dass LGR5 möglicherweise sogar als Biomarker eingesetzt werden könnte [277,295].

Der GPCR LGR5 wurde bisher als Stammzellmarker im Magen, Darm, Kolon und den Haarfollikel von Mäusen verifiziert [221,294,296]. Die Expression von LGR5 ist jedoch nicht nur auf Stammzellen begrenzt, sondern wurde ebenfalls in anderen Zellen ohne Stammzeleigenschaften der Brustdrüse, des Gehirns, Pankreas und der Leber nachgewiesen [297]. Da die Plattenepithelkarzinome des Ösophagus gegenüber den untersuchten Adenokarzinomen eine völlig andere, nicht-glanduläre Differenzierung aufweisen, konnte vermutlich in diesen Gewebeproben, wie zuvor bereits von Rahden *et al.* berichtet [277], keine differenzielle LGR5-Expression festgestellt werden. Im hepatozellulären Karzinom ist die LGR5-Expression auf transkriptioneller Ebene deutlich erhöht, eine statistische Signifikanz zeigte sich jedoch erst in den immunhistochemischen Untersuchungen, die so auch von Yamamoto *et al.* bestätigt wird [206].

Die Summe dieser Erkenntnisse zeigt, dass LGR5 neben dem Magenkarzinom auch in einer Reihe anderer hepato-gastrointestinaler Karzinome eine Rolle in der Tumorigenese spielt. Da eine starke LGR5-Immunreaktivität im Kolorektalkarzinom und dem Adenokarzinom des Ösophagus mit einer schlechteren Überlebensprognose der Patienten einherging, könnte die LGR5-Expression zudem eine prognostische Aussagekraft besitzen [214,234,277]. Aufgrund der begrenzten Fallzahlen einzelner Entitäten wurde in dieser Studie keine statistische Analyse im Hinblick auf klinisch-pathologische Patientencharakteristika durchgeführt. Die Untersuchungen von Uchida und Kollegen zeigen aber,

dass die LGR5-Expression im kolorektalen Karzinom signifikant mit der lymphogenen und vaskulären Invasion, der Tumortiefe, den Lymphknotenmetastasen und dem UICC-Stadium korreliert [214].

Mit dem Versuchsansatz dieser Studie konnte der Nachweis erbracht werden, dass LGR5 in einer Vielzahl humaner hepato-gastrointestinaler Karzinome im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe signifikant verstärkt exprimiert wird. Basierend auf diesen Beobachtungen wird eine allgemeine tumorbiologische Relevanz des GPCRs im humanen Hepato-Gastrointestinaltrakt vermutet. Aktuellen Studien zur Folge besitzt LGR5 darüber hinaus auch eine prognostische Aussagekraft für einige Tumoren [206,234,265,295]. Dass es sich bei den LGR5-positiven Zellen um Stammzellen handelt, konnte bisher jedoch nur für das Magen- und Kolonkarzinom bestätigt werden, für alle weiteren Entitäten steht der Beweis noch aus [143]. Sollte dies aber der Fall sein, so könnte die gesteigerte Anzahl LGR5-exprimierender Zellen im neoplastischen Gewebe auf eine sich aktiv teilende LGR5-positive Subpopulation zurückgeführt werden, die entsprechend der Krebsstammzelltheorie letztendlich durch weitere Teilungen und Differenzierung die LGR5-negative heterogene Tumormasse bildet [37,143]. Ob die LGR5-Überexpression selbst zur Tumorprogression beiträgt oder schlicht ein Surrogatmarker ist, erfordert jedoch weitere Untersuchungen.

5.4.5 Die Funktion von LGR5 im Magenkarzinom

Die „*Hallmarks of Cancer*“ von Hanahan und Weinberg beschreiben acht biologische Eigenschaften, die sich humane Tumoren während ihrer schrittweisen Entwicklung aneignen. Die sechs zentralen Eigenschaften umfassen die Fähigkeit zur autokrinen Wachstumsstimulation, die Resistenz gegenüber Wachstumsinhibitoren, Apoptoseresistenz, das Potential zur replikativen Unsterblichkeit, die Neoangiogenese und die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Eine einzelne genetische Veränderung der Zelle kann gleichzeitig förderlich für mehrere dieser Fähigkeiten sein [6].

Funktionelle Tests mit den stabil transfizierten Magenkarzinomzelllinien MKN45 und MKN74 haben gezeigt, dass die Überexpression von LGR5 zum Tumor-Phänotyp beiträgt, indem sie die Resistenz gegenüber Apoptose erhöht und mit einer Steigerung der proliferativen, invasiven und migratorischen Eigenschaften der Zellen einhergeht.

Die funktionelle Heterogenität innerhalb eines Tumors wird auf eine kleine Untergruppe von Krebsstammzellen zurückgeführt, die ebenso wie normale Stammzellen in der Lage sind, sich selbst zu erneuern und vielfältig zu differenzieren [298]. Krebsstammzellen spielen eine zentrale Rolle in der Tumori-
initiation, Invasion, Metastasierung und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, ihre Inaktivierung könnte daher eine erfolgversprechende Strategie zur Behandlung von Krebs darstellen [36]. Für eine zielgerichtete Therapie wäre es jedoch wichtig diese Zellen anhand eines definitiven Krebsstammzellmarkers zu identifizieren, der für ihre tumorbiologischen Funktionen essentiell ist. Vorhergehende Studien haben mit aufwendigen Verfahren bereits nachgewiesen, dass es sich bei den LGR5-positiven Zellen im Magen um Stammzellen bzw. Krebsstammzellen handelt, die entsprechend der Krebsstammzelltheorie nach Transplantation in eine immundefiziente Maus Tumoren mit vollständiger Heterogenität bilden können [221,294,298,299]. Welche Funktion LGR5 in zell-
physiologischen und -pathologischen Prozessen des Magenkarzinoms einnimmt, wurde in dieser Studie ergründet.

Entgegen der konventionellen Auffassung, dass Stammzellen und Krebsstammzellen proliferativ inaktiv sind [275] konnte bereits mithilfe des Proliferationsmarkers Ki67 gezeigt werden, dass sich einige LGR5-positive Zellen aktiv teilen (siehe Abschnitt 4.3.1.4). Die zellbasierten Studien belegen außerdem einen positiven Zusammenhang der LGR5-Expression mit der Proliferationsfähigkeit von Magenkarzinomzellen. Gegenüber den Leervektor-Kontrollen weisen die LGR5-überexprimierenden MKN45- und MKN74-Zellen eine deutlich erhöhte Proliferationsrate und eine signifikant verkürzte Verdopplungszeit auf. Diese Ergebnisse werden durch Studien von Barker und Kollegen im Mausmodell untermauert, in denen sich die LGR5-positiven, multipotenten Stammzellen der Magendrüsen aktiv teilten und so für die gewebstypische schnelle Zellerneuerung sorgten [221]. Die Ki67-Doppelfärbungen deuten darauf hin, dass im Magenkarzinom eine Untergruppe sich aktiv teilender, LGR5-positiver Krebsstammzellen existiert, die für das rapide Tumorwachstum verantwortlich sein könnte. Die Expression von LGR5 hat dabei möglicherweise einen direkten Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen.

Einer der wichtigsten Prognosefaktoren des Magenkarzinoms ist die lymphogene Metastasierung [151]. Vorgänge wie die Migration und Invasion der Tumorzellen bilden dabei eine Grundvoraussetzung [236]. Doch nur Tumorzellen, die in der Lage sind, ihre Zellkontakte aufzulösen, können migrieren und durch die Basalmembran invadieren [6]. Dieser Prozess, der als epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet wird, gilt als entscheidendes Ereignis im metastatischen Prozess und ist eng mit dem Krebsstammzell-Phänotyp assoziiert [50,51]. Aktuelle Studien bekräftigen darüber hinaus sogar ein Konzept metastatischer Krebsstammzellen [54]. Hermann und Kollegen berichten beispielsweise von einer Stammzellpopulation an der invasiven Front des Pankreaskarzinoms, die eine signifikant höhere migratorische Aktivität zeigt und mit der Tumormetastasierung in diesen Patienten korreliert [279]. In den hier untersuchten Magenkarzinomzelllinien wirkt sich die Überexpression von LGR5 förderlich auf die Migration und Invasion aus. Die Analysen der Zelllinie MKN45 zeigen beispielsweise, dass die LGR5-transfizierten Zellen (LGR5/MKN45) im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (Vektor/MKN45) signifikant schneller migrieren, zugleich ist ihr Invasionspotential doppelt so hoch. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Uchida und Kollegen, die im kolorektalen Karzinom eine signifikante Assoziation der LGR5-Überexpression mit der lymphogenen und vaskulären Invasion, Tumortiefe, Lymphknotenmetastasierung und dem Tumorstadium zeigen [214].

Aufgrund aktueller Forschungsergebnisse wird angenommen, dass Krebsstammzellen die Ursache der häufig beobachteten Tumorrezidive darstellen [38]. Sie sind resistenter gegenüber chemotherapeutischen Behandlungsstrategien und können zudem den vollständigen Tumor nach Beendigung der Therapie wiederherstellen [37,38,40]. Die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wird dabei auf den Ruhezustand bzw. die langsame Proliferation der Krebsstammzellen zurückgeführt [276].

In dem hier verwendeten Testsystem wurde die durch Mitomycin C (MMC) induzierte Apoptose in Leervektor-Kontrollen und LGR5-überexprimierenden Zellen bestimmt. MMC wird als Chemotherapeutikum im fortgeschrittenen Magenkarzinom eingesetzt, da es die DNA-Replikation, RNA-Replikation und Proteinsynthese hemmt und so zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt

[148,300]. Da Park und Kollegen zeigen, dass MMC die Apoptose im Magenkarzinom in einer Caspase-abhängigen und Fas/CD95-unabhängigen Weise induziert [301], wurde der programmierte Zelltod hier durch Bestimmung der Caspase-3 und -7 ermittelt. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass LGR5-überexprimierende Magenkarzinomzellen trotz erhöhter Proliferationsrate eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Apoptose-induzierenden Chemotherapeutika besitzen. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass die Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Behandlungen nicht nur, wie bisher angenommen, auf den Ruhezustand der Krebsstammzellen [276], sondern möglicherweise auf aktive Mechanismen zurückzuführen ist [36]. Über diese Mechanismen ist bislang noch wenig bekannt. Jedoch exprimieren Stammzellen oft höhere Level von Resistenzproteinen wie ABCG2, ABCG5 (*ATP-binding cassette half-transporter* Proteine) und mDR1 (*multidrug resistance protein 1*) Transportern, die zur Widerstandsfähigkeit von metastatischen Tumoren gegenüber Chemotherapeutika beitragen könnten [302].

Im Allgemeinen fiel der Effekt der LGR5-Überexpression auf die funktionellen Eigenschaften der Zelllinie MKN74 stets etwas geringer im Vergleich zu der Zelllinie MKN45 aus, obwohl sie mit einer etwa 60.700-fachen Steigerung eine deutlich höhere LGR5 mRNA-Expression als MKN45 (45-fach höher) aufwies (siehe Abbildung 4.27). Dieser Umstand könnte durch sogenannte posttranskriptionelle Regulationsmechanismen erklärt werden, die möglicherweise aufgrund der unverhältnismäßig hohen LGR5-Expression in der Zelllinie MKN74 induziert wurden. Da der Prozess der Proteinsynthese sehr viel zelluläre Energie erfordert, wird die Proteinexpression, z. B. über posttranskriptionelle Regulation, dem tatsächlichen Bedarf der Zelle angepasst [303]. Dabei kann es beispielsweise mithilfe von MikroRNAs (miRNAs), siRNAs (*small interfering RNAs*) oder RNA-bindenden Proteinen zu einem intensiven Abbau der Ziel-mRNA kommen und so die Translation des Proteins verhindert oder reduziert werden [304]. Diese Hypothese wird im Western Blot weiter unterstützt, da hier trotz nachgewiesener hoher mRNA-Expression nur eine geringe Steigerung der LGR5-Proteinexpression in LGR5-transfizierten gegenüber Leervektor-transfizierten MKN74-Zellen nachweisbar ist (siehe Abbildung 4.17). Es wird daher angenommen, dass der posttranskriptionelle Abbau der LGR5-mRNA in

LGR5-transfizierten MKN74-Zellen letztendlich in einem niedrigeren Proteinlevel als das der LGR5-transfizierten MKN45-Zellen mündet und so den geringeren funktionellen Effekt in den zellbasierten Assays erklärt. Prinzipiell sollte ebenfalls berücksichtigt werden, dass sich verschiedene Magenkarzinomzelllinien nicht nur in ihrer Transfektionseffizienz, sondern auch in der Ausprägung der durch das transfizierte Gen induzierten funktionellen Eigenschaften unterscheiden können.

Mit den hier vorliegenden funktionellen Analysen konnte nun erstmals gezeigt werden, dass LGR5 möglicherweise einen direkten Einfluss auf den Tumor-Phänotyp hat. Der GPCR könnte durch die Steigerung der Proliferation, Migration und Invasion zur Tumorprogression und Metastasierung beitragen und durch Erhöhung der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika das Überleben der Zellen sichern. Entsprechend der aktuellen Krebsstammzellhypothese ist es denkbar, dass die Magenkarzinomzellen nach Induktion der LGR5-Expression ihre Stammzeleigenschaften wiedererlangen und so den beobachteten Phänotyp bedingen [39]. Die hier verwendeten stabil-transfizierten Magenkarzinomzellen könnten als Modellsystem dienen, um Strategien zur therapeutischen Intervention im Magenkarzinom zu entwickeln.

