

Aus dem
Institut für Chirurgische Forschung
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl)

**Molekularbiologische Charakterisierung
eines CEA424/SV 40 large T-Antigen – induzierten
Magentumors im transgenen Mausmodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Friedrich Ihler
aus
Rosenheim

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Georg Enders

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Stephan Brand
Priv.-Doz. Dr. Andreas Jung

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2011

Gewidmet meinen Eltern, in Dankbarkeit.

Inhalt

1) EINLEITUNG.....	3
1.1 KLINISCHE BEDEUTUNG VON KREBS	3
1.2 BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN VON KREBS.....	4
1.3 TIERMODELLE.....	5
1.4 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT	10
2) TIERE UND METHODEN	11
2.1 TIERE	11
2.2 HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE	12
2.3 PCR	13
2.4 WALKING PCR	16
2.5 MIKROARRAY	20
2.6 STATISTISCHE AUSWERTUNGEN.....	23
3) ERGEBNISSE.....	25
3.1 TUMOR UND ONKOGEN	25
3.2 INTEGRATION DES TRANSGENS	32
3.3 EXPRESSIONSANALYSEN AUSGEWÄHLTER GENE.....	35
3.4 GESAMTEXPRESSIONSANALYSE	56
4) DISKUSSION	75
4.1 TIERMODELL UND METHODEN.....	75
4.2 WIRKUNG DES ONKOGENS	81
4.3 ROLLE DER INTEGRATION DES TRANSGENS	82
4.4 ORGANSPEZIFISCHE TUMORENTSTEHUNG	83
4.5 PHÄNOTYP DER TUMORZELLEN	86
4.6 WEITERFÜHRENDE ANSÄTZE	90
ZUSAMMENFASSUNG	92
ANHANG 1: MATERIAL	94
GERÄTE UND LABORAUSSATTUNG	94

CHEMIKALIEN UND SUBSTRATE.....	94
ENZYME.....	95
KITSYSTEME.....	95
ANTIKÖRPER	95
OLIGONUKLEOTIDE	96
ANHANG 2: ERGÄNZENDE DATEN	101
LOKALISATION DES TRANSGENS.....	101
ORIGINALDATEN DER GENEXPRESSIONSANALYSE MIT RT-PCR.....	102
MIKROARRAY-DATEN.....	109
LITERATURVERZEICHNIS.....	114
DANKSAGUNG.....	125

1) Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung von Krebs

Krebs ist eine häufige Erkrankung des Menschen. Unter „Krebs“ im engeren Sinne versteht man dabei bösartige Tumorerkrankungen, wie sie in den Kapiteln C00-C97 (bösartige Neubildungen) der ICD-10 aufgeführt sind¹⁵¹.

In Deutschland waren im Jahr 2005 Krebserkrankungen für etwa ein Viertel der Sterbefälle verantwortlich. Sie stellten damit die zweithäufigste Todesursache nach den Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems¹²⁵. Seit 1985 nimmt die Inzidenz von Krebserkrankungen in den Ländern der OECD (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung) tendenziell ab. Dies erfolgt jedoch in geringerem Maße als es für die Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems der Fall ist, sodass die relative Häufigkeit von Krebs als Todesursache demgegenüber sogar leicht zunimmt⁹².

Tumorerkrankungen haben eine enorme, in Zukunft somit wahrscheinlich sogar noch wachsende Bedeutung für moderne Gesundheitssysteme. Dies wird auch deutlich, wenn man sich vergegenwärtigt, dass diese Krankheitsgruppe in Deutschland im Jahr 2004 direkte Krankheitskosten* in Höhe von rund 13,4 Mrd. € verursachte, was in diesem Jahr einem Anteil von 6,1% an den gesamten direkten Krankheitskosten in Deutschland ausmachte¹²⁵.

Mit einer Krebserkrankung sind aber auch gravierende Konsequenzen für die Betroffenen selbst verbunden. Neben der oft sehr belastenden Therapie stellt für sie diese Diagnose meist eine Lebenskrise dar, weil damit häufig eine erstmalige Konfrontation mit der Endlichkeit des eigenen Lebens verbunden ist⁵⁰. Angst und eventuell auch Depression sind deshalb wesentliche Aspekte dieses Krankheitsbilds. Sie treten sehr häufig auf und müssen im Rahmen der Therapie mitbehandelt werden⁷⁷.

Zudem ist Krebs eine Krankheit, die verhältnismäßig früh auftritt. Epidemiologische Daten zeigen, dass Patienten, die an Krebs erkranken, im Mittel 69 Jahren alt sind¹⁰⁶, also in einem Alter, in dem bei der aktuellen Lebenserwartung in Deutschland allge-

* Unter direkten Krankheitskosten versteht man den unmittelbar mit einer medizinischen Heilbehandlung, einer Präventions-, Rehabilitations- oder Pflegemaßnahme verbundenen Ressourcenverbrauch im Gesundheitswesen.

mein noch eine vergleichsweise gute Gesundheit erwartet wird. Insgesamt sterben Menschen unter 85 Jahren häufiger an Krebs als an Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems⁷⁷.

Momentan sind die wichtigsten Therapieoptionen bei Krebserkrankungen chirurgische Eingriffe, Strahlentherapie und Chemotherapie. Biologische Therapieformen beginnen in der klinischen Anwendung immer wichtiger zu werden (Antikörper, Hormontherapie), sind aber häufig noch in einem experimentellen Stadium (Immuntherapie, Gentherapie). Meist ist heute in der Tumorthherapie ein multimodaler Ansatz im Sinne einer Kombination der oben genannten Therapieoptionen der Standard. Es hängt unter anderem von Art, Lokalisation und Stadium ab, welche Modalitäten in welcher Kombination zur Anwendung kommen. Viele Therapieformen sind dabei noch verbesserungswürdig, besonders bezüglich unerwünschter Wirkungen¹¹¹.

Von den Forschungsergebnissen der Zukunft wird somit einerseits eine Verbesserung der bestehenden Therapieoptionen, darüber hinaus aber auch eine Entwicklung neuer Therapieformen zur klinischen Einsetzbarkeit erwartet. Nicht auszuschließen sind dabei auch noch mögliche Paradigmenwechsel auf dem Gebiet der Krebstherapie: beispielsweise zielt der Ansatz der so genannten „adaptiven Krebstherapie“ primär darauf ab, durch Kontrolle und Beschränkung des Tumorwachstums ein Langzeitüberleben zu ermöglichen. Die Entfernung aller Krebszellen aus dem erkrankten Organismus ist dabei im Gegensatz zu heutigen Therapieprinzipien kein wesentliches Ziel mehr^{37,38,85}.

Von zukünftigen Therapieoptionen erhofft man sich allgemein eine spezifischere, individuellere und insgesamt schonendere Behandlung. Wahrscheinlich werden neue kausale Therapieformen für Krebs nur ausgehend von neuen Erkenntnissen über die genetischen und biochemischen Grundlagen möglich sein¹³⁷. Darum wird die Forschung an den biologischen Grundlagen von Krebs auch in Zukunft ein wichtiges Gebiet darstellen.

1.2 Biologische Grundlagen von Krebs

Nach aktuellem Verständnis liegen die Ursachen von Krebs vor allem in genetischen Veränderungen^{50,88}. Grundsätzlich kann Krebs aus nahezu jeder Art von Zelle entstehen. Tumore epithelialen Ursprungs, welche als Karzinome bezeichnet werden, bilden aber insgesamt die häufigste Tumorart¹⁴⁵.

Es gibt Erklärungsansätze, die versuchen, die Grundlagen von Tumorentstehung zu verallgemeinern und auf eine kleine Zahl biologischer, physiologischer oder funktioneller Prinzipien zu reduzieren. Zu nennen wäre hier vor allem das Konzept von Douglas Hanahan und Robert A. Weinberg⁴⁶. Sie vermuten sechs Eigenschaften, die eine Zelle erwerben muss, um einen Tumor ausbilden zu können:

- Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen,
- Unempfindlichkeit gegenüber Signalen zum Wachstumsstop,
- Unterlaufen von Apoptoseprogrammen,
- unbegrenztes Potential zur Replikation,
- die Fähigkeit, die fortwährende Neubildung von Blutgefäßen zu bewirken, sowie
- invasives Wachstum und Metastasierung.

Die Regulation solcher Funktionen wird nach heutigem Verständnis in normalen Zellen wie in Tumorzellen von Signalkaskaden wahrgenommen. Es wurde bereits gezeigt, dass davon einige bei der Entstehung von Krebs aus zuvor normalen Zellen verändert sind^{33,140,144}, besonders p53^{58,98}, RB^{26,98}, GLI⁴ und APC⁹.

Um die Rolle von Signalkaskaden bei Tumorerkrankungen weiter studieren zu können, wäre es wünschenswert, zahlreiche gleichartige Tumoren für Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Dies könnte beispielsweise durch die Aufarbeitung von Gewebeproben von Patienten mit der gleichen Tumorerkrankung erfolgen. Eine weitere Möglichkeit stellen Tiermodelle dar.

1.3 Tiermodelle

a) Grundlagen

Mit Tiermodellen ist es möglich, Krebs reproduzierbar im Kontext eines Organismus nachzubilden^{135,142}. Der Vorteil im Vergleich zur Aufarbeitung humanen Tumorgewebes ist, dass Versuchstiere einen bekannten genetischen Hintergrund aufweisen und unter definierten Umweltbedingungen gehalten werden können. Sie erlauben es somit, sich nur auf bestimmte Aspekte der Erkrankung zu konzentrieren¹¹. Tiermodelle für

Krebserkrankungen werden seit den frühen 1980er Jahren verwendet. Es sind verschiedene Strategien zur Herstellung beschrieben¹³⁵:

- Fütterung oder Injektion von kanzerogenen Substanzen, z. B. NEU (N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff); hiermit kann bei definierter Verabreichung die kanzerogene Wirkung eines Stoffes untersucht werden.
- Injektion isogener oder xenogener Tumorzellen; dieser Ansatz ist beispielsweise für Untersuchungen zur Metastasierung interessant.

Darüber hinaus können durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden gentechnisch veränderte Organismen hergestellt werden, welche Tumoren entwickeln. Wird ein Tumor dabei durch das Einfügen von DNA in das Genom eines Organismus hervorgerufen, so spricht man von Insertionsmutagenese. Technisch gibt es verschiedene Möglichkeiten diese durchzuführen:

- Mikroinjektion^{19,31}; hierbei wird ein Gen durch Mikroinjektion in fertilisierte Oozyten eingebracht, durch spontane Rekombination an sticky ends fügt sich dieses Gen in das Genom ein.
- Transposon-induzierte Mutagenese; dazu werden kleine, mobile DNA-Abschnitte als Vektoren für die Integration von Genmaterial in das Genom benutzt⁵⁶.
- Retroviral induzierte Mutagenese; durch Retroviren, die über ein eigenes virales Onkogen verfügen, kann unmittelbar die Proliferation einer Zelle bewirkt werden (akut transformierende Retroviren); ansonsten kann durch Insertion eines Provirus in der Nähe eines endogenen Protoonkogens ein solches aktiviert werden (nicht-akut transformierende Retroviren)⁷⁹.