Im Gegensatz zu den Erkenntnissen dieser Studie, berichten Walker und Kollegen allerdings, dass die LGR5-Expression im kolorektalen Karzinom nicht zum Tumor-Phänotyp beiträgt. Die Überexpression von LGR5 führte in den von ihnen verwendeten Zelllinien zu einer höheren Zelladhäsion und geringeren Tumorigenität und erst der Verlust von LGR5 induzierte eine Tumorzellinvasion [226]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse in zwei recht ähnlichen Testsystemen machen deutlich, dass Zellkulturexperimente immer mit Vorsicht zu bewerten sind. Problematisch bei der Charakterisierung von Krebsstammzellen solider Tumoren ist ihre Trennung von der umliegenden Zellpopulation [305]. Die ursprüngliche Tumor-Mikroumgebung hat vermutlich tiefgreifenden Einfluss auf den tumorigenen Prozess [36] und trägt auch zu der Erhaltung des Stammzell-Phänotyps der Zellen bei [208]. Der Einsatz von Tumorzelllinien trägt daher immer das Risiko, irreführende Ergebnisse zu generieren.

Da trotz intensiver Forschungen bislang noch sehr wenig über die genaue Funktion von LGR5 bekannt ist, sind weiterführende Studien notwendig, um die Funktion und Regulation des Stammzellmarkers umfassend zu ergründen. In zukünftigen Arbeiten ist geplant, die Rolle von LGR5 im Kontext der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) zu überprüfen. Da in der vorliegenden Studie bereits eine Steigerung der invasiven und migratorischen Eigenschaften der Zellen durch eine LGR5-Überexpression dokumentiert werden konnte, scheint dieser Ansatz vielversprechend. Des Weiteren soll eingehend geprüft werden, ob die potentiellen Stammzellmarker LGR5 und ADAM17 über eine *triple-membrane-passing*-Signaltransduktionskaskade miteinander verknüpft und als Therapieziele geeignet sind. Mittelpunkt der Studien ist die Analyse der Genregulation (Transkriptionsfaktor, Methylierung, miRNA), Signaltransduktion und zellbiologischen Funktion von LGR5 und ADAM17, der Nachweis einer Interaktion der beiden Proteine miteinander und die Untersuchung des LGR5-Liganden R-Spondin. So sollen neue Erkenntnisse über tumorbiologisch relevante Signalwege des Magenkarzinoms gewonnen werden, um die zellbiologische Funktion dieser putativen Tumorstammzellmarker besser verstehen zu können.

5.4.6 LGR5 im Wnt-Signalweg

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg spielt eine grundlegende Rolle in der regelgerechten Entwicklung, der Selbsterhaltung adulter Stammzellen sowie bei der Tumorentstehung und dem Tumorentstehung [95,259,306]. Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass LGR5 als Rezeptor der Stammzellfaktoren R-Spondin 1-4 in der Lage ist, Signale des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zu verstärken [208-210].

In Folge der Kostimulation mit den Liganden R-Spondin 1 und Wnt3a bildet LGR5 einen Superkomplex mit den Wnt-Korezeptoren LRP6 und FZD5, der internalisiert und degradiert wird. LGR5 wird so zu einem zentralen Element des Wnt-Signalkomplexes, der seine Effekte durch eine komplexe intrazelluläre Kaskade ausübt, die letztendlich zur Akkumulation von β -Catenin im Zellkern führt [259]. Da die Stimulation des Wnt-Signalwegs durch die Wachstumsfaktoren R-Spondin einen massiven Anstieg der epithelialen Proliferation im Intestinaltrakt induziert, führt die Fehlregulation dieses Signalwegs zur Entstehung humaner Karzinome [97,307,308]. Aufgrund der neuen Erkenntnisse wird

vermutet, dass LGR5 über die Bindung von R-Spondin 1 und die damit einhergehende Verstärkung von Wnt-Signalen an der Tumorigenese beteiligt ist. Zusätzlich sind aktivierende Mutationen, vorherrschend durch den Funktionsverlust des APC-Tumorsuppressorgens oder okogene Mutationen von β -Catenin, verantwortlich für die Bildung von Adenomen im Gastrointestinaltrakt [220,309,310]. Studien belegen, dass LGR5 in hepatozellulären Karzinomen mit einer β -Catenin-Mutation überexprimiert wird [206]. Des Weiteren wurde im kolorektalen Karzinom eine Korrelation der Expression von LGR5 und nukleärem β -Catenin festgestellt [265]. Doch der Wnt-Signalweg ist auch für die Stammzellen des Magens essentiell, da aktiviertes β -Catenin zum Wiedereintritt inaktiver Stammzellen in den Zellzyklus führt [311,312]. Barker und Kollegen berichten außerdem, dass LGR5-positive Stammzellen mit einer APC-Deletion den Ursprung von Wnt-gesteuerten Magenkarzinomen darstellen [221].

Es wird inzwischen auch angenommen, dass die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs eine EMT induzieren kann [313,314], die mit der Fähigkeit zur Migration, Invasion und Metastasierung verbunden ist [315]. Ersten Studien zur Folge könnte auch die LGR5-Expression positiv mit der EMT assoziiert sein [316].

LGR5 scheint als optionaler Wnt-Korezeptor und Wnt-Zielgen eine entscheidende Bedeutung für die Entstehung und Progression humaner Karzinome zu besitzen [259]. Ob die Überexpression von LGR5 selbst zur Tumorigenese beiträgt oder nur die Aktivierung des Wnt-Signalwegs widerspiegelt ist bisher noch nicht endgültig geklärt [226]. In zukünftigen Studien muss außerdem untersucht werden, ob LGR5 eine Rolle in der EMT spielt. Kürzlich wurde anhand humaner Kolonkarzinomzelllinien gezeigt, dass der Verlust von LGR5 zur Steigerung von Wnt-Signalen führt und die EMT und Tumorigenese fördert [226]. Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu allen bisherigen Beobachtungen. Daher muss geprüft werden, ob eine solch gegenläufige Funktion von LGR5 im Wnt-Signalweg überhaupt möglich ist.

Ausgehend von der Zielsetzung konnte im Rahmen dieser Arbeit die differentielle Expression von CXCL12, CXCR4, ADAM17, FZD7 und LGR5 sowohl zwischen Tumor- und Normalgewebe als auch zwischen Magenkarzinomgewebe von Patienten mit Lymphknotenmetastasen und Patienten ohne Lymphknotenmetastasen bestätigt werden. Des Weiteren wurde die klinisch-pathologische Relevanz der Kandidaten auf Proteinebene gezeigt. Die vaskuläre CXCR4-Expression korrelierte signifikant mit dem lokalen Tumorwachstum und dem UICC-Stadium, außerdem bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Proteinexpression von FZD7 und dem Patientenüberleben. Im Ergebnis dieser Untersuchungen konnten somit neue tumorbiologisch relevante Zielgene für das Magenkarzinom identifiziert werden, die in weiterführenden Studien als potentielle Therapietargets für die Diagnose und Behandlung des Magenkarzinoms überprüft werden können.

Die Untersuchungen der Expression und Funktion von LGR5 im zweiten Teil dieser Arbeit verhelfen zu einem besseren Verständnis der Entwicklung und Progression des Magenkarzinoms. Zusätzlich liefern die gewonnenen Erkenntnisse neue Einblicke in den sequentiellen Prozess der gastralen Karzinogenese und der zugrunde liegenden Neuordnung des LGR5-positiven mutmaßlichen Stammzellkompartiments. Durch die Entdeckung unterschiedlicher LGR5-positiver Subpopulationen im Magenkarzinom können neue Hypothesen über deren funktionelle Bedeutung bei der Tumorinitiation, -progression und -invasion aufgestellt und in weiterführenden Studien überprüft werden. Die zellbasierten Analysen stabil transfizierter Magenkarzinomzelllinien zeigen, dass eine Überexpression von LGR5 zu einem Apoptose-resistenteren Phänotyp führt und mit einer Steigerung der proliferativen, invasiven und migratorischen Eigenschaften der Zellen einhergeht. Diese stabilen Transfektanten können zukünftig als Modellsystem dienen, um neue Strategien zur therapeutischen Intervention im Magenkarzinom zu entwickeln. Weitere Expressionsanalysen deuten schließlich auf eine umfassende tumorbiologische Relevanz von LGR5 in einer Vielzahl hepato-gastrointestinaler Karzinome hin. Die so gewonnenen Erkenntnisse bestätigen die Bedeutung von LGR5 in der hepato-gastrointestinalen Tumorbiologie und liefern Hinweise auf seine Funktion als therapeutisches Zielgen im Magen. Es konnten alle zu Beginn dieser Doktorarbeit formulierten Ziele erreicht werden.

6 Zusammenfassung

Das Magenkarzinom stellt weltweit die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache dar [8]. Eine kurative Behandlung ist allerdings nur bei etwa einem Viertel aller Patienten möglich. Der Großteil kann lediglich palliativ reseziert und/oder chemotherapeutisch behandelt werden [5,8]. Daher ist die Suche nach neuen Therapietargets weiterhin von großer klinischer Relevanz. Hier sind insbesondere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) interessant, da sie mit über 900 Mitgliedern die größte Gruppe membranständiger Moleküle des Menschen darstellen und eine reichhaltige Auswahl potentieller Zielstrukturen bieten [55]. Ihre Beteiligung an humanen tumorbiologischen Prozessen wurde umfassend belegt [66-68,73]. Außerdem wirken bereits etwa 60 % aller zugelassenen Arzneimittel direkt oder indirekt auf GPCRs ein [59,61].

Ziel dieser Doktorarbeit war die systematische Überprüfung und Validierung differentiell exprimierter GPCRs und GPCR-bezogener Proteine, die als neue potentielle Therapieziele die Diagnose und Behandlung des Magenkarzinoms verbessern könnten.

In den transkriptionellen Untersuchungen mittels Real-time RT-PCR konnte eine differentielle Expression der Zielgene *CXCL12*, *CXCR4*, *FZD7*, *ADAM17* und *LGR5* im Magenkarzinom festgestellt werden. Diese sind im Tumor gegenüber dem Normalgewebe und in nodal-positiven gegenüber nodal-negativen Magenkarzinomen verstärkt exprimiert. Die anschließende Überprüfung der Zielproteine an einem Tissue Microarray Kollektiv aus 487 Magenkarzinomen ergab eine signifikante Korrelation der vaskulären CXCR4-Expression mit dem lokalen Tumorwachstum und dem UICC-Stadium. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von FZD7 mit einem signifikant kürzeren Patientenüberleben verbunden ist.

Der GPCR LGR5 gilt momentan als der selektivste und vielversprechendste Marker intestinaler Krebsstammzellen [226]. Nachdem LGR5 ursprünglich als Wnt-Zielgen im hepatozellulären Karzinom entdeckt wurde, konnte seine Überexpression auch in anderen Tumorentitäten wie dem Basalzell-, Kolon- und Ovarialkarzinom berichtet werden [66,206,213]. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde daher die Expression und Funktion des Stammzellmarkers LGR5 intensiver erforscht.

Doppelfärbungen von LGR5 mit CD44, Musashi-1, ADAM17 und dem Proliferationsmarker Ki67 wiesen die Existenz unterschiedlicher LGR5-positiver Subpopulationen im gesunden und neoplastischen Magen nach. Eine weitere immunhistochemische Analyse der LGR5-Expression an 100 Großflächenschnitten belegte eine Veränderung der Anzahl und histoanatomischen Lage LGR5-positiver Zellen während der gastralen Karzinogenese. Die Expression von LGR5 im Tumorzentrum und an der invasiven Front des Magenkarzinoms korrelierte signifikant mit dem lokalen Tumorwachstum, der nodalen Ausbreitung und dem UICC-Stadium. Interessanterweise hatten Patienten mit LGR5-positiven Magenkarzinomen außerdem eine kürzere mittlere Lebenserwartung als Patienten mit LGR5-negativen Tumoren.

Schließlich wurde auch die Verbreitung von LGR5 im Hepato-Gastrointestinaltrakt untersucht. Tatsächlich ist LGR5 auf transkriptioneller (Real-time RT-PCR) und translationaler Ebene (Immunhistochemie) in den Adenokarzinomen des Ösophagus, Magens, Pankreas, Kolon und Rektums sowie der Leber im Vergleich mit dem dazugehörigen Normalgewebe differentiell exprimiert.

In funktionellen Analysen der stabil transfizierten Magenkarzinomzelllinien MKN45 und MKN74 führte die Überexpression von LGR5 zu einer deutlich erhöhten Proliferationsrate und einer signifikant verkürzten Verdopplungszeit. Die LGR5-transfizierten MKN45-Zellen migrierten im Vergleich zur Kontrolle signifikant schneller und wiesen zudem ein doppelt so hohes Invasionspotential auf. Gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung zeigten LGR5-überexprimierende Zellen schließlich sogar einen Apoptose-resistenteren Phänotyp.

Die systematische Suche nach differentiell exprimierten GPCRs und GPCR-bezogenen Proteinen bestätigt die tumorbiologische Bedeutung von CXCL12, CXCR4, FZD7, ADAM17 und LGR5 im Magenkarzinom und liefert somit neue, potentielle Zielstrukturen für dessen Behandlung. Die Erkenntnisse über die Verbreitung, Lokalisation und Funktion des Stammzellmarkers LGR5 tragen zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Entstehung und Progression des Magenkarzinoms bei. LGR5 könnte daher als vielfältig einsetzbarer Biomarker die Identifizierung und Charakterisierung von Krebsstammzellpopulationen in hepato-gastrointestinalen Tumoren ermöglichen und so zur Entwicklung effektiver und zielgerichteter Krebstherapien führen. Weiterführende Studien sind nötig, um diese Optionen näher zu untersuchen.

7 Summary

Gastric carcinoma is the second most common cause of cancer-related deaths worldwide [8]. While only a quarter of all patients may receive curative treatment the vast majority has to be treated palliatively by resection and/or chemotherapy [5,8]. Therefore the identification of new therapeutic targets is of high priority. For this purpose G-protein-coupled receptors (GPCRs) proved to be prime candidates. With more than 900 members they constitute the largest family of human membrane-bound proteins, providing a comprehensive pool of potential target structures [55]. They are involved in a number of human tumorbiological processes [66-68,73] and about 60 % of all drugs currently used in medicine directly or indirectly target GPCRs [59,61].

The aim of this doctoral thesis was to systematically review and validate differentially expressed GPCRs and GPCR-related proteins which may serve as new potential therapeutic targets to improve the quality of diagnosis and treatment in gastric carcinoma.

Transcriptional experiments using real-time RT-PCR revealed a differential expression of CXCL12, CXCR4, FZD7, ADAM17 and LGR5 in gastric cancer specimens. These target genes were upregulated in malignant tissue compared to normal gastric mucosa and also in node-positive compared to node-negative gastric carcinoma. In a subsequent tissue micro array analysis comprising 487 gastric cancer cases, vascular CXCR4 expression was significantly associated with local tumor growth and UICC-stage. Furthermore, FZD7 expression in tumor specimens was significantly correlated with a shorter median survival of gastric cancer patients.

After all, LGR5 is currently considered to be the most selective and promising marker of intestinal cancer stem cells [226]. Following its identification as a Wnt-target gene in hepatocellular carcinoma, overexpression of LGR5 was also reported in other tumor entities like basal cell carcinoma, colon and ovarian carcinoma [66,206,213]. Therefore the expression and function of the stem cell marker LGR5 was intensively investigated in the second part of this thesis.

Double staining experiments investigating LGR5 expression together with CD44, Musashi-1, ADAM17 and the proliferation marker Ki67 revealed the

existence of different LGR5-positive subpopulations in neoplastic and non-neoplastic gastric mucosa. As demonstrated by further immunohistochemical studies comprising 100 whole mount tissue sections of intestinal type gastric cancer the number and histoanatomical distribution of LGR5-positive cells changed during gastric carcinogenesis. Notably the LGR5 expression at the tumor center and the invasion front correlated with tumor growth, nodal spread and UICC-stage. Furthermore, patients with LGR5-positive gastric cancers had a shorter median survival than patients with LGR5-negative tumors.

Finally the prevalence of LGR5 in the human gastrointestinal tract was also examined. LGR5 was differentially expressed on the transcriptional and translational level in adenocarcinomas of the oesophagus, pancreas, stomach, colon, rectum and the liver compared with the adjacent non-neoplastic tissue.

Performing functional analyses of the stably transfected gastric cancer cell lines MKN45 and MKN74, overexpression of LGR5 resulted in a clearly increased proliferation rate and a significantly shortened doubling time. LGR5-transfected MKN45 cells migrated significantly faster, displaying an invasion potential which was twice as high as of the control cells. Finally, LGR5-overexpressing cells even showed a more apoptosis resistant phenotype against chemotherapeutic treatment.

The systematic analysis of differentially expressed GPCRs and GPCR-related proteins confirmed a tumorbiological relevance of CXCL12, CXCR4, FZD7, ADAM17, and LGR5 in gastric cancer providing new potential therapeutic target structures. Insights of the prevalence, histoanatomical distribution, and function of the stem cell marker LGR5 led to a better understanding of molecular mechanisms in gastric cancer development and progression. LGR5 therefore may serve as a broadly applicable biomarker, facilitating the identification and characterization of cancer stem cell populations in hepato-gastrointestinal tumors and thus enable the development of more effective and targeted cancer therapies. These options have to be explored by further studies.

8 Literaturverzeichnis

- [1] E. Gaber und M. Wildner (2011) Sterblichkeit, Todesursachen und regionale Unterschiede. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 52. Berlin: Robert Koch-Institut.
- [2] P. Kaatsch, C. Spix, A. Katalinic, S. Hentschel, N. Baras *et al.* (2012) Krebs in Deutschland 2007/2008. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 8te Ausg. Berlin: Robert Koch-Institut.
- [3] U-N. Riede, M. Werner, H-E. Schäfer (2004) Allgemeine und spezielle Pathologie, 5. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 1236 p.
- [4] W. C. Hahn and R. A. Weinberg (2002) Rules for making human tumor cells. *N. Engl. J Med* 347: 1593-1603.
- [5] P. Boyle and B. Levin (2008) World Cancer Report 2008. Lyon: IARC Press. 512 p.
- [6] D. Hanahan and R. A. Weinberg (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674.
- [7] M. P. Ebert, R. Schmid, and C. Röcken (2007) Need for a paradigm shift in cancer prevention and clinical oncology. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 7: 1363-1367.
- [8] J. Ferlay, H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers *et al.* (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J Cancer* 127 (12): 2893-917.
- [9] B.W. Steward and P. Kleihues (2003) World Cancer Report. Lyon: IARC Press. 351 p.
- [10] P. Correa (1992) Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process- First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 52: 6735-6740.
- [11] T. Natori, M. Sata, M. Washida, Y. Hirata, R. Nagai *et al.* (2003) Nicotine enhances neovascularization and promotes tumor growth. *Mol. Cells* 16: 143-146.
- [12] P. Guilford, J. Hopkins, J. Harraway, M. McLeod, N. McLeod *et al.* (1998) E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 392: 402-405.
- [13] B. G. Jang and W. H. Kim (2011) Molecular pathology of gastric carcinoma. *Pathobiology* 78: 302-310.
- [14] N. Uemura, S. Okamoto, and S. Yamamoto (2002) H. pylori infection and the development of gastric cancer. *Keio J Med.* 51 (Suppl 2): 63-68.

-
- [15] A. Nomura, G. N. Stemmermann, P. H. Chyou, I. Kato, G. I. Perez-Perez *et al.* (1991) Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N. Engl. J Med.* 325: 1132-1136.
- [16] P. Ruggiero (2012) Helicobacter pylori infection: what's new. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25: 337-344.
- [17] M. J. Farthing (1998) Helicobacter pylori infection: an overview. *Br. Med. Bull.* 54: 1-6.
- [18] P. Correa, E. T. Fontham, J. C. Bravo, L. E. Bravo, B. Ruiz *et al.* (2000) Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-helicobacter pylori therapy. *J Natl. Cancer Inst.* 92: 1881-1888.
- [19] D. F. Docobo, C. M. Lozano, D. M. Fernandez, and M. G. Buezas (1989) [Carcinoma of the gastric stump after surgery of gastroduodenal ulcer]. *Rev. Esp. Enferm. Apar. Dig.* 75: 353-358.
- [20] J. Bornschein and P. Malfertheiner (2011) Gastric carcinogenesis. *Langenbecks Arch Surg.* 396: 729-742.
- [21] C. Wittekind and H.J. Meyer (2010) Union for International Cancer Control (UICC) TNM: Klassifikation maligner Tumoren, 7. Aufl. New York: Wiley-Liss. 336 p.
- [22] F. T. Bosman, F. Carneiro, R.H. Hruban, and N. D. Theise (2010) WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th Ed. Lyon: IARC Press. 418 p.
- [23] P. Lauren (1965) The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 64: 31-49.
- [24] S. Carl-McGrath, M. Ebert, and C. Röcken (2007) Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis. *Cancer Therapy* 5: 877-894.
- [25] H. T. Lynch, J. F. Lynch, and T. G. Shaw (2011) Hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Gastrointest. Cancer Res.* 4: 9-17.
- [26] D. L. Worthley, K. D. Phillips, N. Wayte, K. A. Schrader, S. Healey *et al.* (2012) Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. *Gut* 61: 774-779.
- [27] X. Hu, L. Cao, and Y. Yu (2012) [Lymph node metastasis and prognosis of gastric cancer without serosal invasion]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke. Za Zhi.* 15:133-136.
- [28] F. Lordick, A-B. Salah-Eddin und D. Arnold (2010) Biologie und zielgerichtete Therapie des Magenkarzinoms. Bremen: UNI-MED Verlag AG. 85 p.

-
- [29] J. Yoong, M. Michael, and T. Leong (2011) Targeted therapies for gastric cancer: current status. *Drugs* 71: 1367-1384.
- [30] K. Shitara, S. Morita, K. Fujitani, S. Kadowaki, N. Takiguchi *et al.* (2012) Combination chemotherapy with S-1 plus cisplatin for gastric cancer that recurs after adjuvant chemotherapy with S-1: multi-institutional retrospective analysis. *Gastric. Cancer* 15: 245-251.
- [31] J. Cohnheim (1875) Congenitales, quergestreiftes Muskelsarkom der Nieren. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 65: 64-69.
- [32] K. Polyak and W. C. Hahn (2006) Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat. Med* 12: 296-300.
- [33] S. J. Morrison and J. Kimble (2006) Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441: 1068-1074.
- [34] I. Alkatout and H. Kalthoff (2008) Tumor stem cells: How to Define Them and How to Find Them? In: T. Bosch editor. *Stem Cells: From Hydra to Man*. Berlin: Springer Verlag. pp. 165-187.
- [35] R. G. Vries, M. Huch, and H. Clevers (2010) Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol. Oncol.* 4: 373-384.
- [36] J. E. Visvader and G. J. Lindeman (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* 8: 755-768.
- [37] R. W. Cho and M. F. Clarke (2008) Recent advances in cancer stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18: 48-53.
- [38] N. A. Lobo, Y. Shimono, D. Qian, and M. F. Clarke (2007) The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 675-699.
- [39] R. Bjerkvig, B. B. Tysnes, K. S. Aboody, J. Najbauer, and A. J. Terzis (2005) Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat. Rev. Cancer* 5: 899-904.
- [40] A. Singh and J. Settleman (2010) EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29: 4741-4751.
- [41] C. J. Creighton, X. Li, M. Landis, J. M. Dixon, V. M. Neumeister *et al.* (2009) Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 13820-13825.

-
- [42] T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111.
- [43] C. Wu and B. A. Alman (2008) Side population cells in human cancers. *Cancer Lett.* 268: 1-9.
- [44] J. Kalabis, K. Oyama, T. Okawa, H. Nakagawa, C. Z. Michaylira *et al.* (2008) A subpopulation of mouse esophageal basal cells has properties of stem cells with the capacity for self-renewal and lineage specification. *J Clin. Invest* 118: 3860-3869.
- [45] A. Asakura, P. Seale, A. Girgis-Gabardo, and M. A. Rudnicki (2002) Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 159: 123-134.
- [46] H. Oh, S. B. Bradfute, T. D. Gallardo, T. Nakamura, V. Gaussin *et al.* (2003) Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 12313-12318.
- [47] A. J. Alvi, H. Clayton, C. Joshi, T. Enver, A. Ashworth *et al.* (2003) Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast Cancer Res.* 5: R1-R8.
- [48] G. G. Wulf, K. L. Luo, K. A. Jackson, M. K. Brenner, and M. A. Goodell (2003) Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* 88: 368-378.
- [49] C. Hirschmann-Jax, A. E. Foster, G. G. Wulf, J. G. Nuchtern, T. W. Jax *et al.* (2004) A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 14228-14233.
- [50] S. A. Mani, W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan *et al.* (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704-715.
- [51] A. P. Morel, M. Lievre, C. Thomas, G. Hinkal, S. Ansieau *et al.* (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS. One.* 3: e2888.
- [52] C. Scheel and R. A. Weinberg (2012) Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Semin. Cancer Biol.* In press.
- [53] D. Kong, Y. Li, Z. Wang, and F. H. Sarkar (2011) Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers. (Basel)* 3: 716-729.
- [54] T. Brabletz, A. Jung, S. Spaderna, F. Hlubek, and T. Kirchner (2005) Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 5: 744-749.

-
- [55] R. Lappano and M. Maggiolini (2011) G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10: 47-60.
- [56] R. M. Eglén and T. Reisine (2009) New insights into GPCR function: implications for HTS. *Methods Mol. Biol.* 552: 1-13.
- [57] R. T. Dorsam and J. S. Gutkind (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7: 79-94.
- [58] R. Rozenfeld and L. A. Devi (2011) Exploring a role for heteromerization in GPCR signalling specificity. *Biochem. J* 433: 11-18.
- [59] M. C. Lagerström and H. B. Schiöth (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7: 339-357.
- [60] R. Fredriksson, M. C. Lagerström, L. G. Lundin, and H. B. Schiöth (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63: 1256-1272.
- [61] K. Lundström (2009) An overview on GPCRs and drug discovery: structure-based drug design and structural biology on GPCRs. *Methods Mol. Biol.* 552: 51-66.
- [62] K. L. Pierce, R. T. Premont, and R. J. Lefkowitz (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 639-650.
- [63] J. P. Vilardaga, M. Bünemann, T. N. Feinstein, N. Lambert, V. O. Nikolaev *et al.* (2009) GPCR and G proteins: drug efficacy and activation in live cells. *Mol. Endocrinol.* 23: 590-599.
- [64] B. A. Teicher and S. P. Fricker (2010) CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* 16: 2927-2931.
- [65] D. R. Herr (2012) Potential use of G protein-coupled receptor-blocking monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancers. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 297: 45-81.
- [66] T. McClanahan, S. Koseoglu, K. Smith, J. Grein, E. Gustafson *et al.* (2006) Identification of overexpression of orphan G protein-coupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors. *Cancer Biol. Ther.* 5: 419-426.
- [67] H. J. Lee, B. Wall, and S. Chen (2008) G-protein-coupled receptors and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21: 415-428.
- [68] S. Li, S. Huang, and S. B. Peng (2005) Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression. *Int. J. Oncol.* 27: 1329-1339.