Diese Verfahren können auf verschieden Arten zur Transformation einer Zelle zu einer Tumorzelle führen:

- Gezielte Ausschaltung von Genen (knock-out oder loss-of-function-Mutation), hierdurch kann beispielsweise eine Untersuchung der Funktion mutmaßlicher Tumorsuppressorgene (z. B. p53, APC) erfolgen.
 - Aktivierung endogener Protoonkogene (gain-of-function-Mutation), etwa wenn ein Wachstumsfaktor durch Mutation unter die Kontrolle eines aktivierenden Promotors gelangt und daraufhin unkontrolliert die Zellproliferation induziert.
-

- Schließlich können auch fremde Gene in das Genom eines Tieres eingefügt werden (knock-in). Hierfür kommen zum Beispiel mutierte Gene oder bekannte Onkogene in Frage.

Der Vorteil von Tiermodellen auf der Grundlage gentechnisch veränderter Organismen liegt vor allem darin, dass diese spontan einen Tumor aus eigenem Gewebe hervorbringen können (autochthoner Tumor). Solche Tiermodelle sind besser geeignet um neue Erkenntnisse zur Entstehung von Krebs zu erlangen, da sie die komplexen Interaktionen bei der Entstehung von Krebs in einem Organsystem oder einem Organismus genauer abbilden⁵⁴ und somit zu aussagekräftigeren Ergebnissen führen.

Durch das Einfügen von Genen können auch gezielt Tiermodelle für autochthone Tumoren bestimmter Organsysteme entwickelt werden. Dazu wird ein bekanntes Onkogen an einen Promotor gekoppelt, woraus ein so genanntes „hybrides Onkogen“ resultiert⁴². Dieser Promotor wird so gewählt, dass er eine möglichst organspezifische Aktivierung des Onkogens gewährleistet. In der Regel entwickelt sich ein Tumor dann spezifisch in dem gewünschten Organ. Beispiele für häufig verwendete Onkogene sind c-Myc⁸⁶ und das large T-Antigen der Simian Virus 40 (SV 40 large T-Antigen)¹³⁵.

b) Das Simian Virus 40 large T-Antigen

Wie die anderen Viren aus der Familie der Polyomaviren verfügt auch der Simian Virus 40 (SV 40) über ein large T-Antigen. Dieses Protein ist über die ganze Familie hinweg strukturell und funktionell konserviert¹⁴⁶. Es spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation des viralen Lebenszyklus. Durch Eingriffe in den Zellzyklus einer infizierten Wirtszelle wirkt es als potentes Onkogen.

Ein wesentliches Merkmal der SV 40 large T-Antigene ist Bindung und dadurch Inaktivierung von Tumor-Supressor-Genen, namentlich von p53 und verschiedener Mitgliedern der Retinoblastom-Familie (pRB)^{3,24,147}. Weiterhin wirkt es unter anderem als Helikase, bindet zelluläre DNA und scheint sogar die Funktion eines Chaperone-Proteins übernehmen zu können^{62,76}. Diese Eigenschaften führen zusammen zu einer aberranten Stimulation des Zellzyklus. Hierdurch tritt eine infizierte Zelle in die S-Phase ein und es erfolgt die Proliferation.

Das SV 40 large T-Antigen wurde zuerst von Hanahan et. al.⁴⁵ in Verbindung mit einem Promotor des Insulins der Ratte zur Herstellung eines transgenen Tiermodells verwen-

det. Zahlreiche weitere Tiermodelle unter Verwendung organspezifischer Promotoren und des SV 40 large T-Antigens sind beschrieben^{18,36,40,42,53,60,74,82,97,128,148}, dabei erfuhr beispielsweise das TRAMP-Modell (Transgenic adenocarcinoma of mouse prostate)⁴¹ eine besonders weite Verbreitung bei der Untersuchung des Prostatakarzinoms⁵⁴.

c) Das CEA424/Simian Virus 40 large T-Antigen – Modell

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Tiermodell ist ein Beispiel für das Prinzip der Kopplung eines organspezifischen Promotors an das SV 40 large T-Antigen, um mit diesem hybriden Onkogen reproduzierbar die Entstehung eines Tumors induzieren zu können. Als Promotor des Transgens dient dabei ein Teil der Promotorregion des humanen Carzino-Embryonalen Antigen-Gens (CEA424).

CEA spielt physiologischerweise im Colon eine Rolle als Zelladhäsionsmolekül und wird wegen einer charakteristischen Überexpression bei kolorektalen Karzinomen als Tumormarker für diese Tumoren verwendet. Es ist Teil einer großen und komplexen Genfamilie, welche zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Neben Zelladhäsion werden auch Funktionen im Bereich der Signaltransduktion und der Immunabwehr diskutiert. Die Mitglieder der CEA-Untergruppe sind Zellmembran-assoziierte Antigene und werden neben normalen fetalen und adulten Geweben auch in verschiedenen Tumoren exprimiert¹³¹.

CEA hat im Vergleich zu anderen Familienmitgliedern eine vor allem auf Epithelien limitierte Expression. So kommt es neben dem Colon auch im Magen, in Plattenepithelien der oralen Schleimhaut, des Ösophagus und des Zervix, sowie in Epithelien von Schweißdrüsen und Prostata vor. Dabei erfolgt die Expression nach dem heutigen Verständnis nicht nur während der Fetalzeit, sondern während des gesamten Lebens^{44,131}. Für das hybride Onkogen des hier untersuchten Tiermodells wurde ein Fragment des Promotors mit einer Länge von 424 bp verwendet, weil dieser der für die Funktion wesentliche Teil des Promotors zu sein schien¹¹⁴.

Aufgrund des Expressionsmusters von CEA beim Menschen war zunächst erwartet worden, dass die transgenen Tiere einen Tumor im Colon entwickeln. Dies war allerdings nicht der Fall. Die transgenen Mäuse zeigten zunächst keinen einheitlichen Phänotyp. Es wurden Tumoren des Weichgewebes und der Lunge beobachtet, ebenso wie Sarkome oder Lymphome. Eine Linie entwickelte aber reproduzierbar einen Tumor in

der Antrumregion des Magens¹³⁰. An dieser Linie wurden die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

In einer Studie an einer Zellkultur, die sich aus Tumorgewebe der CEA424/SV 40 large T-Antigen – Mäuse ableitete, beschrieben Nöckel et. al.⁹⁰ den in diesem Tiermodell entstehenden Tumor als Adenokarzinom. Dies war ein wesentlicher Aspekt zu Beginn der vorliegenden Arbeit. Die Fragestellungen wurden daher unter der Hypothese formuliert, dass sich das Tiermodell eignet, um beispielhaft auf molekularbiologischer Ebene Determinanten der Tumorentwicklung beim Magenkarzinom zu untersuchen. Die zentrale Frage war dabei, warum sich Tumoren in diesem Tiermodell reproduzierbar in einem definierten Abschnitt eines Organs entwickelten. Grundsätzlich sind dafür verschiedene Ursachen denkbar.

So könnte nach dem Prinzip der Insertionsmutagenese durch die Integration des Genkonstruktes in das Genom ein endogenes Onkogen aktiviert (gain-of-function) oder ein endogenes Tumorsuppressorgen inaktiviert (loss-of-function) worden sein. Dies könnte durch die Insertion des Transgens erfolgt sein, wäre jedoch unabhängig von der onkogenen Wirkung des SV 40 large T-Antigens.

Daneben ist jedoch auch eine organspezifische Aktivierung des Onkogens aus Gründen, die an der Integrationsstelle liegen denkbar. So könnte etwa durch die Nähe der Integrationsstelle zu einem im Antrum des Magens besonders stark exprimierten Gen das Onkogen spezifisch in diesem Organ aktiviert werden.

Schließlich ist auf jeden Fall auch die Möglichkeit der Aktivierung des Onkogens über den Promotor in Betracht zu ziehen. Hier kommen verschiedene Signalkaskaden und lokale Faktoren in Frage, die möglicherweise auch eine Rolle bei anderen Tumoren mit CEA-Expression oder in bekannten Tumoren des Magens spielen.

Letzteres sollte mittels Genexpressionsanalysen untersucht werden. Aufgrund der Verwendung von Mikroarray-Analysen und dem damit vorhandenen umfassenden Datenbestand zum Transkriptom sollte auch die Frage nach dem Phänotyp der Ursprungszellen des Tumors bearbeitet werden.

1.4 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit

Ausgehend von der Möglichkeit, ein Tiermodell mit einem reproduzierbaren autochthonen Tumor des Magens untersuchen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit die folgenden Fragestellungen bearbeitet:

a) Integration des Transgens

An welcher Stelle ist das Transgen im Genom der Tiere integriert?

Gibt es Hinweise für Aktivierung eines endogenen Onkogens (gain-of-function) oder für die Inaktivierung eines endogenen Tumorsuppressorgens (loss-of-function) durch die Integration des hybriden Onkogens in das Genom?

Befindet sich das Transgen in einem organselektiv aktiven Bereich des Genoms und ergeben sich daraus Hinweise für eine funktionelle Bedeutung der Lokalisation bei der Aktivierung des Onkogens?

b) organspezifische Aktivierung des Onkogens

Können mit Analysen der Expression ausgewählter Gene über die Zeit Signalkaskaden oder lokale Faktoren identifiziert werden, die durch Aktivierung des Onkogens die Tumorentwicklung verursachen oder begünstigen?

c) Tumorzelle

Kann anhand von Genexpressionsdaten auf den Phänotyp der Ursprungszelle der Tumoren geschlossen werden?

2) Tiere und Methoden

Eine Auflistung verwendeter

- Geräte und Laborausstattung,
- Chemikalien und Substrate,
- Enzyme,
- Kitsysteme,
- Antikörper und
- Oligonukleotide

befindet sich in Anhang 1: Material, Seite 94.

2.1 Tiere

a) Tiermodell

Als Grundlage der Arbeit diente ein Tiermodell mit C57BL/6-Mäusen, welche mit einem hybriden Onkogen aus dem CEA-Promotor und dem Simian Virus 40 large T-Antigen transgen waren. Diese Tieren entwickelten alle einen Tumor in der Antrumregion des Magens¹³⁰.

Transgene Weibchen konnten nicht verpaart werden, da die Tiere in der Regel nicht alt genug wurden um Junge auszutragen. Die Züchtung erfolgte daher durch Kreuzungen nichttransgener Weibchen des C57BL/6-Stammes mit transgenen Männchen.

Das Transgen ist ein Genkonstrukt aus einem Teil des CEA-Promotors mit einer Länge von 424 bp (CEA424) sowie dem Simian Virus 40 large T-Antigen (siehe Abbildung 2-1)^{19,114,130}.