-
- [69] I. Cohen, M. Maoz, H. Turm, S. Grisaru-Granovsky, B. Maly *et al.* (2010) Etk/Bmx regulates proteinase-activated-receptor1 (PAR1) in breast cancer invasion: signaling partners, hierarchy and physiological significance. *PLoS. One.* 5: e11135.
- [70] Y. Daaka (2004) G proteins in cancer: the prostate cancer paradigm. *Sci. STKE.* 212: re2.
- [71] X. F. Zhang, Q. Z. Dong, Y. H. Xue, H. J. Zhou, Q. H. Ye *et al.* (2011) [High expression of thrombin receptor PAR1 in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma in early stage]. *Zhonghua Gan Zang. Bing. Za Zhi.* 19: 266-270.
- [72] R. A. Oyesanya, S. Greenbaum, D. Dang, Z. Lee, A. Mukherjee *et al.* (2010) Differential requirement of the epidermal growth factor receptor for G protein-mediated activation of transcription factors by lysophosphatidic acid. *Mol. Cancer* 9: 8.
- [73] B. D. Spiegelberg and H. E. Hamm (2007) Roles of G-protein-coupled receptor signaling in cancer biology and gene transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17: 40-44.
- [74] W. K. Wu, C. H. Cho, C. W. Lee, D. Fan, K. Wu *et al.* (2010) Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. *Cancer Lett.* 295: 144-153.
- [75] L. Qiao and B. C. Wong (2009) Role of Notch signaling in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 30: 1979-1986.
- [76] M. Katoh and M. Katoh (2007) Notch signaling in gastrointestinal tract (review). *Int. J. Oncol.* 30: 247-251.
- [77] J. Pancewicz and C. Nicot (2011) Current views on the role of Notch signaling and the pathogenesis of human leukemia. *BMC. Cancer* 11: 502.
- [78] K. Vo, B. Amarasinghe, K. Washington, A. Gonzalez, J. Berlin *et al.* (2011) Targeting notch pathway enhances rapamycin antitumor activity in pancreas cancers through PTEN phosphorylation. *Mol. Cancer* 10: 138.
- [79] D. Ma, X. Dong, S. Zang, R. Ma, P. Zhao *et al.* (2011) Aberrant expression and clinical correlation of Notch signaling molecules in breast cancer of Chinese population. *Asia Pac. J Clin. Oncol.* 7: 385-391.
- [80] Z. Wang, Y. Li, A. Ahmad, S. Banerjee, A. S. Azmi *et al.* (2011) Down-regulation of Notch-1 is associated with Akt and FoxM1 in inducing cell growth inhibition and apoptosis in prostate cancer cells. *J Cell Biochem.* 112: 78-88.

-
- [81] R. Fan, P. Chen, D. Zhao, J. L. Tong, J. Li *et al.* (2011) Cooperation of deregulated Notch signaling and Ras pathway in human hepatocarcinogenesis. *J Mol. Histol.* 42: 473-481.
- [82] T. T. Maliekal, J. Bajaj, V. Giri, D. Subramanyam, and S. Krishna (2008) The role of Notch signaling in human cervical cancer: implications for solid tumors. *Oncogene* 27: 5110-5114.
- [83] U. Koch and F. Radtke (2011) Notch in T-ALL: new players in a complex disease. *Trends Immunol.* 32: 434-442.
- [84] T. S. Yeh, C. W. Wu, K. W. Hsu, W. J. Liao, M. C. Yang *et al.* (2009) The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2, *Cancer Res.* 69: 5039-5048.
- [85] S. Brabletz, O. Schmalhofer, and T. Brabletz (2009) Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *J. Pathol.* 217: 307-317.
- [86] J. Dai, D. Ma, S. Zang, D. Guo, X. Qu *et al.* (2009) Cross-talk between Notch and EGFR signaling in human breast cancer cells. *Cancer Invest* 27: 533-540.
- [87] H. Sade, S. Krishna, and A. Sarin (2004) The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells. *J Biol. Chem.* 279: 2937-2944.
- [88] Z. Wang, S. Banerjee, Y. Li, K. M. Rahman, Y. Zhang *et al.* (2006) Down-regulation of notch-1 inhibits invasion by inactivation of nuclear factor-kappaB, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 66: 2778-2784.
- [89] S. Fre, S. K. Pallavi, M. Huyghe, M. Lae, K. P. Janssen *et al.* (2009) Notch and Wnt signals cooperatively control cell proliferation and tumorigenesis in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 6309-6314.
- [90] B. P. Imbimbo (2008) Therapeutic potential of gamma-secretase inhibitors and modulators. *Curr. Top. Med Chem.* 8: 54-61.
- [91] R. Nusse (2005) Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* 15: 28-32.
- [92] T. D. King, M. J. Suto, and Y. Li (2012) The Wnt/beta-catenin signaling pathway: a potential therapeutic target in the treatment of triple negative breast cancer. *J Cell Biochem.* 113: 13-18.
- [93] E. M. de Sousa, L. Vermeulen, D. Richel, and J. P. Medema (2011) Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells. *Clin. Cancer Res.* 17: 647-653.

-
- [94] K. Kokolus and M. J. Nemeth (2010) Non-canonical Wnt signaling pathways in hematopoiesis. *Immunol. Res.* 46: 155-164.
- [95] B. T. MacDonald, K. Tamai, and X. He (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17: 9-26.
- [96] R. H. Giles, J. H. van Es, and H. Clevers (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1653: 1-24.
- [97] S. Radulescu, R. A. Ridgway, J. Cordero, D. Athineos, P. Salgueiro *et al.* (2012) Acute WNT signalling activation perturbs differentiation within the adult stomach and rapidly leads to tumour formation. *Oncogene*. In press.
- [98] K. R. Brennan and A. M. Brown (2004) Wnt proteins in mammary development and cancer. *J Mammary. Gland. Biol. Neoplasia*. 9: 119-131.
- [99] M. M. Taketo (2004) Shutting down Wnt signal-activated cancer. *Nat. Genet.* 36: 320-322.
- [100] E. R. Fearon (2011) Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol* 6: 479-507.
- [101] J. C. Curtin and M. V. Lorenzi (2010) Drug discovery approaches to target Wnt signaling in cancer stem cells. *Oncotarget*. 1: 563-577.
- [102] W. Han and H. W. Lo (2012) Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer Lett.* 318: 124-134.
- [103] R. Bianco, D. Melisi, F. Ciardiello, and G. Tortora (2006) Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. *Eur. J Cancer* 42: 290-294.
- [104] I. Alroy and Y. Yarden (1997) The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.* 410: 83-86.
- [105] R. Pai and A. Tarnawski (1998) Signal transduction cascades triggered by EGF receptor activation: relevance to gastric injury repair and ulcer healing. *Dig. Dis. Sci.* 43: 14S-22S.
- [106] J. Boonstra, P. Rijken, B. Humbel, F. Cremers, A. Verkleij *et al.* (1995) The epidermal growth factor. *Cell Biol. Int.* 19: 413-430.
- [107] Z. Liu, L. Liu, M. Li, Z. Wang, L. Feng *et al.* (2011) Epidermal growth factor receptor mutation in gastric cancer. *Pathology* 43: 234-238.

-
- [108] S. A. Eccles (2011) The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int. J. Dev. Biol.* 55: 685-696.
- [109] S. Toyooka, T. Mitsudomi, J. Soh, K. Aokage, M. Yamane *et al.* (2011) Molecular oncology of lung cancer. *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 59: 527-537.
- [110] T. Winder and H. J. Lenz (2010) Molecular predictive and prognostic markers in colon cancer. *Cancer Treat. Rev.* 36: 550-556.
- [111] D. Matthaios, P. Zarogoulidis, I. Balgouranidou, E. Chatzaki, and S. Kakolyris (2011) Molecular pathogenesis of pancreatic cancer and clinical perspectives. *Oncology* 81: 259-272.
- [112] H. K. Gan, A. H. Kaye, and R. B. Luwor (2009) The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin. Neurosci.* 16: 748-754.
- [113] H. W. Lo and M. C. Hung (2007) Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br. J. Cancer* 96 Suppl: R16-R20.
- [114] H. W. Lo (2010) EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* 3: 37-52.
- [115] Y. Yarden and B. Z. Shilo (2007) SnapShot: EGFR signaling pathway. *Cell* 131: 1018.
- [116] Y. Yarden and M. X. Sliwkowski (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 127-137.
- [117] S. K. Muthuswamy, M. Gilman, and J. S. Brugge (1999) Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol. Cell Biol.* 19: 6845-6857.
- [118] A. Stenzinger, M. von Winterfeld, S. Aulmann, A. Warth, W. Weichert *et al.* (2012) Quantitative analysis of diagnostic guidelines for HER2-status assessment. *J Mol. Diagn.* 14: 199-205.
- [119] C. Gravalos and A. Jimeno (2008) HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann. Oncol.* 19: 1523-1529.
- [120] L. Bayouhd, M. Afrit, O. Daldoul, M. Zarrad, and H. Boussen (2012) [Trastuzumab (herceptin) for the medical treatment of breast cancer]. *Tunis Med* 90: 6-12.
- [121] A. A. Adjei (2001) Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl. Cancer Inst.* 93: 1062-1074.

-
- [122] H. Miki, M. Ohmori, A. O. Perantoni, and T. Enomoto (1991) K-ras activation in gastric epithelial tumors in Japanese. *Cancer Lett.* 58: 107-113.
- [123] J. Meza-Junco, H. J. Au, and M. B. Sawyer (2009) Trastuzumab for gastric cancer. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 9: 1543-1551.
- [124] D. M. Jackman, V. A. Miller, L. A. Cioffredi, B. Y. Yeap, P. A. Janne *et al.* (2009) Impact of epidermal growth factor receptor and KRAS mutations on clinical outcomes in previously untreated non-small cell lung cancer patients: results of an online tumor registry of clinical trials. *Clin. Cancer Res.* 15: 5267-5273.
- [125] H. Daub, F. U. Weiss, C. Wallasch, and A. Ullrich (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379: 557-560.
- [126] O. M. Fischer, S. Hart, A. Gschwind, and A. Ullrich (2003) EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 1203-1208.
- [127] N. Prenzel, E. Zwick, H. Daub, M. Leserer, R. Abraham *et al.* (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402: 884-888.
- [128] A. Gschwind, S. Hart, O. M. Fischer, and A. Ullrich (2003) TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J* 22: 2411-2421.
- [129] C. Wallasch, J. E. Crabtree, D. Bevec, P. A. Robinson, H. Wagner *et al.* (2002) Helicobacter pylori-stimulated EGF receptor transactivation requires metalloprotease cleavage of HB-EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295: 695-701.
- [130] L. Yang, Y. F. Ping, X. Yu, F. Qian, Z. J. Guo *et al.* (2011) Gastric cancer stem-like cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype. *Cancer Lett.* 310: 46-52.
- [131] B. Ingold, S. Schulz, J. Budczies, U. Neumann, M. P. Ebert *et al.* (2009) The role of vascular CXCR4 expression in colorectal carcinoma. *Histopathology* 55: 576-586.
- [132] B. Ingold, E. Simon, U. Ungethüm, R. J. Kuban, B. M. Müller *et al.* (2010) Vascular CXCR4 expression - a novel antiangiogenic target in gastric cancer? *PLoS. One.* 5: e10087.
- [133] R. Schmuck, V. Warneke, H. M. Behrens, E. Simon, W. Weichert *et al.* (2011) Genotypic and phenotypic characterization of side population of gastric cancer cell lines. *Am J Pathol.* 178: 1792-1804.

-
- [134] T. B. Morrison, Y. Ma, J. H. Weis, and J. J. Weis (1999) Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring of PCR. *J Clin. Microbiol.* 37: 987-992.
- [135] M. Alameh, M. Jean, D. Dejesus, M. D. Buschmann, and A. Merzouki (2010) Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing. *Int. J Nanomedicine.* 5: 473-481.
- [136] R. Kumar, S. K. Singh, A. A. Koshkin, V. K. Rajwanshi, M. Meldgaard *et al.* (1998) The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 2219-2222.
- [137] C. Rubie, K. Kempf, J. Hans, T. Su, B. Tilton *et al.* (2005) Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol. Cell Probes* 19: 101-109.
- [138] J. Vandesompele, P. K. De, F. Pattyn, B. Poppe, R. N. Van *et al.* (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: RESEARCH0034.
- [139] H. W. Rho, B. C. Lee, E. S. Choi, I. J. Choi, Y. S. Lee *et al.* (2010) Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR. *BMC. Cancer* 10: 240.
- [140] F. Haller, B. Kulle, S. Schwager, B. Gunawan, H. A. von Heydebreck *et al.* (2004) Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization. *Anal. Biochem.* 335: 1-9.
- [141] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 193: 265-275.
- [142] U. K. Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- [143] N. Barker and H. Clevers (2010) Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology* 138: 1681-1696.
- [144] J. Kononen, L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml *et al.* (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* 4: 844-847.

-
- [145] H. Moch, P. Schraml, L. Bubendorf, M. Mirlacher, J. Kononen *et al.* (1999) High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 154: 981-986.
- [146] T. Mosmann (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods* 65: 55-63.
- [147] S. A. Lakhani, A. Masud, K. Kuida, G. A. Porter, Jr., C. J. Booth *et al.* (2006) Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311: 847-851.
- [148] M. Tomasz (1995) Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem. Biol.* 2: 575-579.
- [149] O. Tchernitsa, A. Kasajima, R. Schäfer, R. J. Kuban, U. Ungethüm *et al.* (2010) Systematic evaluation of the miRNA-ome and its downstream effects on mRNA expression identifies gastric cancer progression. *J Pathol.* 222: 310-319.
- [150] E. Simon, D. Petke, C. Böger, H. M. Behrens, V. Warneke *et al.* (2012) The spatial distribution of LGR5+ cells correlates with gastric cancer progression. *PLoS. One.* 7: e35486.
- [151] T. Yokota, S. Ishiyama, T. Saito, S. Teshima, Y. Narushima *et al.* (2004) Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: a multiple logistic regression analysis. *Scand. J Gastroenterol.* 39: 380-384.
- [152] R. Pardal, M. F. Clarke, and S. J. Morrison (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3: 895-902.
- [153] O. Kollet, S. Shvitiel, Y. Q. Chen, J. Suriawinata, S. N. Thung *et al.* (2003) HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin. Invest* 112: 160-169.
- [154] M. Z. Ratajczak, M. Majka, M. Kucia, J. Drukala, Z. Pietrkowski *et al.* (2003) Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells* 21: 363-371.
- [155] M. Li and R. M. Ransohoff (2008) Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog. Neurobiol.* 84: 116-131.
- [156] D. Tseng, D. A. Vasquez-Medrano, and J. M. Brown (2011) Targeting SDF-1/CXCR4 to inhibit tumour vasculature for treatment of glioblastomas. *Br. J Cancer* 104: 1805-1809.

-
- [157] D. G. Duda, S. V. Kozin, N. D. Kirkpatrick, L. Xu, D. Fukumura *et al.* (2011) CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin. Cancer Res.* 17: 2074-2080.
- [158] G. Timotijevic, S. M. Mostarica, and D. Miljkovic (2012) CXCL12: Role in neuroinflammation. *Int. J Biochem. Cell Biol.* 44: 838-841.
- [159] X. Sun, G. Cheng, M. Hao, J. Zheng, X. Zhou *et al.* (2010) CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 29: 709-722.
- [160] F. Balkwill (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer* 4: 540-550.
- [161] M. M. Richert, K. S. Vaidya, C. N. Mills, D. Wong, W. Korz *et al.* (2009) Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone. *Oncol. Rep.* 21: 761-767.
- [162] Y. X. Sun, A. Schneider, Y. Jung, J. Wang, J. Dai *et al.* (2005) Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J Bone Miner. Res.* 20: 318-329.
- [163] E. H. Huang, B. Singh, M. Cristofanilli, J. Gelovani, C. Wei *et al.* (2009) A CXCR4 antagonist CTCE-9908 inhibits primary tumor growth and metastasis of breast cancer. *J Surg. Res.* 155: 231-236.
- [164] W. F. Ma, J. Du, L. P. Fu, R. Fang, H. Y. Chen *et al.* (2009) Phenotypic knockout of CXCR4 by a novel recombinant protein TAT/54R/KDEL inhibits tumors metastasis. *Mol. Cancer Res.* 7: 1613-1621.
- [165] G. Sciume, A. Santoni, and G. Bernardini (2010) Chemokines and glioma: invasion and more. *J Neuroimmunol.* 224: 8-12.
- [166] R. Du, K. V. Lu, C. Petritsch, P. Liu, R. Ganss *et al.* (2008) HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 13: 206-220.
- [167] P. M. De, M. A. Venneri, R. Galli, S. L. Sergi, L. S. Politi *et al.* (2005) Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8: 211-226.
- [168] J. Liu, S. Liao, Y. Huang, R. Samuel, T. Shi *et al.* (2011) PDGF-D improves drug delivery and efficacy via vascular normalization, but promotes lymphatic metastasis by activating CXCR4 in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 17: 3638-3648.

-
- [169] N. Cabioglu, J. Summy, C. Miller, N. U. Parikh, A. A. Sahin *et al.* (2005) CXCL-12/stromal cell-derived factor-1alpha transactivates HER2-neu in breast cancer cells by a novel pathway involving Src kinase activation. *Cancer Res.* 65: 6493-6497.
- [170] J. Wang, J. Wang, Y. Sun, W. Song, J. E. Nor *et al.* (2005) Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis. *Cell Signal.* 17: 1578-1592.
- [171] R. Matsusue, H. Kubo, S. Hisamori, K. Okoshi, H. Takagi *et al.* (2009) Hepatic stellate cells promote liver metastasis of colon cancer cells by the action of SDF-1/CXCR4 axis. *Ann. Surg. Oncol.* 16: 2645-2653.
- [172] S. Hiratsuka, D. G. Duda, Y. Huang, S. Goel, T. Sugiyama *et al.* (2011) C-X-C receptor type 4 promotes metastasis by activating p38 mitogen-activated protein kinase in myeloid differentiation antigen (Gr-1)-positive cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 302-307.
- [173] N. Lapteva, A. G. Yang, D. E. Sanders, R. W. Strube, and S. Y. Chen (2005) CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. *Cancer Gene Ther.* 12: 84-89.
- [174] L. Xu, D. G. Duda, E. di Tomaso, M. Ancukiewicz, D. C. Chung *et al.* (2009) Direct evidence that bevacizumab, an anti-VEGF antibody, up-regulates SDF1alpha, CXCR4, CXCL6, and neuropilin 1 in tumors from patients with rectal cancer. *Cancer Res.* 69: 7905-7910.
- [175] J. B. Rubin, A. L. Kung, R. S. Klein, J. A. Chan, Y. Sun *et al.* (2003) A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 13513-13518.
- [176] S. Porvasnik, N. Sakamoto, S. Kusmartsev, E. Eruslanov, W. J. Kim *et al.* (2009) Effects of CXCR4 antagonist CTCE-9908 on prostate tumor growth. *Prostate* 69: 1460-1469.
- [177] C. P. Blobel (2005) ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 32-43.
- [178] J. Scheller, A. Chalaris, C. Garbers, and S. Rose-John (2011) ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol.* 32: 380-387.
- [179] P. Boutet, S. Agüera-Gonzalez, S. Atkinson, C. J. Pennington, D. R. Edwards *et al.* (2009) Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein. *J Immunol.* 182: 49-53.

-
- [180] P. A. Kenny (2007) TACE: a new target in epidermal growth factor receptor dependent tumors. *Differentiation* 75: 800-808.
- [181] J. Arribas and C. Esselens (2009) ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases. *Curr. Pharm. Des* 15: 2319-2335.
- [182] K. D. Rodland, N. Bollinger, D. Ippolito, L. K. Opresko, R. J. Coffey *et al.* (2008) Multiple mechanisms are responsible for transactivation of the epidermal growth factor receptor in mammary epithelial cells. *J Biol. Chem.* 283: 31477-31487.
- [183] A. Baumgart, S. Seidl, P. Vlachou, L. Michel, N. Mitova *et al.* (2010) ADAM17 regulates epidermal growth factor receptor expression through the activation of Notch1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 70: 5368-5378.
- [184] J. N. Kyula, S. S. Van, J. Doherty, C. S. Fenning, D. B. Longley *et al.* (2010) Chemotherapy-induced activation of ADAM-17: a novel mechanism of drug resistance in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 16: 3378-3389.
- [185] A. Chalaris, N. Adam, C. Sina, P. Rosenstiel, J. Lehmann-Koch *et al.* (2010) Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp. Med.* 207: 1617-1624.
- [186] K. Brandl, L. Sun, C. Neppl, O. M. Siggs, S. M. Le Gall *et al.* (2010) MyD88 signaling in nonhematopoietic cells protects mice against induced colitis by regulating specific EGF receptor ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 19967-19972.
- [187] F. Blanchot-Jossic, A. Jarry, D. Masson, K. Bach-Ngohou, J. Paineau *et al.* (2005) Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J Pathol.* 207: 156-163.
- [188] J. Ringel, R. Jesnowski, N. Moniaux, J. Luttgies, J. Ringel *et al.* (2006) Aberrant expression of a disintegrin and metalloproteinase 17/tumor necrosis factor-alpha converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 66: 9045-9053.
- [189] G. Sinnathamby, J. Zerfass, J. Hafner, P. Block, Z. Nickens *et al.* (2011) ADAM metalloproteinase domain 17 (ADAM17) is naturally processed through major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and is a potential immunotherapeutic target in breast, ovarian and prostate cancers. *Clin. Exp. Immunol.* 163: 324-332.
- [190] X. Zheng, F. Jiang, M. Katakowski, Y. Lu, and M. Chopp (2012) ADAM17 promotes glioma cell malignant phenotype. *Mol. Carcinog.* 51: 150-164.

-
- [191] X. Zheng, F. Jiang, M. Katakowski, Z. G. Zhang, Q. E. Lu *et al.* (2009) ADAM17 promotes breast cancer cell malignant phenotype through EGFR-PI3K-AKT activation. *Cancer Biol. Ther.* 8: 1045-1054.
- [192] K. Yamamoto, A. Trad, A. Baumgart, L. Hüske, I. Lorenzen *et al.* (2012) A novel bispecific single-chain antibody for ADAM17 and CD3 induces T-cell mediated lysis of prostate cancer cells. *Biochem. J* 445:135-44.
- [193] S. M. Foord, T. I. Bonner, R. R. Neubig, E. M. Rosser, J. P. Pin *et al.* (2005) International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol. Rev.* 57: 279-288.
- [194] T. D. King, W. Zhang, M. J. Suto, and Y. Li (2012) Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy. *Cell Signal.* 24: 846-851.
- [195] S. Tanaka, T. Akiyoshi, M. Mori, J. R. Wands, and K. Sugimachi (1998) A novel frizzled gene identified in human esophageal carcinoma mediates APC/beta-catenin signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 10164-10169.
- [196] C. M. Li, M. Guo, A. Borczuk, C. A. Powell, M. Wei *et al.* (2002) Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am J Pathol.* 160: 2181-2190.
- [197] H. Kirikoshi, H. Sekihara, and M. Katoh (2001) Up-regulation of Frizzled-7 (FZD7) in human gastric cancer. *Int. J Oncol.* 19: 111-115.
- [198] N. I. Khan, K. F. Bradstock, and L. J. Bendall (2007) Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J Haematol.* 138: 338-348.
- [199] W. Dormeyer, D. van Hoof, S. R. Braam, A. J. Heck, C. L. Mummery *et al.* (2008) Plasma membrane proteomics of human embryonic stem cells and human embryonal carcinoma cells. *J Proteome. Res.* 7: 2936-2951.
- [200] K. Melchior, J. Weiss, H. Zaehres, Y. M. Kim, C. Lutzko *et al.* (2008) The WNT receptor FZD7 contributes to self-renewal signaling of human embryonic stem cells. *Biol. Chem.* 389: 897-903.
- [201] N. Pode-Shakked, O. Harari-Steinberg, Y. Haberman-Ziv, E. Rom-Gross, S. Bahar *et al.* (2011) Resistance or sensitivity of Wilms' tumor to anti-FZD7 antibody highlights the Wnt pathway as a possible therapeutic target. *Oncogene* 30: 1664-1680.
- [202] K. Ueno, M. Hiura, Y. Suehiro, S. Hazama, H. Hirata *et al.* (2008) Frizzled-7 as a potential therapeutic target in colorectal cancer. *Neoplasia.* 10: 697-705.

-
- [203] K. Ueno, S. Hazama, S. Mitomori, M. Nishioka, Y. Suehiro *et al.* (2009) Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells. *Br. J Cancer* 101: 1374-1381.
- [204] L. Yang, X. Wu, Y. Wang, K. Zhang, J. Wu *et al.* (2011) FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer. *Oncogene* 30: 4437-4446.
- [205] S. B. Nambotin, L. Lefrancois, X. Sainsily, P. Berthillon, M. Kim *et al.* (2011) Pharmacological inhibition of Frizzled-7 displays anti-tumor properties in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 54: 288-299.
- [206] Y. Yamamoto, M. Sakamoto, G. Fujii, H. Tsuiji, K. Kenetaka *et al.* (2003) Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. *Hepatology* 37: 528-533.
- [207] R. F. Souza, K. Krishnan, and S. J. Spechler (2008) Acid, bile, and CDX: the ABCs of making Barrett's metaplasia. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 295: G211-G218.
- [208] K. S. Carmon, X. Gong, Q. Lin, A. Thomas, and Q. Liu (2011) R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 11452-11457.
- [209] W. de Lau, N. Barker, T. Y. Low, B. K. Koo, V. S. Li *et al.* (2011) Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 476: 293-297.
- [210] A. Glinka, C. Dolde, N. Kirsch, Y. L. Huang, O. Kazanskaya *et al.* (2011) LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep.* 12: 1055-1061.
- [211] K. A. Kim, J. Zhao, S. Andarmani, M. Kakitani, T. Oshima *et al.* (2006) R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle* 5: 23-26.
- [212] J. K. Yoon and J. S. Lee (2012) Cellular signaling and biological functions of R-spondins. *Cell Signal.* 24: 369-377.
- [213] K. Tanese, M. Fukuma, T. Yamada, T. Mori, T. Yoshikawa *et al.* (2008) G-protein-coupled receptor GPR49 is up-regulated in basal cell carcinoma and promotes cell proliferation and tumor formation. *Am. J. Pathol.* 173: 835-843.
- [214] H. Uchida, K. Yamazaki, M. Fukuma, T. Yamada, T. Hayashida *et al.* (2010) Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in colorectal cancer. *Cancer Sci.* 101: 1731-1737.