Abbildung 2-1: Aufbau des Transgens mit Schnittstellen der Restriktionsenzyme.

b) Haltung

Alle für die vorliegende Arbeit verwendeten Tiere wurden im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, 81377 München, gezüchtet und gehalten. Dies und alle an den Tieren durchgeführten Eingriffe erfolgten unter Einhaltung der geltenden Tierschutzbestimmungen mit Genehmigung der zuständigen Aufsichtsbehörde, der Regierung von Oberbayern, 80538 München. Die Tiere wurden bei konstanter Raumtemperatur von 23 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 50-60 % und einem Hell-Dunkel-Zyklus von 14 zu 10 Stunden gehalten. Sie erhielten pelletierte Nahrung und Wasser ad libitum.

c) Gewinnung und Konservierung von Gewebeproben

Zur Gewinnung von Gewebeproben aus dem Magen wurden transgene Tiere im Alter von 30, 60 und 90 Tagen sowie nichttransgene Tiere als Kontrollen getötet. In der Antrumregion transgener Tiere war dabei makroskopisch ein Tumor sichtbar. Hiervon wurde ein Gewebestück entnommen. Eine weitere Probe wurde oral davon aus einem makroskopisch als unverändert beurteilten Bereich des Corpus gewonnen.

Zur Konservierung der RNA wurden die Gewebeproben in RNAlater aufbewahrt. Es wurde dazu ein bis zu 30 mg großes Gewebestück in ein Gefäß mit dem fünffachen Volumen RNAlater gegeben. Für Langzeitaufbewahrung musste RNAlater mindestens über Nacht bei -4°C einwirken, damit die Stabilisierungslösung ausreichend ins Gewebe diffundieren konnte. Daraufhin wurde das gesamte Gefäß zur dauerhaften Aufbewahrung bei -20°C oder -80°C eingefroren.

2.2 Histologie und Immunhistochemie

Für histologische und immunhistochemische Analysen wurden Kryoschnitte aus dem Antrum des Magens für 15 min bei Raumtemperatur in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Daraufhin wurden sie mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und nach einem Standardprotokoll mit einem Antikörper gegen das SV 40 large T-Antigen (Nr. SC-20800, Verdünnung 1:4000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., 69115 Heidelberg) und mit Hämatoxylin-Eosin als Gegenfärbung behandelt. Die Auswertung

der so entstandenen Präparate erfolgte auf einem Axioskop 40 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 81379 München).

2.3 PCR

a) Oligonukleotide

Für verwendete Primer und andere Oligonukleotide siehe Anhang 1: Material, Oligonukleotide, auf Seite 96.

b) Nachweis des Transgens

Zur Testung auf Transgenität wurden den Mäusen ca. 0,5 cm der Schwanzspitzen durch Scherenschlag entfernt und an diesem Gewebe genomische DNA nach einem Standardprotokoll extrahiert¹⁰⁹. Daran erfolgte der Nachweis des T-Antigens mittels PCR unter Verwendung des transgenspezifischen Primerpaars P 530 und P 531.

Die Amplifikation erfolgte bei einer Schmelztemperatur von 58,0°C. Da das durch diese Primer amplifizierte Fragment das Intron überspannt, beträgt die Größe des Amplikons bei der ungesplittenen Form 734 bp und bei der gesplittenen Form 388 bp. Somit sind diese beiden Formen leicht durch Auftrennung mittels Gelelektrophorese unterscheidbar.

c) RNA-Isolierung

NucleoSpin RNA II Kit

Um RNA aus Gewebeproben zu isolieren, wurde nach dem Protokoll des Herstellers Macherey-Nagel, 52355 Düren, verfahren. Dazu wurden die Proben aus dem Gefäß mit RNAlater in ein Gefäß mit 600 µl Lysepuffer (RA1 mit 1% β-Mercaptoethanol) gegeben und für die Dauer von 60 s auf Stufe 6 homogenisiert (Homogenisator DIAX 900).

Das Homogenisat wurde gemäß dem Protokoll weiter verarbeitet. Prinzipiell wurde dabei die RNA zuerst in Anwesenheit chaotroper Salze an eine Siliziumdioxidmembran gebunden und nach Abzentrifugieren aller unerwünschten Lösungen und Substrate mit RNase-freiem dH₂O wieder ausgewaschen. Die so gewonnene RNA-Lösung wurde bei -80°C gelagert.

Quantifizierung und Qualitätssicherung der gewonnenen RNA

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde die Absorption der RNA-Lösung in 10 mM Tris-Puffer (pH 7,5) bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (A_{260}) photometrisch bestimmt. Es wurden dabei Konzentrationen zwischen 100 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt.

Eine Beurteilung der Reinheit der gelösten RNA war mithilfe des Quotienten A_{260}/A_{280} möglich. Reine RNA weist dabei einen Wert von 1,9-2,1 auf. Kontamination durch Proteine führen zu einer hohen Absorption bei 280 nm und damit zu einem zahlenmäßig kleineren Quotienten.

Darstellung der Integrität der RNA mittels Gelelektrophorese

Die Integrität der RNA wurde durch Auftrennung mittels Gelelektrophorese und UV-Detektion nachgewiesen. Dabei wurden die für RNA typischen Doppelbanden (entsprechend den ribosomalen Untereinheiten) nachgewiesen.

Hierzu wurde 10 μl RNA-Lösung mit 2 μl Ladepuffer gemischt und in eine Tasche eines 1%igen Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte mit einer Stromstärke von 90 mA.

d) cDNA-Synthese

Aus der gewonnenen RNA wurde cDNA synthetisiert. Während der Bearbeitung wurde mRNA auch außerhalb des Kühlschranks kontinuierlich auf Eis gelagert.

Die cDNA-Synthesen wurden in Ansätzen von 30 μl durchgeführt. Bestandteile eines Ansatzes waren:

- 1,0 μl Oligo p(dT)₁₅-Primer 45 μM ,
- 6,0 μl 5x First-Strand-Puffer,
- 1,0 μl M-MLV Reverse Transkriptase 200 U/ μl ,
- 1,5 μl dNTP-Mix je 10 mM,
- 1,0 μl RNase-Inhibitor 30 U/ μl sowie
- 2 μg total RNA auf 19,5 μl Volumen aufgefüllt (3 min bei 75°C inkubiert).

Das Gemisch wurde zur cDNA-Synthese 1 h bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde es daraufhin 10 min bei 95°C inkubiert. Die so synthetisierte cDNA wurde bei -80°C gelagert.

e) RT-PCR

Ansatz

Reverse Transkriptase - Polymerase-Kettenreaktionen (RT-PCR) wurden in Ansätzen von 50 µl durchgeführt. Bestandteile eines Ansatzes waren:

- 5,0 µl 10x NH₄ Puffer,
- 1,5 µl 50 mM MgCl₂ Puffer,
- 0,2 µl PANscript Polymerase 5 U/µl,
- 0,5 µl dNTP-Mix je 10 mM,
- je 1,0 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer 20 µM,
- 37,8 µl dH₂O und
- 3,0 µl cDNA-Lösung oder genomische DNA (Konzentration bis circa 66,7 µg/ml).

Durchführung

Folgendes Temperaturschema wurde während der Reaktionen angewandt:

60 s Prädenaturierung bei 94°C (bei der Verwendung von genomischer DNA 5 min), dann 20 bis 45 Zyklen mit

- (1) 45 s Denaturierung bei 94°C,
- (2) 45 s mit primerspezifischer Annealingtemperatur und
- (3) 60 s (bei Fragmenten >1 kbp: 1 min/1 kbp) Elongation bei 72°C,

zuletzt 10 min Elongation bei 72°C.

Um die mit PCR amplifizierten Fragmente darstellen und analysieren zu können, wurde das Reaktionsgemisch mit Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

f) Agarose-Gelelektrophorese

Durchführung

10 µl einer Nukleinsäurelösung wurden mit 2 µl Ladungspuffer in die Taschen eines 1,0 - 1,2%igen Agarosegels gegeben. Für Marker wurden 5 µl pro Geltasche eingesetzt. Die Auftrennung der Banden erfolgte nach Einsetzen der beladenen Gele in eine Kam-

mer mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer (pH 8,0) mit einer Stromstärke von 60 mA. Als Farbstoff für Nukleinsäuren war Ethidiumbromid-Lösung dem Agarosegel und dem Puffer zugesetzt.

Quantitative Analyse

Zur quantitativen Bestimmung der Expression wurden die Banden der Agarosegele mit einem Geldokumentationssystem densitometrisch gemessen und mit der zugehörigen Software ausgewertet. Der Marker MassRuler Express DNA Ladder, LR Forward der Firma Fermentas, 68789 St. Leon-Rot wurde als Standard benutzt um die Vergleichbarkeit verschiedener Gele zu gewährleisten.

Für die weitere Betrachtung wurden die gemessenen Expressionswerte durch den Expressionswert von GAP-DH dividiert. Für die Darstellung in Grafiken wurde jeweils der Mittelwert der so erhaltenen Werte aus der Altersgruppe verwendet. Zudem wurde der Standardfehler dargestellt ($M \pm SEM$).

2.4 Walking PCR

Das DNA Walking SpeedUp Kit I der Firma Seegene erlaubt es, mit PCR ein Transgen mit bekannter Sequenz im Genom eines transgenen Organismus zu lokalisieren (siehe Abbildung 2-2, Seite 18). Mithilfe eines speziellen Primers (DNA Walking Annealing Control Primer, DW-ACP) kann die an das Transgen angrenzende Sequenz zunächst amplifiziert und dann sequenziert werden. Durch Zuordnung des Sequenzierungsergebnisses zu einem Abschnitt des Genoms der transgenen Tiere erfolgt die Feststellung des Ortes der Integration. Die Untersuchungen zur Lokalisation des Transgens wurden an genomischer DNA durchgeführt.

Prinzipiell erfolgte zunächst eine enzymatische Hydrolyse der DNA. Weiterhin wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren und mit PCR-Amplifikationen mit dem DNA Walking – Annealing Control Primer (DW-ACP) des Kits begonnen. Die so amplifizierten Sequenzen überspannten aufgrund der Beschaffenheit des DW-ACPs die Insertionsstelle des Transgens und enthielten somit bekannte und unbekannte Sequenzen. Die gewonnenen Fragmente wurden gereinigt, sequenziert und die nicht aus dem Transgen stammenden Abschnitte mithilfe der Suchmaschine BLAST einem Ort im Genom der Maus zugeordnet. Für die Suche nach relevanten Genen in der Umge-

bung wurden die Online-Anwendungen NCBI Sequence Viewer sowie der UCSC Browser benutzt.

a) enzymatische Hydrolyse

Es wurde angesetzt:

- 5 µl 10x enzyspezifischer Puffer,
- 0,5 µl 100x Bovine Serum Albumin,
- 4-5 U/µg Restriktionsenzym,
- ≤4 µg DNA in Lösung und
- dH₂O um das Volumen auf 50 µl aufzufüllen.