-
- [215] N. Barker, R. A. Ridgway, J. H. van Es, M. van de Wetering, H. Begthel *et al.* (2009) Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457: 608-611.
- [216] T. Sato, R. G. Vries, H. J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker *et al.* (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262-265.
- [217] E. Vincan, P. K. Darcy, C. A. Farrelly, M. C. Faux, T. Brabletz *et al.* (2007) Frizzled-7 dictates three-dimensional organization of colorectal cancer cell carcinoids. *Oncogene* 26: 2340-2352.
- [218] E. Vincan, D. J. Flanagan, N. Pouliot, T. Brabletz, and S. Spaderna (2010) Variable FZD7 expression in colorectal cancers indicates regulation by the tumour microenvironment. *Dev. Dyn.* 239: 311-317.
- [219] S. Takaishi, T. Okumura, and T. C. Wang (2008) Gastric cancer stem cells. *J. Clin. Oncol.* 26: 2876-2882.
- [220] M. Leushacke and N. Barker (2011) Lgr5 and Lgr6 as markers to study adult stem cell roles in self-renewal and cancer. *Oncogene* 31: 3009-22.
- [221] N. Barker, M. Huch, P. Kujala, M. van de Watering, H. J. Snippert *et al.* (2010) Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 6: 25-36.
- [222] R. Yerushalmi, R. Woods, P. M. Ravdin, M. M. Hayes, and K. A. Gelmon (2010) Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 11: 174-183.
- [223] K. Bakkelund, R. Fossmark, I. Nordrum, and H. Waldum (2006) Signet ring cells in gastric carcinomas are derived from neuroendocrine cells. *J Histochem. Cytochem.* 54: 615-621.
- [224] A. Haegebarth and H. Clevers (2009) Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin. *Am. J. Pathol.* 174: 715-721.
- [225] C. Wang, J. Xie, J. Guo, H. C. Manning, J. C. Gore *et al.* (2012) Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncol. Rep.* In press.
- [226] F. Walker, H. H. Zhang, A. Odorizzi, and A. W. Burgess (2011) LGR5 is a negative regulator of tumorigenicity, antagonizes Wnt signalling and regulates cell adhesion in colorectal cancer cell lines. *PLoS. One.* 6: e22733.
- [227] S. Nishimura, N. Wakabayashi, K. Toyoda, K. Kashima, and S. Mitsufuji (2003) Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig. Dis. Sci.* 48: 1523-1529.

- [228] S. M. Sureban, R. May, R. J. George, B. K. Dieckgraefe, H. L. McLeod *et al.* (2008) Knockdown of RNA binding protein musashi-1 leads to tumor regression in vivo. *Gastroenterology* 134: 1448-1458.
- [229] S. Takaishi, T. Okumura, S. Tu, S. S. Wang, W. Shibata *et al.* (2009) Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 27: 1006-1020.
- [230] X. T. Qiao and D. L. Gumucio (2011) Current molecular markers for gastric progenitor cells and gastric cancer stem cells. *J Gastroenterol.* 46: 855-865.
- [231] F. Li, B. Tiede, J. Massague, and Y. Kang (2007) Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 17: 3-14.
- [232] T. Wang, C. W. Ong, J. Shi, S. Srivastava, B. Yan *et al.* (2011) Sequential expression of putative stem cell markers in gastric carcinogenesis. *Br. J Cancer* 105: 658-665.
- [233] C. Hemmings (2010) The elaboration of a critical framework for understanding cancer: the cancer stem cell hypothesis. *Pathology* 42: 105-112.
- [234] H. Takahashi, H. Ishii, N. Nishida, I. Takemasa, T. Mizushima *et al.* (2011) Significance of Lgr5(+ve) cancer stem cells in the colon and rectum. *Ann. Surg. Oncol.* 18: 1166-1174.
- [235] H. Tian, B. Biehs, S. Warming, K. G. Leong, L. Rangell *et al.* (2011) A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478: 255-259.
- [236] P. Friedl and K. Wolf (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3: 362-374.
- [237] K. M. Draheim and S. Lyle (2011) Epithelial Stem Cells. *Methods Mol. Biol.* 750: 261-274.
- [238] P. Callihan, J. Mumaw, D. W. Machacek, S. L. Stice, and S. B. Hooks (2011) Regulation of stem cell pluripotency and differentiation by G protein coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 129: 290-306.
- [239] R. J. Phillips, M. D. Burdick, M. Lutz, J. A. Belperio, M. P. Keane *et al.* (2003) The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir. Crit Care Med.* 167: 1676-1686.
- [240] K. Yasumoto, K. Koizumi, A. Kawashima, Y. Saitoh, Y. Arita *et al.* (2006) Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. *Cancer Res.* 66: 2181-2187.

- [241] S. Iwasa, T. Yanagawa, J. Fan, and R. Kato (2009) Expression of CXCR4 and its ligand SDF-1 in intestinal-type gastric cancer is associated with lymph node and liver metastasis. *Anticancer Res.* 29: 4751-4758.
- [242] S. Ishigami, S. Natsugoe, H. Okumura, M. Matsumoto, A. Nakajo *et al.* (2007) Clinical implication of CXCL12 expression in gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 14: 3154-3158.
- [243] M. F. Fanelli, L. T. Chinen, M. D. Begnami, W. L. Costa, Jr., J. H. Fregnani *et al.* (2012) The influence of transforming growth factor-alpha, cyclooxygenase-2, matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-9 and CXCR4 proteins involved in epithelial-mesenchymal transition on overall survival of patients with gastric cancer. *Histopathology* 61: 153-61.
- [244] A. Orimo, P. B. Gupta, D. C. Sgroi, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay *et al.* (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121: 335-348.
- [245] H. J. Lee, S. W. Kim, H. Y. Kim, S. Li, H. J. Yun *et al.* (2009) Chemokine receptor CXCR4 expression, function, and clinical implications in gastric cancer. *Int. J Oncol.* 34: 473-480.
- [246] T. Fischer, F. Nagel, S. Jacobs, R. Stumm, and S. Schulz (2008) Reassessment of CXCR4 chemokine receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-2. *PLoS. One.* 3: e4069.
- [247] N. Yoshitake, H. Fukui, H. Yamagishi, A. Sekikawa, S. Fujii *et al.* (2008) Expression of SDF-1 alpha and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer. *Br. J Cancer* 98: 1682-1689.
- [248] S. Saigusa, Y. Toiyama, K. Tanaka, T. Yokoe, Y. Okugawa *et al.* (2010) Stromal CXCR4 and CXCL12 expression is associated with distant recurrence and poor prognosis in rectal cancer after chemoradiotherapy. *Ann. Surg. Oncol.* 17: 2051-2058.
- [249] P. Staller, J. Sulitkova, J. Lisztwan, H. Moch, E. J. Oakeley *et al.* (2003) Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425: 307-311.
- [250] R. Salcedo and J. J. Oppenheim (2003) Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation.* 10: 359-370.
- [251] G. Chen, S. M. Chen, X. Wang, X. F. Ding, J. Ding *et al.* (2012) Inhibition of Chemokine (CXC Motif) Ligand 12/Chemokine (CXC Motif) Receptor 4 Axis (CXCL12/CXCR4)-mediated Cell Migration by Targeting Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway in Human Gastric Carcinoma Cells. *J Biol. Chem.* 287: 12132-12141.

-
- [252] T. C. Zhang, W. G. Zhu, M. D. Huang, R. H. Fan, and X. F. Chen (2011) Prognostic value of ADAM17 in human gastric cancer. *Med Oncol.* In press.
- [253] M. Gooz (2010) ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45: 146-169.
- [254] Z. X. Shou, X. Jin, and Z. S. Zhao (2012) Upregulated Expression of ADAM17 Is a Prognostic Marker for Patients With Gastric Cancer. *Ann. Surg.* In press.
- [255] K. Nagao, T. Kobayashi, M. Ohyama, H. Akiyama, K. Horiuchi *et al.* (2012) Brief Report: Requirement of TACE/ADAM17 for Hair Follicle Bulge Niche Establishment. *Stem Cells* 30: 1781-5.
- [256] J. W. Kornfeld, S. Meder, M. Wohlberg, R. E. Friedrich, T. Rau *et al.* (2011) Overexpression of TACE and TIMP3 mRNA in head and neck cancer: association with tumour development and progression. *Br. J Cancer* 104: 138-145.
- [257] S. W. Sunnarborg, C. L. Hinkle, M. Stevenson, W. E. Russell, C. S. Raska *et al.* (2002) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol. Chem.* 277: 12838-12845.
- [258] G. Civenni, T. Holbro, and N. E. Hynes (2003) Wnt1 and Wnt5a induce cyclin D1 expression through ErbB1 transactivation in HC11 mammary epithelial cells. *EMBO Rep.* 4: 166-171.
- [259] K. S. Carmon, Q. Lin, X. Gong, A. Thomas, and Q. Liu (2012) LGR5 Interacts and Cointernalizes with Wnt Receptors To Modulate Wnt/beta-Catenin Signaling. *Mol. Cell Biol.* 32: 2054-2064.
- [260] A. Bengochea, M. M. de Souza, L. Lefrancois, R. E. Le, O. Galy *et al.* (2008) Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. *Br. J Cancer* 99: 143-150.
- [261] N. Sagara, G. Toda, M. Hirai, M. Terada, and M. Katoh (1998) Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human frizzled-1, frizzled-2, and frizzled-7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252: 117-122.
- [262] S. Assou, C. T. Le, S. Tondeur, S. Strom, A. Gabelle *et al.* (2007) A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas. *Stem Cells* 25: 961-973.
- [263] A. Gregorieff, D. Pinto, H. Begthel, O. Destree, M. Kielman *et al.* (2005) Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 129: 626-638.

-
- [264] T. Sato, J. H. van Es, H. J. Snippert, D. E. Stange, R. G. Vries *et al.* (2011) Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469: 415-418.
- [265] X. S. Fan, H. Y. Wu, H. P. Yu, Q. Zhou, Y. F. Zhang *et al.* (2010) Expression of Lgr5 in human colorectal carcinogenesis and its potential correlation with beta-catenin. *Int. J. Colorectal Dis.* 25: 583-590.
- [266] J. L. Ziskin, D. Dunlap, M. Yaylaoglu, I. K. Fodor, W. F. Forrest *et al.* (2012) In situ validation of an intestinal stem cell signature in colorectal cancer. *Gut*. In press.
- [267] B. Hjelm, B. Forsström, U. Igel, H. Johannesson, C. Stadler *et al.* (2011) Generation of monospecific antibodies based on affinity capture of polyclonal antibodies. *Protein Sci.* 20: 1824-1835.
- [268] J. Huang, K. Chen, W. Gong, N. M. Dunlop, and J. M. Wang (2008) G-protein coupled chemoattractant receptors and cancer. *Front Biosci.* 13: 3352-3363.
- [269] A. Rezza, S. Skah, C. Roche, J. Nadjar, J. Samarut *et al.* (2010) The overexpression of the putative gut stem cell marker Musashi-1 induces tumorigenesis through Wnt and Notch activation. *J Cell Sci.* 123: 3256-3265.
- [270] Y. Kaneko, S. Sakakibara, T. Imai, A. Suzuki, Y. Nakamura *et al.* (2000) Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev. Neurosci.* 22: 139-153.
- [271] R. I. Glazer, D. T. Vo, and L. O. Penalva (2012) Musashi1: an RBP with versatile functions in normal and cancer stem cells. *Front Biosci.* 17: 54-64.
- [272] R. B. Clarke, K. Spence, E. Anderson, A. Howell, H. Okano *et al.* (2005) A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev. Biol.* 277: 443-456.
- [273] T. Klonisch, E. Wiechec, S. Hombach-Klonisch, S. R. Ande, S. Wesselborg *et al.* (2008) Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. *Trends Mol. Med* 14: 450-460.
- [274] N. Kagara, K. T. Huynh, C. Kuo, H. Okano, M. S. Sim *et al.* (2012) Epigenetic regulation of cancer stem cell genes in triple-negative breast cancer. *Am J Pathol* 181: 257-267.
- [275] N. Moore and S. Lyle (2011) Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance. *J Oncol.* pii: 396076.
- [276] M. Quante and T. C. Wang (2008) Inflammation and stem cells in gastrointestinal carcinogenesis. *Physiology. (Bethesda.)* 23: 350-359.