Der Ansatz wurde bei 2 h 37°C inkubiert, danach wurden die Enzyme durch Erhitzen auf 65°C (20 min) inaktiviert.

b) DNA Walking SpeedUp Kit I

Das Kit sieht drei PCR-Schritte in Folge vor (siehe Abbildung 2-2, nächste Seite).

Man benötigte dafür drei Rückwärtsprimer aus dem bekannten Transgen ("target specific primer", "TSP 1-3" in Abbildung 2-2). Es wurden dazu die Primer P 530 (als TSP 1), P 603i (als TSP 2) und P 528ai (als TSP 3) ausgewählt (siehe Anhang 1: Material, Oligonukleotide, Abbildung A - 2: CEA424SV 40 /large T-Antigen - Transgen mit Position von Primern).

Im ersten PCR-Schritt wurde der DNA Walking – Annealing Control Primer⁵⁵ als Vorwärtsprimer verwendet ("DW-ACP" in Abbildung 2-2, Step 1). Dieser Primer besteht aus einer Sequenz am 5'-Ende (in der Abbildung grün), einem poly-desoxy-Inosin-Abschnitt [poly(dI)] (rot) und der Sequenz NAGGTC am 3'-Ende (orange). Diese Sequenz bindet im Genom zufällig etwa in Abständen von 1-2 kb. Aufgrund des Inosin-Abschnitts paart das 5'-Ende des Primers während des entsprechenden Zwischenschrittes der PCR nicht mit dem Template-DNA-Strang.

Aufgrund dieser Eigenschaften wird in der Folge ein Fragment an der Grenze des Transgens amplifiziert, das sowohl bekannte Sequenzen des Transgens („Known

sequence“) als auch Sequenzen des Genoms an der Insertionsstelle („Unknown sequence“) enthält.

In weiteren PCR-Schritten wurde ein Vorwärtsprimer benutzt, der spezifisch für den 5'-Teil vor dem Inosin-Abschnitt des Annealing Control Primers ist ("DW-Primer" in Abbildung 2-2, Step 2 und 3). Damit konnte spezifisch ein Fragment ("Target Product") mit bekannten und unbekanntem Anteilen amplifiziert werden.

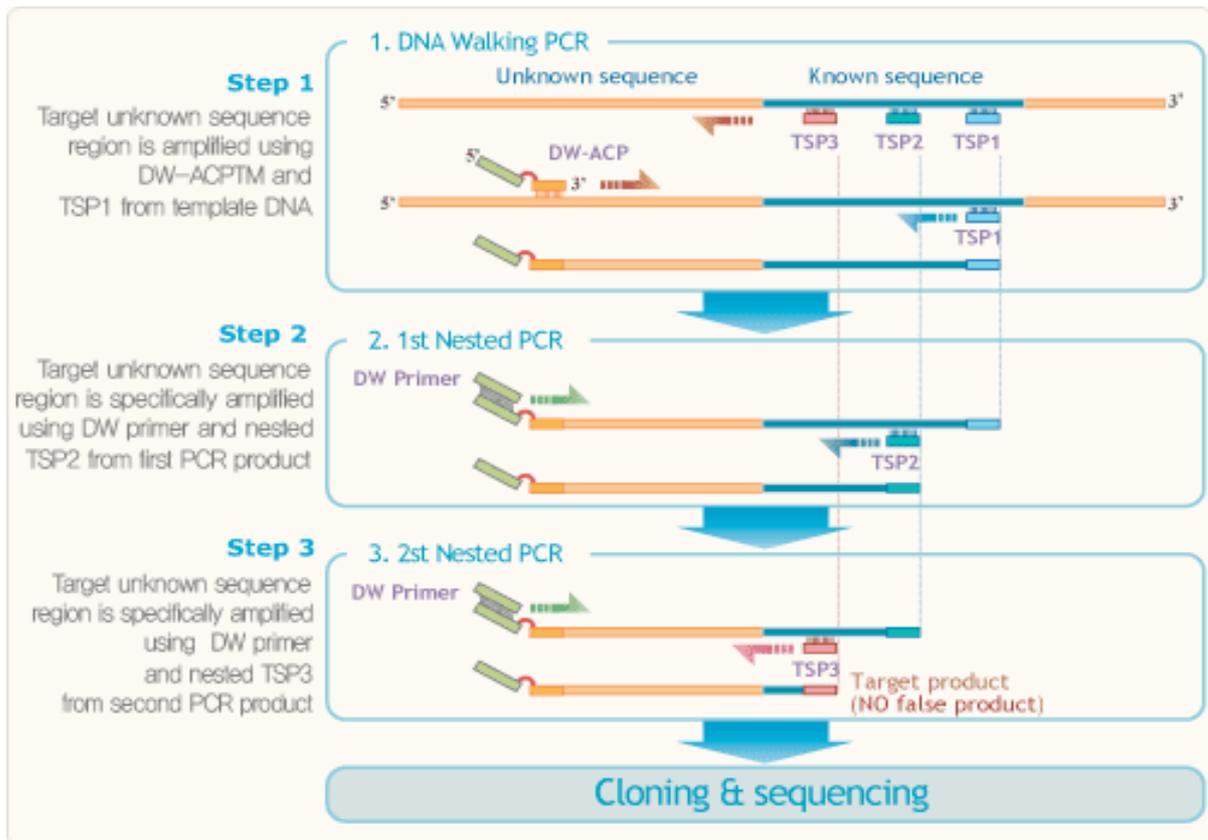


Abbildung 2-2: Prinzip der DNA Walking Technologie mit Annealing Control Primer (DW-ACP).

Es werden drei PCR-Schritte in Folge durchgeführt (nested-PCR).

Quelle: Firma Seegene

c) Reinigung von PCR-Produkten

In einem Zwischenschritt des DNA Walking Kits mussten die Produkte einer PCR gereinigt werden. Auch die Endprodukte wurden gereinigt bevor diese zur Sequenzierung gegeben werden konnten. Dazu wurde das Nucleo Spin Extract II Kit der Firma

Macherey-Nagel, 52355 Düren, verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers vefahren.

Der Kit beruht darauf, dass die DNA in Anwesenheit chaotroper Salze an eine Siliziumdioxidmembran bindet. Das Lösungsmittel mit allen Salzen und löslichen Makromolekülen kann daraufhin durch Zentrifugation entfernt werden. Anschließend wird die DNA wieder ausgewaschen und liegt somit in einer gereinigten Lösung vor.

d) Präzipitation von DNA

Vor der Sequenzierung wurde die DNA präzipitiert. Dabei wurde das Volumen einer DNA-Lösung mit dH₂O auf 100 µl aufgefüllt. Hierzu wurden 10 µl einer 3 M NaAc-Lösung (pH 5,2) gegeben. Nach dem Mischen gab man 200 µl 100%iges Ethanol dazu und mischte erneut. Diese Lösung ließ man bei -20°C über Nacht ausfällen. Anschließend erfolgte 20 min Zentrifugation bei 13200 min⁻¹ (16100 x g), abgießen des Ethanols, waschen durch Zugabe von 310 µl einer 70%igen Ethanol-Lösung, 15 min erneute Zentrifugation bei 13200 min⁻¹ (16100 x g) und erneutes Abgießen der Ethanol-Lösung. Abschließend wurde die Probe an Luft getrocknet.

e) Sequenzierung

Das mittels Walking PCR gewonnene Fragment wurde durch die Firma MWG-Biotech, 82152 Martinsried sequenziert.

Die erhaltene Sequenz wurde mithilfe des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST)^{6,7} des National Center for Biotechnology Information (NCBI), US National Library of Medicine (NLM), 8600 Rockville Pike, Rockville, MD USA 20894, einem Ort im Genom der Maus zugeordnet (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

f) Darstellung des Genoms

Für die Suche nach Genen in der Umgebung der Integrationsstelle wurden zwei öffentlich zugängliche Online-Anwendungen benutzt:

- der NCBI Sequence Viewer, Version 2.3, des National Center for Biotechnology Information (NCBI), US National Library of Medicine (NLM), 8600 Rockville Pike, Rockville, MD USA 20894 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sviewer/>);
-

- der UCSC Browser der UCSC Genome Bioinformatics Group, Center for Biomolecular Science & Engineering, University of California, Santa Cruz, 1156 High St., Santa Cruz, CA 95064 (<http://genome.ucsc.edu>)^{64,105}.

2.5 Mikroarray

a) Durchführung

Die Transkription wurde quantitativ mit einer Mikroarray-Analyse untersucht. Die Experimente dazu wurden extern in der Arbeitsgruppe Molekulare Tumorbologie und Tumorummunologie (Prof. Dr. med. Joachim L. Schultze) an der Klinik I für Innere Medizin, Klinikum der Universität zu Köln, von Frau Dr. Debey-Pascher durchgeführt.

Es kam dabei die BeadArray Technologie (siehe Abbildung 2-3) der Firma Illumina Inc., San Diego, CA 92121-1975, USA (<http://www.illumina.com>), zur Anwendung⁷⁰. Diese Methode beruht auf Kugeln ("beads") mit 3 µm Durchmesser, auf deren Oberfläche jeweils eine Art von Oligonukleotiden ("tags") befinden, die je ein bestimmtes Gen repräsentieren. Insgesamt 46 121 verschiedene Oligonukleotiden waren auf dem verwendeten Mikroarraychip (Sentrix Mouse-6 Expression Beadchip) vorhanden.

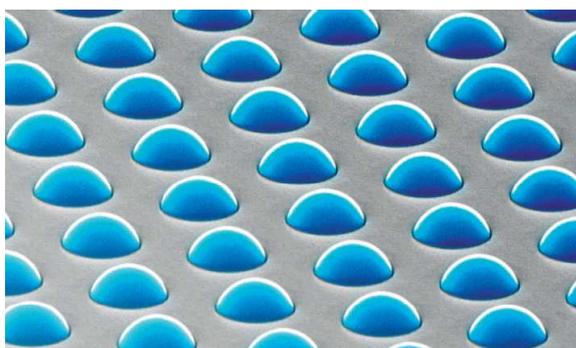


Abbildung 2-3: BeadArray-Technologie der Firma Illumina - elektronemikroskopische Aufnahme eines Mikroarraychips.

Quelle: Firma Illumina

Für die Durchführung einer Mikroarray-Analyse wird RNA auf den Mikroarraychip aufgebracht. Eine bestimmte RNA-Sequenz hybridisiert daraufhin mit dem zugehörigen Oligonukleotid. Aufgrund der Hybridisierung kommt es zur Lichtemission. Eine quantitative Messung dieser Emissionen erlaubt eine Berechnung der Konzentration der

RNA-Sequenz in der ursprünglichen Lösung, da diese proportional zur Lichtemission ist. Die Expressionswerte werden als RLU (relative light units, relative Lichteinheiten) angegeben.

Ein Gen kann auch mehrfach durch verschiedene Oligonukleotide repräsentiert werden. Dadurch war die Zahl der abgefragten Gene geringer als 46 121. Die so erfolgte mehrfache Bestimmung der Expressionswerte einiger Gene ermöglicht jedoch eine zusätzliche Plausibilitätskontrolle. Wenn der gemessene Expressionswert unter der Nachweisgrenze lag, wurde er mit "absent" markiert. Solche Werte wurden bei weiteren Betrachtungen, soweit sie nicht automatisch aussortiert wurden (siehe unten) mit dem Wert 0 behandelt.

b) Analysesoftware

BRB-ArrayTools

Eine softwaregestützte Auswertung der Ergebnisse der Mikroarray-Analyse erfolgte mit dem Programm BRB-ArrayTools, Version 3.6.0 – stable release, entwickelt von Dr. Richard Simon und Amy Peng Lam, Molecular Statistics and Bioinformatics Section, Biometric Research Branch, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland 20892-2440, USA (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>)¹²¹. In einem mehrstufigen Standardisierungsverfahren wurden die Datensätze zunächst umgerechnet und so Arrays untereinander vergleichbar gemacht.

i) Bearbeitung der Messwerte

Während des Imports in das Programm BRB ArrayTools wurden die gemessenen Expressionswerte mathematischen Umformungen unterworfen. Dabei wird in diesem Programm jeder Datenwert immer als Logarithmus zur Basis 2 dargestellt. Zudem wurden die Werte normalisiert^{120,153}. Anschließend wurden sie gefiltert und solche ausgeschlossen, die

- unter der Nachweisgrenze lagen (als "absent" markiert) oder
- nur minimale Veränderungen über die betrachteten Arrays zeigten (weniger als 3 Messwerte sind zum medianen Messwert um mehr als das 1,5-fache verändert).

Von den 46 121 gemessenen Expressionswerten blieben nach diesem Verfahren 3 594 übrig.

ii) Darstellung als Streudiagramm

Um Veränderungen der Genexpression anschaulich machen zu können, wurden Streudiagramme erstellt. Dabei wurde für jedes Gen der mittlere Expressionswert über die jeweilige Gruppe gebildet. Um jeweils zwei Gruppen zu vergleichen, wurde eine Grafik erstellt, in der jedes Gen durch genau einen Punkt repräsentiert ist. Der Wert für die Kontrollgruppe wurde auf der Abszisse aufgetragen, der für die 90 Tage alten transgenen Tiere auf der Ordinate. Aus den Berechnungen für die Streudiagramme wurden mittels Setzen von Grenzwerten die Listen der deregulierten Gene erzeugt.

iii) Multidimensionale Skalierung

Eine Multidimensionale Skalierung der Mikroarray-Daten erfolgte durch einen Algorithmus des Programms BRB-ArrayTools. Unter Multidimensionaler Skalierung versteht man ein multivariantes Verfahren, mit dem eine große Zahl von Variablen gleichzeitig analysiert und niedrigdimensional (in der Regel 2- oder 3-dimensional) dargestellt werden kann.

Ausgangsvariablen für diese Analyse waren die Expressionswerte der 3594 Gene, die in dem unter i) beschriebenen Verfahren ausgewählt worden waren. Anhand dieser werden durch Linearkombination für jede Mikroarray-Analyse drei Variablen berechnet, die als Koordinaten in einem dreidimensionalen Raum verstanden werden können. Als Metrik wurde der euklidische Abstand mit zentrierter Korrelation gewählt.

Eine Darstellung des Ergebnisses dieser Multidimensionalen Skalierung erfolgt durch Darstellung der Mikroarray-Analysen als Punkte in einem dreidimensionalen Raum. Der Abstand zwischen den Punkten entspricht dem euklidischen Abstand zwischen den einzelnen Mikroarray-Analysen und stellt damit ein Maß für die Ähnlichkeit der Expressionswerte dar. Somit kann die Multidimensionale Skalierung in dieser Form als Cluster Analyse verstanden werden, mit der Ähnlichkeiten in der Expression aller in die Analyse eingeschlossenen Gene veranschaulicht werden können. Die Durchführung dieses Verfahrens und die Interpretation der Ergebnisse erfolgte nach den Vorgaben des Programms BRB-ArrayTools, wie zuvor von Khan et. al.⁶⁵ und Hedenfalk et. al.⁴⁹ beschrieben. Der euklidische Abstand entspricht im dreidimensionalen Raum dem anschaulichen Abstand.

Zum Vergleich wurden zusätzlich Mikroarraydaten von einer aus dem Tumor etablierten Zelllinie (PD Dr. R. Kammerer, Labor für Tumormimmunologie, Klinikum der Universität München, 81377 München) in die Darstellung integriert (Zellkultur).

iv) Heatplot

Um Hoch- und Herunterregulierung von Genen zusätzlich mit einer Cluster-Analyse zu veranschaulichen, wurden die Expressionswerte als Heatplot dargestellt. Auch in dieser Abbildung wurden die Daten der Tumorzellkultur zum Vergleich mit aufgetragen.

Gene Ontology

Um die Funktionen der Genprodukte der untersuchten Gene systematisch darstellen und beschreiben zu können, wurde die Datenbank Gene Ontology verwendet (<http://www.geneontology.org/>). Diese hält hierzu einen kontrollierten hierarchisch aufgebauten Wortschatz bereit^{10,47}. Mit dieser Analyse wurde untersucht, mit welchen funktionellen Veränderungen die beschriebenen Veränderungen in der Genexpression einhergehen.

GoSurfer

Grafische Darstellungen von Gene Ontology Termen wurden mit dem Programm GoSurfer¹⁵⁵ erstellt (<http://bioinformatics.bioen.uiuc.edu/gosurfer/>).

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Um mit den Ergebnissen der Mikroarray-Analysen deregulierte Signalkaskaden identifizieren zu können, wurde das Programm Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)^{17,87,126,127} verwendet (<http://www.broadinstitute.org/gsea/>). Die untersuchten Signalkaskaden wurden als Listen von Genen aus der mit dem Programm verbundenen Datenbank Molecular Signature Database (MSigDB)¹²⁶ entnommen (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/>).

2.6 statistische Auswertungen

An den mittels RT-PCR und Mikroarray gewonnenen Expressionsdaten wurden mit dem Programm Sigma Plot for Windows, Version 11.0 (Firma Systat Software GmbH, 40699 Erkrath, <http://www.systat.de>) statistische Analysen durchgeführt.

Allgemein wurde bei statistischen Tests ein p-Wert von $p < 0,05$ als signifikant erachtet.

a) Student's t-Test, Rangsummentest

Um die Expressionswerte zweier Versuchsgruppen zu vergleichen, wurde Student's t-Test verwendet³⁴. Falls die Voraussetzungen hierfür nicht gegeben waren (Normalverteilung der Grundgesamtheit) wurden stattdessen Rangsummentests nach Mann-Whitney-Wilcoxon^{80,149} durchgeführt. Die Normalverteilungsannahme wurde jeweils mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft¹¹⁸.

b) Varianzanalysen (ANOVA)

Bei der statistischen Analyse aller RT-PCR-Expressionsdaten eines Gens wurden zweifaktorielle Varianzanalysen gewählt. Hierdurch konnten die Unterschiede zwischen den Expressionswerten in den Magenregionen Corpus und Antrum sowie zwischen den Altersstufen und den Kontrollen auf Signifikanz geprüft werden.

Einfaktorielle Varianzanalysen wurden mit den Mikroarray-Daten durchgeführt, da hier die Genexpression ausschließlich im Antrum des Magens bestimmt wurde und somit nur der Faktor Alter zu untersuchen war.

Bei allen Varianzanalysen wurden die Daten zunächst mit dem Normalitätstest nach Shapiro-Wilk¹¹⁸ analysiert. Konnte die Normalverteilungsannahme aus den im Zuge der Experimente gewonnenen Daten nicht belegt werden, so wurde auf die Varianzanalyse auf der Grundlage von Rangsummen nach der Methode von Kruskal und Wallis⁶⁹ zurückgegriffen. Um bei Varianzanalysen eine Kumulierung des Alphafehlers zu korrigieren, wurde die Methode nach Holm-Sidak^{51,119} angewendet.

3) Ergebnisse

3.1 Tumor und Onkogen

a) Nachweis der Transgenität

Die Untersuchungen dieser Arbeit erfolgten an Tieren, die mit dem CEA424/SV 40 large T-Antigen transgen waren. Diese waren jeweils die heterozygoten Nachkommen von transgenen Männchen mit nichttransgenen Weibchen.

Der Nachweis der Transgenität erfolgte mittels PCR an genomischer DNA. Die verwendeten Primer P530 und P531 überspannten ein 735 bp großes Fragment des Transgens aus dem SV 40 large T-Antigen. Eine Amplifikation dieses Fragments wies somit die Integration des Transgens ins Genom der Tiere nach (siehe Abbildung 3-1).



Abbildung 3-1: Nachweis des CEA424/SV 40 large T-Antigen – Transgens.

links: Marker (GeneRuler 100bp DNA Ladder)

rechts: PCR-Fragment, Amplifikation genomischer DNA mit den Primern P530 & P531

Das Fragment enthält ein Intron von 346 bp. Wenn die ungesplice Form mit 735 bp aus DNA amplifiziert wird, handelt es sich somit um die genomische Form des Transgens, wie sie bei der Entwicklung des Tiermodells verwendet wurde¹³⁰.

b) Der Tumor makroskopisch

Alle Mäuse, die mit dem CEA424/SV 40 large T-Antigen transgen waren, entwickelten einen Tumor im Antrum des Magens. Dieser war am geöffneten Abdomen ab einem Alter von 30 Tagen makroskopisch sichtbar.

An einer 95 Tage alten Maus wurde der Tumor fotografisch dokumentiert (siehe Abbildung 3-2, nächste Seite). Im Bereich des Antrums des Magens konnte von außen eine Auftreibung mit fester Konsistenz festgestellt werden (Δ in Abbildung 3-2a). Auffällig war am eröffneten Abdomen zudem eine Gallenblase, die bis zu 1 cm in der Längsachse maß. Dies stellt im Vergleich zur anatomischen Literatur über die Maus eine deutliche Vergrößerung dar^{68,99}. Im Lymphabflussgebiet des Magens fielen zudem bis zu 0,5 cm in der Längsachse vergrößerte Lymphknoten auf (* in Abbildung 3-2b).

Am eröffneten Magen stellte sich der Tumor als abgrenzbare helle Verdickung der Schleimhaut am gastroduodenalen Übergang dar. Die für den Corpus des Magens charakteristische Längsfaltung war im Antrumbereich verstrichen (MaA in Abbildung 3-2c). In einigen Fällen trug der tumoröse Bereich auch ulzerierende Erosionen.