-
- [277] B. H. von Rahden, S. Kircher, M. Lazariotou, C. Reiber, L. Stuermer *et al.* (2011) Lgr5 expression and cancer stem cell hypothesis: clue to define the true origin of esophageal adenocarcinomas with and without Barrett's esophagus? *J Exp. Clin. Cancer Res.* 30: 23.
- [278] R. May, S. M. Sureban, N. Hoang, T. E. Riehl, S. A. Lightfoot *et al.* (2009) Doublecortin and CaM kinase-like-1 and leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor mark quiescent and cycling intestinal stem cells, respectively. *Stem Cells* 27: 2571-2579.
- [279] P. C. Hermann, S. L. Huber, T. Herrler, A. Aicher, J. W. Ellwart *et al.* (2007) Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1: 313-323.
- [280] K. Takeda, I. Kinoshita, Y. Shimizu, Y. Matsuno, T. Shichinohe *et al.* (2011) Expression of LGR5, an intestinal stem cell marker, during each stage of colorectal tumorigenesis. *Anticancer Res.* 31: 263-270.
- [281] T. Reya and H. Clevers (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434: 843-850.
- [282] L. Becker, Q. Huang, and H. Mashimo (2008) Immunostaining of Lgr5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *ScientificWorldJournal.* 8: 1168-1176.
- [283] B. Kleist, L. Xu, G. Li, and C. Kersten (2011) Expression of the adult intestinal stem cell marker Lgr5 in the metastatic cascade of colorectal cancer. *Int. J Clin. Exp. Pathol.* 4: 327-335.
- [284] M. Mareel and A. Leroy (2003) Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev.* 83: 337-376.
- [285] P. M. Comoglio and L. Trusolino (2002) Invasive growth: from development to metastasis. *J Clin. Invest* 109: 857-862.
- [286] I. M. Shih, T. L. Wang, G. Traverso, K. Romans, S. R. Hamilton *et al.* (2001) Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 2640-2645.
- [287] D. L. Rimm, T. O. Nielsen, S. D. Jewell, D. C. Rohrer, G. Broadwater *et al.* (2011) Cancer and Leukemia Group B Pathology Committee guidelines for tissue microarray construction representing multicenter prospective clinical trial tissues. *J Clin. Oncol.* 29: 2282-2290.

- [288] R. L. Camp, L. A. Charette, and D. L. Rimm (2000) Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 80: 1943-1949.
- [289] R. Kuefer, M. D. Hofer, J. E. Gschwend, and M. A. Rubin (2004) [Tissue microarrays. High-throughput procedures to verify potential biomarkers]. *Urologe A* 43: 659-667.
- [290] M. Skacel, B. Skilton, J. D. Pettay, and R. R. Tubbs (2002) Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 10: 1-6.
- [291] M. A. Rubin, R. Dunn, M. Strawderman, and K. J. Pienta (2002) Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg. Pathol* 26: 312-319.
- [292] A. S. Merseburger, M. A. Kuczyk, J. Serth, C. Bokemeyer, D. Y. Young *et al.* (2003) Limitations of tissue microarrays in the evaluation of focal alterations of bcl-2 and p53 in whole mount derived prostate tissues. *Oncol. Rep.* 10: 223-228.
- [293] M. Fanjul, V. Gmyr, C. Sengenès, G. Ratovo, M. Dufresne *et al.* (2010) Evidence for epithelial-mesenchymal transition in adult human pancreatic exocrine cells. *J Histochem. Cytochem.* 58: 807-823.
- [294] N. Barker, J. H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born *et al.* (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449: 1003-1007.
- [295] L. Becker, Q. Huang, and H. Mashimo (2010) Lgr5, an intestinal stem cell marker, is abnormally expressed in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Dis. Esophagus.* 23: 168-174.
- [296] V. Jaks, N. Barker, M. Kasper, J. H. van Es, H. J. Snippert *et al.* (2008) Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat. Genet.* 40: 1291-1299.
- [297] J. Schuijers and H. Clevers (2012) Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *EMBO J* 31: 2685-2696.
- [298] M. F. Clarke, J. E. Dick, P. B. Dirks, C. J. Eaves, C. H. Jamieson *et al.* (2006) Cancer stem cells - perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 66: 9339-9344.
- [299] L. Vermeulen, M. Todaro, M. F. de Sousa, M. R. Sprick, K. Kemper *et al.* (2008) Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 13427-13432.

-
- [300] S. Cascinu, E. Galizia, R. Labianca, F. Ferrau, F. Pucci *et al.* (2011) Pegylated liposomal doxorubicin, 5-fluorouracil and cisplatin versus mitomycin-C, 5-fluorouracil and cisplatin for advanced gastric cancer: a randomized phase II trial. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68: 37-43.
- [301] I. C. Park, M. J. Park, C. S. Hwang, C. H. Rhee, D. Y. Whang *et al.* (2000) Mitomycin C induces apoptosis in a caspases-dependent and Fas/CD95-independent manner in human gastric adenocarcinoma cells. *Cancer Lett.* 158: 125-132.
- [302] R. W. Johnstone, E. Cretney, and M. J. Smyth (1999) P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood* 93: 1075-1085.
- [303] R. Knippers (2006) Messenger-RNA im Cytoplasma. In: R. Knippers, Autor. *Molekulare Genetik*. 9. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. pp. 431-454
- [304] W. Filipowicz, L. Jaskiewicz, F. A. Kolb, and R. S. Pillai (2005) Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15: 331-341.
- [305] Y. Welte, J. Adjaye, H. R. Lehrach, and C. R. Regenbrecht (2010) Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? *Cell Commun. Signal.* 8: 6.
- [306] R. Nusse (2008) Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res.* 18: 523-527.
- [307] K. A. Kim, M. Kakitani, J. Zhao, T. Oshima, T. Tang *et al.* (2005) Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* 309: 1256-1259.
- [308] E. Sancho, E. Batlle, and H. Clevers (2004) Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 695-723.
- [309] A. Scholer-Dahirel, M. R. Schlabach, A. Loo, L. Bagdasarian, R. Meyer *et al.* (2011) Maintenance of adenomatous polyposis coli (APC)-mutant colorectal cancer is dependent on Wnt/beta-catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 17135-17140.
- [310] B. Rubinfeld, P. Robbins, M. El-Gamil, I. Albert, E. Porfiri *et al.* (1997) Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275: 1790-1792.
- [311] W. E. Lowry, C. Blanpain, J. A. Nowak, G. Guasch, L. Lewis *et al.* (2005) Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev.* 19: 1596-1611.
- [312] L. G. van der Flier, J. Sabates-Bellver, I. Oving, A. Haegebarth, P. M. De *et al.* (2007) The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology*. 132: 628-632.

-
- [313] J. L. van der Velden, A. S. Guala, S. E. Leggett, J. Sluimer, E. C. Badura *et al.* (2012) Induction of a Mesenchymal Expression Program in Lung Epithelial Cells by Wnt/beta-catenin Requires the Presence of c-Jun N-Terminal Kinase 1. *Am J Respir. Cell Mol. Biol.* 47: 206-14.
- [314] Y. Liu (2010) New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc. Nephrol.* 21: 212-222.
- [315] J. M. Mariadason, M. Bordonaro, F. Aslam, L. Shi, M. Kuraguchi, A. Velcich *et al.* (2001) Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res.* 61: 3465-3471.
- [316] L. Qi, B. Sun, Z. Liu, H. Li, J. Gao *et al.* (2012) Dickkopf-1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells and contributes to colon cancer suppression. *Cancer Sci.* 103: 828-835.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

ACTB	β-Aktin (Gen)
AK	Adenokarzinom
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CC	<i>cholangiocarcinoma</i> (engl.), Cholangiokarzinom
cDNA	<i>complementary DNA</i> (engl.), komplementäre DNS
CMV	Cytomegalievirus
DAB	Diaminobenzidin (Peroxidasesubstrat)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i> (engl.), Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i> (engl.), doppelsträngige DNS
EDTA	Etylendiamintetraacetylsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (engl.)
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
engl.	englisch
ERK	extracellular signal-related kinase
<i>et al.</i>	et alii
evtl.	eventuell
F	Frauen
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (engl.), fetales Kälberserum
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (engl.)
G	Gauge (Eichmaß)
g	Gramm
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> (engl.), G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Proteine	GTP-bindende Proteine
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i> (engl.), hepatozelluläres Karzinom
HKG	<i>housekeeping gene</i> (engl.), Haushaltsgen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (engl.), Meerrettich-Peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRS	Immunreaktivitätsscore
kb	kilo Basen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani Nährmedium
LPA	<i>lysophosphatidic acid</i> (engl.), Lysophosphatidsäure
M	Männer
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (engl.), Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute

mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMC	Mitomycin C
mmol	Millimol
mRNA	<i>messenger RNA</i> (engl.), Boten-RNS
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyl-tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
n	Anzahl
nm	Nanometer
NT	Nicht-Tumor
NTC	<i>no template control</i> (engl.), Negativkontrolle
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (engl.)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (engl.), Polymerase-Kettenreaktion
RNA	<i>ribonucleid acid</i> (engl.), Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
-RT	Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SA	Standardabweichung
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i> (engl.), Plattenepithelkarzinom
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i> (engl.), Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
sog.	sogenannt
SP	<i>Side Population</i>
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i> (engl.), einzelsträngige DNS
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i> (engl.), einzelsträngige RNS
Std.	Stunde
T	Temperatur
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat/EDTA
Taq	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (engl.)
TE	Tris-HCl/EDTA
TMPS	<i>triple-membrane-passing</i> Signal
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TU	Tumor
U	<i>units</i> (engl.), Einheit
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i> (engl.)
UV-Licht	Ultravioletes Licht
vs.	<i>versus</i> , gegen
WHO	<i>World Health Organisation</i> (engl.)
x g	Zentrifugalbeschleunigung

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008.....	4
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der gastralen Karzinogenese.....	5
Abbildung 1.3 Krebsstammzellen in der Krebstherapie.	14
Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der GPCR-Signaltransduktion.	18
Abbildung 1.5 Schematische Darstellung des kanonischen Notch-Signalwegs.....	22
Abbildung 1.6 Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs.....	24
Abbildung 1.7 Schematische Darstellung des EGFR-Signalwegs.....	26
Abbildung 1.8 Schema des TMPS-Mechanismus zur EGFR-Transaktivierung.	28
Abbildung 3.1 Struktur des LGR5-Rezeptors.....	56
Abbildung 3.2 Vektorkarte von pcDNA3.1(-).....	61
Abbildung 3.3 MTT-Zytotoxizitätstest.	70
Abbildung 4.1 Arbeitsplan.....	74
Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der GeneChip Array Auswertung.	76
Abbildung 4.3 Schematische Darstellung von ADAM17.	78
Abbildung 4.4 Schematische Darstellung von LGR5.	80
Abbildung 4.5 Boxplots CXCL12.	82
Abbildung 4.6 Boxplots CXCR4.....	83
Abbildung 4.7 Expression von CXCL12 und CXCR4 in Tumorzellen.	84
Abbildung 4.8 CXCR4-Expression in Tumor-Mikrogefäßen.	88
Abbildung 4.9 Boxplots ADAM17.	89
Abbildung 4.10 ADAM17- und FZD7-Expression in Magenkarzinom-TMAs.	90
Abbildung 4.11 Boxplots FZD7.	92
Abbildung 4.12 Einfluss der FZD7-Expression auf das Patientenüberleben.....	93
Abbildung 4.13 Boxplots LGR5.....	95
Abbildung 4.14 Vergleichende Immunfärbung von LGR5-Antikörpern.....	96
Abbildung 4.15 Immunfluoreszenzfärbung von HEK293 EBNA.....	97
Abbildung 4.16 Immunzytochemie an stabil transfizierten MKN45- und MKN74-Zellen....	98
Abbildung 4.17 Validierung des Anti-LGR5-Antikörpers im Western Blot.....	100
Abbildung 4.18 LGR5-Expression in Magenkarzinom-TMAs.....	101
Abbildung 4.19 Färbungsmuster von LGR5 in Endothel- und Stromazellen.....	105
Abbildung 4.20 LGR5-Doppelfärbungen mit Ki67 und Synaptophysin.	107
Abbildung 4.21 LGR5-Doppelfärbungen mit ADAM17, Musashi-1 und CD44.....	109
Abbildung 4.22 Die LGR5-Expression während der gastralen Karzinogenese.	111
Abbildung 4.23 Einfluss der lokalen LGR5-Expression auf das Patientenüberleben.....	113
Abbildung 4.24 Boxplots der LGR5-Expression in hepato-gastrointestinalem Gewebe.	116
Abbildung 4.25 LGR5-Immunreaktivität in hepato-gastrointestinalem Gewebe.	119
Abbildung 4.26 LGR5-Immunreaktivität in hepato-gastrointestinalem Gewebe.	120
Abbildung 4.27 mRNA-Expression von LGR5 in Magenkarzinomzelllinien.....	122
Abbildung 4.28 Proliferation der Zelllinien MKN45 und MKN74.....	123

Abbildung 4.29 Wachstumsmuster der Zelllinien MKN45 und MKN74.....	124
Abbildung 4.30 Migration von MKN45 und MKN74 im Wundheilungsassay.	125
Abbildung 4.31 Invasion von MKN45 und MKN74 im Matrigel-Invasionsassay.	126
Abbildung 4.32 Apoptose von MKN45 und MKN74 im Caspase-3/7-Assay.	127