Diese Befunde führten dazu, dass die Expression des SV 40 large T-Antigens im Magen im Vergleich zu anderen Organen untersucht wurde.

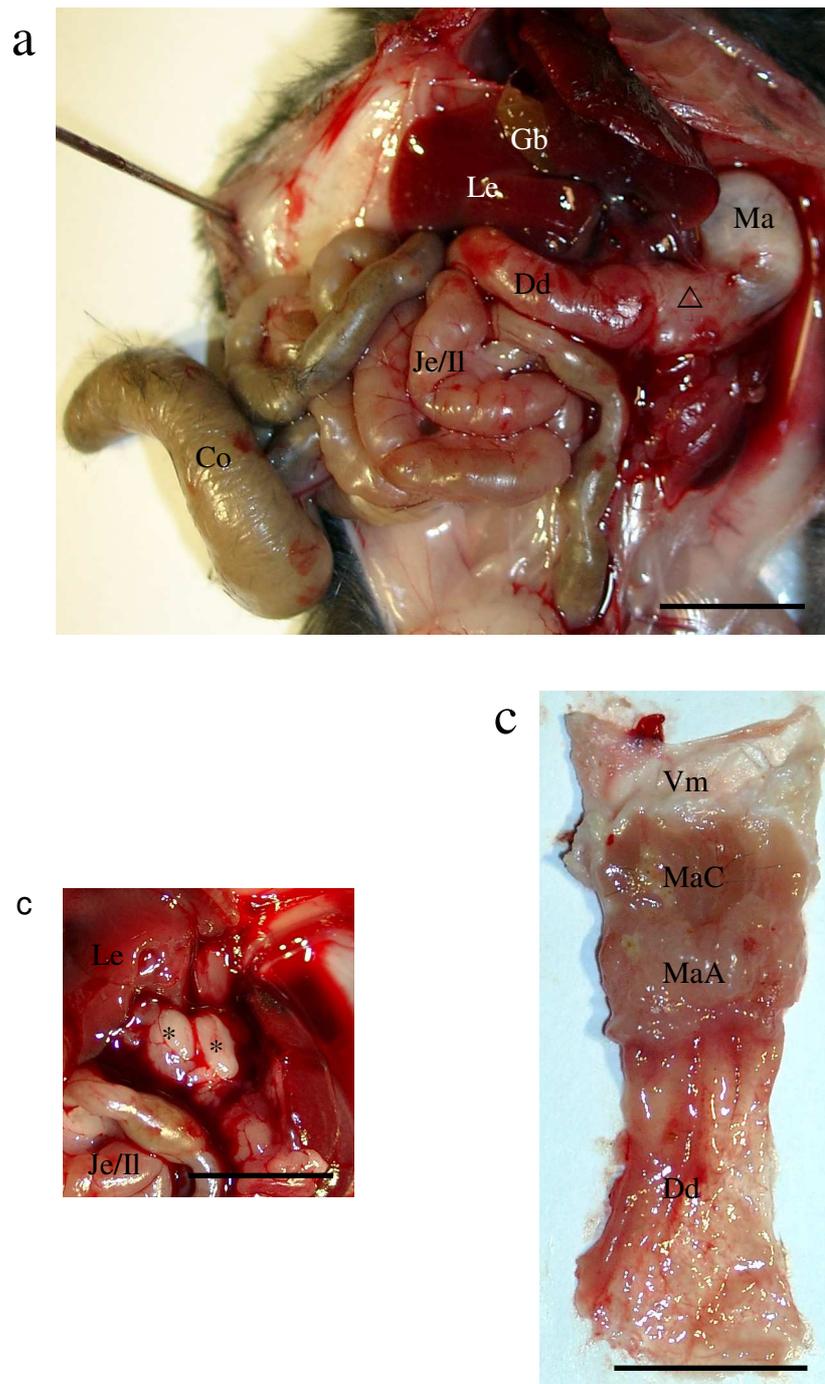


Abbildung 3-2: Befund an einer 95 Tage alten transgenen Maus.

- (a) Abdomen, in der Medianlinie eröffnet, Tumor sichtbar Δ .
 (b) Lymphknoten (*) dorsal des Magens, nach Entfernung desselben.
 (c) Magen mit Duodenum, entlang der kleinen Kurvatur eröffnet.

Beschriftung: Gb, Gallenblase; Le, Leber; Vm, aglandulärer Vormagen; Ma, Magen; Dd, Duodenum; Je/II, Jejunum und Ileum; Co, Colon caecum; MaC, glandulärer Magen Corpus; MaA, Magen Antrum; Dd, Duodenum.

Maßstab: 1cm

c) Der Tumor mikroskopisch

Um das Expressionsmuster des SV 40 large T-Antigens noch genauer zu untersuchen, wurde eine mikroskopische Analyse von Gewebeproben aus dem Antrum transgener Mäuse mit einer immunhistochemischen Anfärbung dieses Onkogens durchgeführt (siehe Abbildung 3-3).

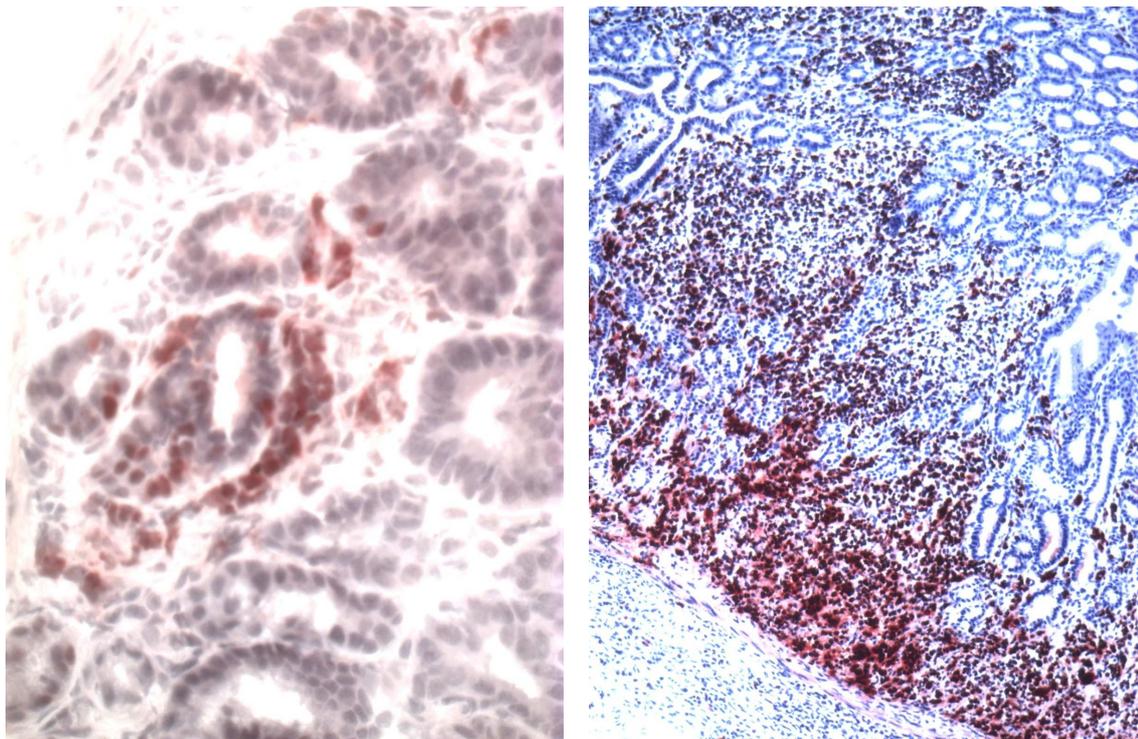


Abbildung 3-3: Immunhistochemische Darstellung des SV 40 large T-Antigens im Antrum des Magens transgener Mäuse in verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung.

Färbung: Antikörper gegen SV 40 large T-Antigen (braun); Gegenfärbung: Hämatoxylin-Eosin

links: Befund an einer 40 Tage alten Maus, Vergrößerung 400fach.

rechts: Befund an einer 90 Tage alten Maus, Vergrößerung 50fach.

Hierbei zeigte sich in einem frühen Stadium der Tumorentwicklung eine auf nur wenige Zellen begrenzte Expression des SV 40 large T-Antigens. Diese sind vornehmlich im Stroma lokalisiert, wobei vereinzelt auch Zellen der Epithelien der Magendrüsen eine positive Färbung aufzuweisen scheinen.

Im fortgeschrittenen Stadium ist das Stroma von T-Antigen-exprimierenden Zellen durchsetzt. Eine Expression unterhalb der Basalmembran findet dabei nicht statt. Auch stellt sich der Bereich der Drüsenepithelien frei von Onkogenexpression dar.

d) Organspezifische Expression des Onkogens

Die Expression des SV 40 large T-Antigens wurde an Geweben von Magen, Milz, Leber und Lunge qualitativ untersucht. Vom Magen wurden dabei zwei Gewebeproben entnommen: aus dem makroskopisch sichtbar tumorösen Bereich im Antrum und aus dem tumorfreien Corpus.

Die stärkste Expression zeigte dabei sich im Antrum des Magens. Die Bande mit einer Größe von 388 bp steht dabei für das Amplikon ohne Intron, also für das in RNA transkribierte und gespligte T-Antigen. Daneben sind im Bereich von 700 bp zwei Banden erkennbar – diese weisen auf die noch ungespligte Form mit 734 bp hin, bei der das Amplikon noch das Intron enthält. Dass an dieser Stelle zwei Banden sichtbar sind, könnte ein Hinweis auf die äußerst komplexen Spliceprozesse des SV 40 large T-Antigens, wie sie schon anderweitig beschrieben worden waren^{42,63}. Wahrscheinlicher ist hier jedoch ein Artefakt während der Gelelektrophorese.

Analog dazu konnte im Corpus des Magens ebenfalls eine Expression des T-Antigens nachgewiesen werden. Diese war jedoch geringer ausgeprägt. Bei beiden Proben aus dem Magen belegt das Fehlen von Banden bei den Kontrollen („-RT“), dass keine DNA-Kontaminationen vorlagen.

In der Leber war eine Expression des T-Antigens nicht nachweisbar. In Milz und Lunge fanden sich dagegen Fragmente im Bereich von 700 bp, was jedoch aus einer DNA-Kontamination resultiert. Dies ist aus den ebenfalls vorhandenen Banden bei den Kontrollen ersichtlich (siehe Abbildung 3-4).

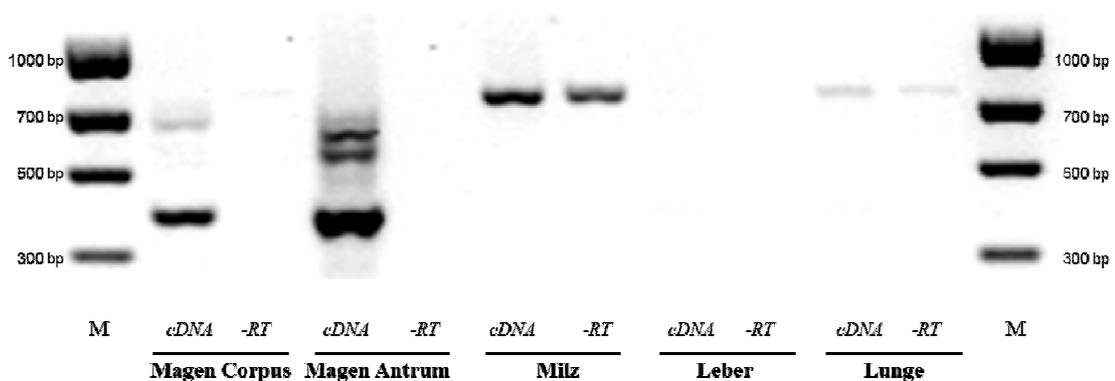


Abbildung 3-4: Expression des SV 40 large T-Antigens bei einer 60 Tage alten transgenen Maus.

M: Marker (MassRuler Express™ LR Forward DNA Ladder);

cDNA: Primer P530 & P531 an cDNA aus totaler RNA;

-RT: Kontrolle (cDNA-Synthese ohne Zugabe von reverser Transkriptase).

Hierdurch wäre die organspezifische Expression des SV 40 large T-Antigens im Magen belegt. Eine Expression des Proteins kann durch das Fehlen eines Fragments mit 388 bp in Leber, Milz und Lunge ausgeschlossen werden. Deutlich wird auch die Notwendigkeit zur Durchführung von –RT-Kontrollen auch bei PCR-Experimenten mit qualitativen Fragestellungen, da nur so eine Fehlinterpretation aufgrund von DNA-Kontaminationen ausgeschlossen werden kann.

e) Entwicklung der transgenen Mäuse

Die transgenen Tiere zeigten zunächst unauffällige Entwicklung und Verhalten. Ab einem Alter von 100 Tagen begannen sie stark an Gewicht zu verlieren. Bei einer Gewichtsabnahme von mehr als 10% oder wenn sie ein Alter von 120 Tagen erreicht hatten wurden die Tiere getötet. Als Ursache für den Gewichtsverlust wird die Verlegung der Magenpassage durch den Tumor vermutet.

f) Onkogenexpression im Verlauf

Da sich im Magen tumoröses und nicht-tumoröses Gewebe befindet, stellte sich die Frage, wie sich die Expression des Onkogens quantitativ einerseits im Verlauf der Entwicklung der Tiere und andererseits im Vergleich von Magen Corpus zu Magen Antrum verhielt.

Aus diesem Grund wurde die Expression des SV 40 large T-Antigens in verschiedenen Tumorstadien mit quantitativer RT-PCR untersucht (siehe Abbildung 3-5, nächste Seite oben). In der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) konnte dabei kein signifikanter Unterschied zwischen der Genexpression in den Magenregionen gefunden werden ($p = 0,102$).

Jedoch stellte sich der Verlauf der Expression des SV 40 large T-Antigens über die Zeit als signifikant dar, wenn die Expressionsdaten ohne Berücksichtigung ihrer Herkunft aus der jeweiligen Magenregion Corpus oder Antrum betrachtet wurden ($p = 0,043$). Im Rangsummentest waren dabei die mittleren Expressionswerte der Kontrollen ($p = 0,024$) beziehungsweise der 30 Tage alten transgenen Tiere ($p = 0,019$) signifikant verschieden zu denen bei 90 Tage alten transgenen Tieren (Abbildung 3-6, nächste Seite unten).

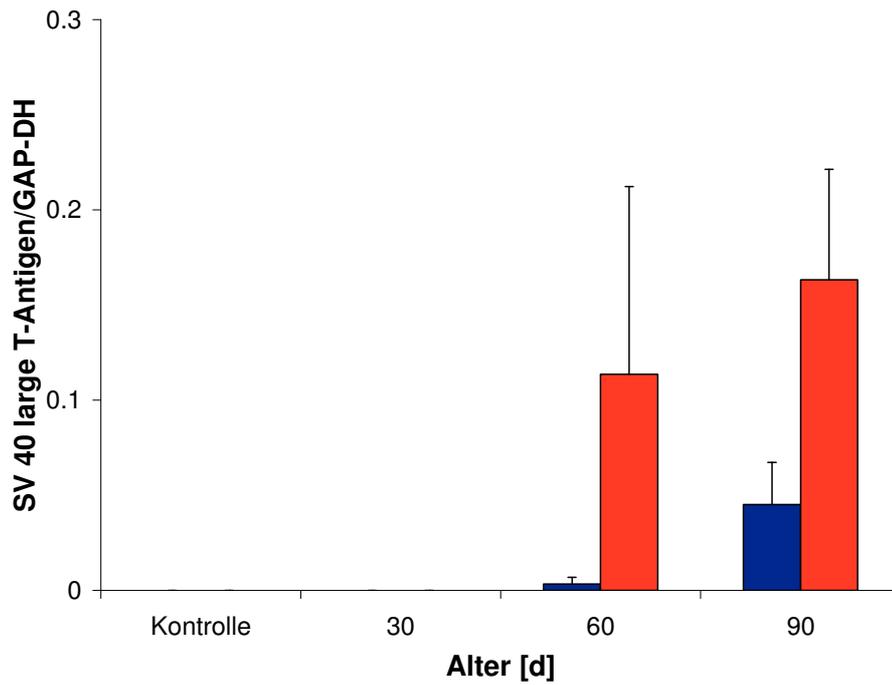


Abbildung 3-5: Expression des SV 40 large T-Antigens im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

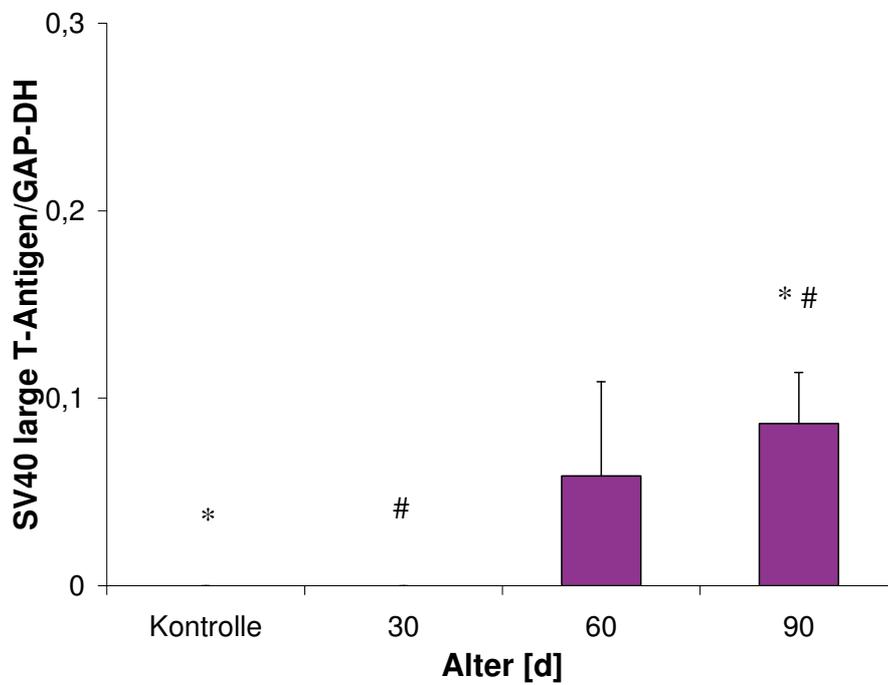


Abbildung 3-6: Expression des SV 40 large T-Antigens im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Werte aus Magen Corpus und Antrum violett; M + SEM;

*: $p = 0,024$, #: $p = 0,019$ (Rangsummentest).

Da das large T-Antigen nur in tumorös verändertem Gewebe exprimiert ist, repräsentiert es somit das Wachstum des Tumors. Vermutlich kommt die gefundene Expression des Onkogens im Corpus und die fehlende Signifikanz beim Vergleich der Expressionswerte aus Magen Antrum gegen Magen Corpus wahrscheinlich einerseits durch die Ausbreitung des Tumors in benachbarte Strukturen, andererseits durch die nicht ausreichende Trennschärfe bei makroskopischer Unterscheidung nach Corpus und Antrum des Magens zustande.

3.2 Integration des Transgens

Als nächster Schritt wurden der Ort und die Art der Integration des Transgens in das Genom der Mäuse untersucht.

Der Grund dafür war, dass ein Einfluss der Integrationsstelle auf die Expression des Onkogens für möglich gehalten wurde. Eine Nähe des Transgens zu Genen, die in einer bestimmten Zellpopulation starke Expression zeigen, wurde dabei als mögliche Ursache für die selektive Expression des Onkogens in solchen Zellen angesehen.

a) Das Transgen liegt im murinen Chromosom 4

Mit dem DNA Walking SpeedUp Kit I der Firma Seegene können Transgene mit bekannter Sequenz im Genom eines transgenen Tieres lokalisiert werden. Am hier untersuchten Modell konnte mit dem Kit ein Fragment von ca. 700 bp amplifiziert werden. Dieses wurde sequenziert, dabei bestand ein Teil des Fragments aus einem Abschnitt des Transgens, 482 bp waren unbekannt und repräsentierten somit eine Sequenz aus dem angrenzenden Genom der Maus. Diese Sequenz konnte daraufhin mit der Suchmaschine BLAST einem Abschnitt des murinen Chromosoms 4 im Bereich 4qB (NT_109315.3, Nukleotide 5.781.991 bis 5.782.472) zugeordnet werden.

Um diesen Befund zu überprüfen, wurde ein Primer stromabwärts der vermuteten Lage des 3'-Endes des Transgens ausgewählt (P826). Eine Amplifikation mit Primern aus dem Transgen ergab Fragmente wie vorhergesagt mit Längen von ca. 900 bp und ca. 1000 bp, die somit die oben beschriebene Lage des Transgens bestätigten (siehe Abbildung 3-7, nächste Seite).