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms.....	9
Tabelle 3.1 Patientencharakteristika für die mRNA-Analyse.	39
Tabelle 3.2 Patientencharakteristika für die Immunhistochemie.	40
Tabelle 3.3 Primer Details für die qualitative PCR und die Real-time RT-PCR.	45
Tabelle 3.4 PCR Bedingungen in der qualitativen PCR und der Real-time RT-PCR.	46
Tabelle 3.5 Primer Details für die Sequenzierung und Klonierung von cDNA.....	64
Tabelle 4.1 Proteinexpression von CXCL12 im Magenkarzinom.....	85
Tabelle 4.2 Proteinexpression von CXCR4 im Magenkarzinom.	86
Tabelle 4.3 vCXCR4-Expression im Magenkarzinom.....	87
Tabelle 4.4 Proteinexpression von ADAM17 im Magenkarzinom.....	91
Tabelle 4.5 Proteinexpression von FZD7 im Magenkarzinom.	94
Tabelle 4.6 Proteinexpression von LGR5 im Magenkarzinom.....	102
Tabelle 4.7 Überlebenszeitanalyse im TMA-Kollektiv.....	103
Tabelle 4.8 Die lokale Proteinexpression von LGR5 im intestinalen Magenkarzinom.....	114
Tabelle 4.9 LGR5-Expression im hepato-gastrointestinalen Patientenkollektiv.	118

9.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Eva Simon
Akademischer Grad	Diplom-Humanbiologin
Anschrift	Feldstraße 91, 24105 Kiel
Geburtsdatum	29. Januar 1984 in Berlin
Heimatort	Berlin
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

10/2008 - 08/2012	Doktorarbeit mit dem Titel „ <i>G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als prädiktive und therapeutische Zielstrukturen des Magenkarzinoms</i> “, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Röcken im Institut für Pathologie, Campus Charité Mitte, Berlin und Institut für Pathologie, Universitätsklinikum SH, Campus Kiel
11/2007 - 09/2008	Diplomarbeit mit dem Thema: „ <i>Charakterisierung und Validierung prognostischer Biomarker des Magenkarzinoms</i> “, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Röcken im Institut für Pathologie, Campus Charité Mitte, Berlin
09/2003 - 09/2008	Studium der Humanbiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald über 10 Semester Interdisziplinärer Studiengang zwischen Biologie, Medizin und Pharmakologie. Hauptfach Physiologie, Nebenfächer Immunologie und Humangenetik, Abschluss Diplom-Humanbiologin
08/1996 - 06/2003	Besuch des Charles-Darwin-Gymnasiums in Berlin, Abschluss Abitur
08/1990 - 07/1996	Besuch der 12. Grundschule in Berlin

Berufliche Tätigkeiten

2009-2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel im Institut für Pathologie
2008-2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pathologie am Campus Charité Mitte, Berlin

9.5 Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL



ETHIK-KOMMISSION

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Prof. Dr. Christoph Röcken
Institut für Pathologie
Arnold-Heller-Straße 3, Haus 14
24105 Kiel

EINGEGANGEN
01. Nov. 2010

Schwanenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-18 31

Datum: 22.10.2010

AZ.: D 453/10 (bitte stets angeben)

Studienplan: **Prädiktive Biomarker des Magenkarzinoms**
Anschreiben mit Studienplan

Antragsteller: **Prof. Dr. Christoph Röcken, Institut für Pathologie, UKSH,
Campus Kiel**

Datum des Antrages: **29.09.2010 (Eingang 01.10.2010)**

Sehr geehrter Herr Kollege Röcken,

vielen Dank für Ihren obengenannten Antrag. Nach Durchsicht des Antrages durch die Geschäftsstelle und durch mich als stellvertretenden Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch
Stellv.Vorsitzender der Ethik-Kommission

Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

10 Publikationen

Originalarbeiten

- B. Ingold, E. Simon, U. Ungethüm, R. J. Kuban, B. M. Müller, A. Lupp, U. Neumann, M. P. Ebert, C. Denkert, W. Weichert, S. Schulz, and C. Röcken (2010) Vascular CXCR4 expression - a novel antiangiogenic target in gastric cancer? PLoS One 5: e10087
- R. Schmuck, V. Warneke, H. M. Behrens, E. Simon, W. Weichert, and C. Röcken (2011) Genotypic and phenotypic characterization of side population of gastric cancer cell lines. Am J Pathol 178:1792-1804
- E. Simon, D. Petke, C. Böger, H. M. Behrens, V. Warneke, M. Ebert, and C. Röcken (2012) The spatial distribution of LGR5+ cells correlates with gastric cancer progression. PLoS. One 7: e35486
- J. S. Steffen, E. Simon, V. Warneke, K. Balschun, M. Ebert, and C. Röcken (2012) LGR4 and LGR6 are differentially expressed and of putative tumor biological significance in gastric carcinoma. Virchows Arch. 461: 355-65.

Veröffentlichte Tagungsbeiträge

- E. Simon, U. Ungethüm, R. J. Kuban, U. Neumann, M. Ebert und C. Röcken (2008) Differentielle Expression G-Protein-gekoppelter Rezeptoren beim lymphogen metastasierten Magenkarzinom. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion für gastroenterologische Endoskopie, Berlin: P327
- E. Simon, U. Ungethüm, R. J. Kuban, U. Neumann, M. Ebert, and C. Röcken (2009) Differential expression of G protein-coupled receptors in intestinal type gastric cancer. 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V. und 13. Dreiländertagung für Zytologie (DGZ, öGZ, SGZ), Freiburg: Fr-006
- E. Simon, U. Ungethüm, R. J. Kuban, U. Neumann, M. Ebert, and C. Röcken (2009) Differential expression of G protein-coupled receptors in intestinal type gastric cancer. Baltic Summer School, Kiel
- E. Simon, D. Petke, C. Böger, V. Warneke, H. M. Behrens, and C. Röcken (2011) LGR5 is differentially expressed in hepato-gastrointestinal tumors. 102. Jahrestagung der *American Association for Cancer Research (AACR)*, Orlando, Florida, USA: LB 56

-
- E. Simon, D. Petke, C. Böger, V. Warneke, H. M. Behrens und C. Röcken (2011) LGR5 ist in Tumoren des Hepato-Gastrointestinaltraktes differentiell exprimiert. 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie 5. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie gemeinsam mit den Arbeitsgemeinschaften der DGAV, Leipzig: P301
- E. Simon, D. Petke, C. Böger, H. M. Behrens, V. Warneke, M. Ebert, and Röcken C (2012) LGR5 is differentially expressed in hepatogastrointestinal tumors. 96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., Berlin: FR-P-108
- E. Simon, D. Petke, C. Böger, H. M. Behrens, V. Warneke, M. Ebert und Röcken C (2012) LGR5 ist in hepato-gastrointestinalen Tumoren differentiell exprimiert und fördert die Proliferation, Migration und Invasion von Magenkarzinomzellen. 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie, Hamburg: Vortrag

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Holger Kalthoff danke ich sehr herzlich für die Übernahme der Betreuung und des Hauptreferats meiner Doktorarbeit. Ich bedanke mich für die Beratung und das kritische Korrekturlesen der Dissertation.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank an dieser Stelle gilt Herrn Prof. Dr. Christoph Röcken für die Bereitstellung meines Dissertationsthemas. Zudem möchte ich mich für seine fachkundige Betreuung, die Anleitung und die fortwährende Unterstützung während meiner Arbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön an Dr. Ann-Kathrin Wenke für ihre ständige Gesprächsbereitschaft, die Motivation und die hilfreiche Kritik, insbesondere aber auch für die kritische Durchsicht der Dissertation.

Vielen Dank auch an Dr. Christine Böger für die Hilfe bei medizinischen Fragestellungen und an Dr. Katharina Balschun für das Korrekturlesen der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Hans-Michael Behrens für seine Hilfe bei IT-Fragen sowie bei Ann-Kristin Linning, Sandra Krüger, Maike Pacena, Monika Hauberg und Karin Müller für die Zusammenarbeit im Labor und ihre spontane Hilfsbereitschaft bei der Suche nach praktischen Problemlösungen bedanken.

Ein Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung in allen Lebenslagen.

12 Erklärungen

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Abhandlung mit dem Titel „*G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als prädiktive und therapeutische Zielstrukturen im Magenkarzinom*“, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist und ich keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Teilergebnisse der Arbeit wurden bereits publiziert (siehe Kapitel 10 Publikationen). Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, den 14.12.2012

Eva Simon

Eidesstattliche Erklärungen

Ich versichere an Eides statt, dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde.

Kiel, den 14.12.2012

Eva Simon

Ich versichere an Eides statt, dass ich die Inanspruchnahme fremder Hilfen aufgeführt habe sowie, dass ich die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Kiel, den 14.12.2012

Eva Simon

Christian-Albrecht-Universität zu Kiel
Institut für Pathologie · Haus 14 · Arnold-Heller-Str.3 · 24105 Kiel



Direktor des Instituts für Pathologie
Univ.-Prof. Dr. med. Christoph Röcken
Arnold-Heller-Str. 3 · Haus 14 · 24105 Kiel
Tel. 0431 597-3401 · Fax 0431 597-3462
E-mail patho.kiel@uk-sh.de
www.crocken.de

Kiel, 29. August 2012

Erklärung über den Eigenanteil bei Publikationen mit mehreren Autoren

Erklärung über den Eigenanteil an den veröffentlichten oder zur Veröffentlichung vorgesehenen eingereichten wissenschaftlichen Schriften innerhalb dieser Dissertationsschrift gemäß § 8 Abs. 2 der Promotionsordnung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

1. Steffen JS, Simon E, Warneke V, Balschun K, Ebert M, Röcken C: LGR4 and LGR6 are differentially expressed and of putative tumor biological significance in gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2012. (ahead of print)
2. Simon E, Petke D, Böger C, Behrens HM, Warneke V, Ebert M, Röcken C: The Spatial Distribution of LGR5(+) Cells Correlates With Gastric Cancer Progression, *PLoS. One* 2012, 7: e35486.
3. Schmuck R, Warneke V, Behrens HM, Simon E, Weichert W, Röcken C: Genotypic and phenotypic characterization of side population of gastric cancer cell lines. *Am J Pathol* 2011, 178:1792-1804.
4. Tchernitsa O, Kasajima A, Schafer R, Kuban RJ, Ungethum U, Gyorffy B, Neumann U, Simon E, Weichert W, Ebert MP, Röcken C: Systematic evaluation of the miRNA-ome and its downstream effects on mRNA expression identifies gastric cancer progression. *J Pathol* 2010, 222: 310-319
5. Ingold B*, Simon E*, Ungethum U, Kuban RJ, Muller BM, Lupp A, Neumann U, Ebert MP, Denkert C, Weichert W, Schulz S, Röcken C: Vascular CXCR4 expression - a novel antiangiogenic target in gastric cancer? *PLoS One* 2010, 5: e10087(* shared first authorship).

Erläuterung:

- zu 1. In dieser Arbeit hat Frau Simon den Versuchsaufbau erstellt, die Versuchsdurchführung und Datenanalyse betreut und das Manuskript korrigiert sowie in Teilen verfasst. Des Weiteren führte sie die RNA-Analysen durch.

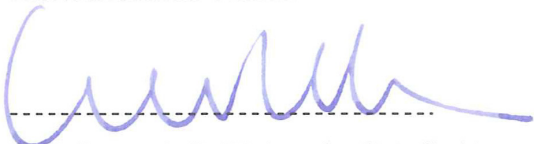


- zu 2. Eva Simon entwickelte den Versuchsaufbau, führte die Literaturrecherche, die Datenerhebung, Datenauswertung sowie die Ergebnisdiskussion der Experimente durch. Lediglich eine Serie von immunhistochemischen Färbungen wurden von Frau Diana Petke durchgeführt. Frau Simon hat das Manuskript vollständig selbst verfasst.
- zu 3. In dieser Publikation erstellte Frau Simon das Versuchsdesign für die Real-time RT-PCR Analysen. Sie führte die RNA-Isolation, cDNA-Synthese, die Datenerhebung mittels Real-time RT-PCR sowie die nachfolgende Auswertung aller Real-time RT-PCR Daten durch (siehe Abbildung 8). Des Weiteren war sie an der Auswertung der Tissue Microarray Daten in Tabelle 2 und Tabelle 3 beteiligt. Frau Simon verfasste die zu ihren Experimenten gehörenden Abschnitte des Manuskripts selbständig.
- zu 4. Eva Simon etablierte die Real-time RT-PCR Versuche und war an der experimentellen Durchführung und der entsprechenden Datenauswertung beteiligt. Sie verfasste im Material-Methoden-Teil die dazugehörigen Abschnitte.
- zu 5. Frau Simon hat die RNA-Isolation und cDNA-Synthese sowie die in Abbildung 1 dargestellten Real-time RT-PCR Versuche vollständig selbst durchgeführt. Sie war an der Konzeption der Studie, der Auswertung und Ergebnisdiskussion beteiligt und hat Ihren Anteil des Manuskripts (50 %) selbständig verfasst.

In allen Publikationen war ich für die Konzeption der Studien verantwortlich, habe alle Arbeiten betreut und die Manuskripte korrigiert.

Ich bestätige die von Frau Eva Simon abgegebene Erklärung zum Eigenanteil.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. med. C. Röcken, Institutsdirektor

Als Betreuer der Dissertationsschrift, bestätige ich ebenfalls die von Frau Eva Simon abgegebene Erklärung zum Eigenanteil.



Prof. Dr. rer. nat. H. Kalthoff, Betreuer