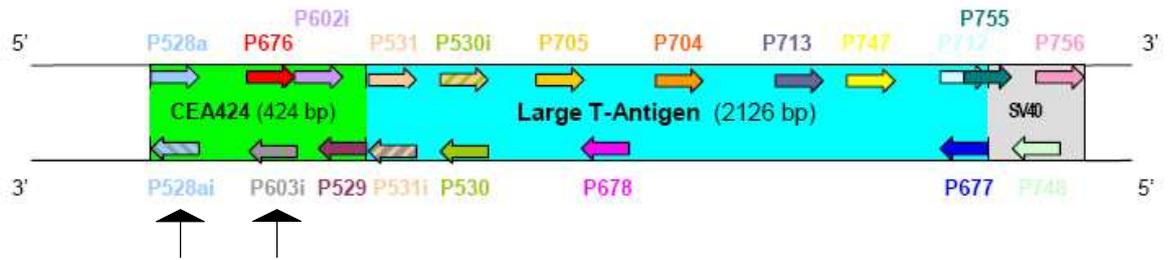
a

```

5781781 gactcgggct tcaatcccgc acttggggct atatcctaat tttgtgcaag ttttggtagg
5781841 gagcagaata caagccagct gcagttagct ggggagctact atatcatatt tgaataaatg
5781901 ggtagcatag actccacagc ttagggagaa atggcaacat ctggaagcag cagacccata
5781961 atcagaacag atggcccttc cccgagggat#agaaaagtaa actagtctcc ttaaataago
5782021 catctgtctg aataatcatt ttcaccaatt aataaagaag acatttgaag ggctgagaaa
5782081 tatgataatt ctaaaactag ggagataaaa gaagtactat ttacctaat atataaagat
5782141 actattccta gacatctatg ttgaatataa aatagctcca atttttattg cctgtctcaa
5782201 acgctttctg gaaatagctg aattgggtgca aggcaaatca atagatcaat tcagtctgca
5782261 gtgagaaatt tgacttgctt gtcagctatg tgtattgtca ttgatcacca agatcaactc
5782321 agattaaaca gcacaagtga catgtgtctc aataaaacag agattcatag tatttaaatg
5782381 ggagctaatt ttggatcctt ggaaatgctt ttataatfff gtgatgtctt actactgttg
5782441 gtgaagacat tccctatggt tcaactatctc tctttttttt tcattctatg ctcaagccat
5782501 atggaaaaat agtatggata acctgttoac acagctctgc aataatataat taatgtatat
5782561 gctgctccca gcctaaagga ccttctctac ttgggaaaaat tacgaaaagg cttctcattt
5782621 cttgtctgac ctcaagcttc ttatctgaga aaaattatff aatcattcag aaaagtccat
5782681 gttgtttgtg cagcttctca ctgaatctaa actctgctaa tcaaagtga gtgctgtcat
5782741 acctaactta ttaattgtaa aacgccactc ctaagttagt gtgtcgacac agggaacagg
                    Primer P826: [3'ca cacagctgtg tcccttgtcc5']
5782801 tactgtcact cagctttgag gcattttccc ttggaaataa atctttaaaa caaatgttta
5782861 caaatggata ataaatgatc agaagctgtg ctgacaaaat aagagtttac tttgtaaaaa
5782921 ataaagtatc attaagatgg aaatatatgt cagtgttaag attttttaca tatgatgatg

```

b



c



Abbildung 3-7: Lokalisation des Transgens

(a) Ausschnitt aus dem murinen Chromosom 4 (NT_109315.3); #: Lage des Transgens; rot: mit Walking PCR amplifizierte und sequenzierte 482 bp; grün: Lage des Primers P826.

(b) Übersicht über das Transgen und die Lage von Primern (B. Lorenz). ↑: für die Bestätigung des Sequenzierergebnisses verwendete Primer.

(c) Links: mit P826 und P528ai amplifiziertes Fragment; mitte: 100bp Ladder; rechts: mit P826 und P603i amplifiziertes Fragment.

b) Das Transgen ist mehrfach integriert

Um festzustellen, ob das Transgen möglicherweise mehrfach hintereinander integriert wurde, wurden PCR-Amplifikationen mit ausgewählten Primerkombinationen durchgeführt. Die dabei amplifizierten Fragmente weisen auf eine Integration des Transgens mehrfach hintereinander in gleicher Orientierung hin (Abbildung 3-8).

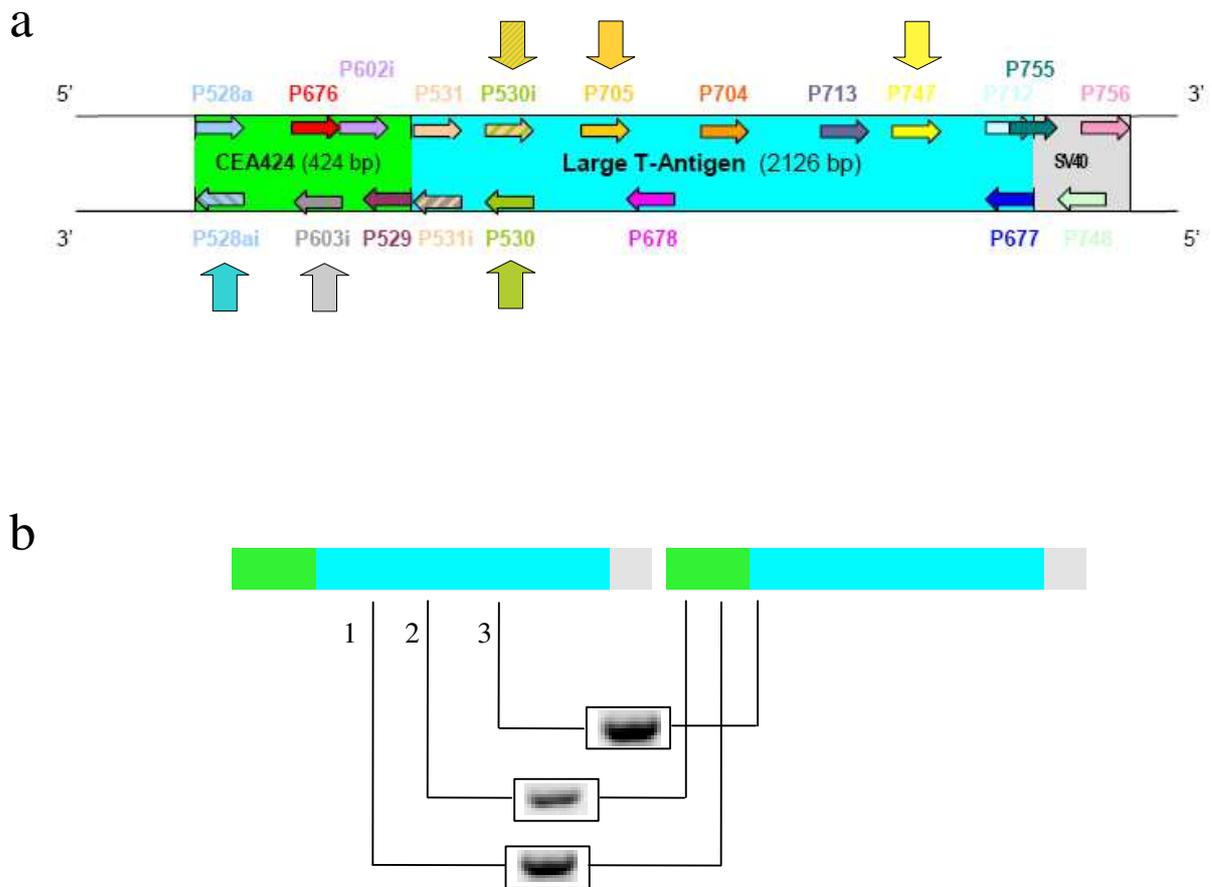


Abbildung 3-8: Anordnung des Transgens

(a) Übersicht über die Lage der Primer im Transgen (B. Lorenz).

(b) Amplifikationen unter der Hypothese mehrfacher gleichsinniger Integration:

- 1: Primer P 530i und P 603i ;
- 2: Primer P 705 und P 528ai ;
- 3: Primer P 747 und P 530 .

Zusammenfassend konnte somit das Transgen auf dem Chromosom 4 lokalisiert werden. Die Integrationsstelle fällt dabei in eine Region in der wenige kodierende Sequenzen zu finden sind.

Die nächstliegenden Gene mit beschriebener Funktion sind Lingo2 und Ifnk sowie Aco1. Lingo2 befindet sich 1,5 Mb stromaufwärts. Es spielt eine Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung des zentralen und peripheren Nervensystems^{43,52}. Ifnk liegt 2,2 Mb stromaufwärts. Dieses Gen kodiert für das Zytokin Interferon- κ ¹³⁸. Aco1 ist stromabwärts 2,8 Mb von der Integrationsstelle des Transgens entfernt. Es ist beteiligt an der intrazellulären Regulation des Eisenstoffwechsels⁸. Zudem spielt es eine Rolle bei Entzündungsreaktionen und besitzt als Aconitase eine Funktion im Citratzyklus¹³⁹.

Für alle drei Gene ist keine besondere Funktion im Gastrointestinaltrakt bekannt. Es liegen auch keine Hinweise vor, dass eines dieser Gene speziell im Antrum des Magens stark exprimiert ist. Darüber hinaus befinden sich im Umkreis von insgesamt 4,0 Mb um die Integrationsstelle keine bekannten endogenen Onkogene oder Tumorsuppressorgene, bei denen es durch die Integration zu einer gain- oder loss-of-function-Mutation gekommen sein könnte. Somit ergibt sich aus den gewonnenen Daten kein Hinweis darauf, dass die Insertionsstelle des Transgens für die organspezifische Tumorentstehung bedeutsam wäre.

Um die Ursache der organspezifischen Tumorentwicklung aufzudecken, wurden daher nun Genexpressionsanalysen über die Zeit durchgeführt. So sollten Signalkaskaden und lokale Faktoren identifiziert werden, die eine Rolle bei der Tumorentwicklung spielen.

3.3 Expressionsanalysen ausgewählter Gene

Unter der Vorstellung, dass lokale Proliferations- oder Differenzierungsfaktoren die Expression des SV 40 large T-Antigens treiben und damit wie von Nöckel et. al. beschrieben zur Entwicklung eines Adenokarzinoms⁹⁰ führen, wurde nun mittels RT-PCR gezielt die Expression ausgewählter Gene im Verlauf der Tumorentwicklung untersucht.

Auf der Grundlage von Literaturrecherchen wurden hierfür Gene ausgewählt, die einzeln oder im Rahmen einer Signalkaskade (Pathway) Proliferation oder Differenzierung

verschiedener Zellpopulationen im Gastrointestinaltrakt bewirken (siehe Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2).

Tabelle 3-1: Übersicht über untersuchte Gene aus bekannten Signalkaskaden

Abschnitt	Name	untersuchte Gene	Rationale für die Untersuchung
a)	Wnt	Wnt5a, Fzd5, Lef1, Tcf4	Proliferation von Zellen des Gastrointestinaltraktes, kolorektale Karzinogenese
b)	Hedgehog	Shh, Dhh, Ihh, Gli	Regulation der Embryonalentwicklung im Gastrointestinaltrakt
c)	Notch	Dll1, Notch1	Differenzierung intestinaler Epithelien

Tabelle 3-2: Übersicht über untersuchte Rezeptoren und lokale Faktoren

Abschnitt	untersuchte Gene	Rationale für die Untersuchung
d)	Egf-Rezeptor	Autonomie von äußeren Wachstumssignalen, Proliferation
e)	Hgf-Rezeptor	Kolorektale Karzinogenese
f)	Pkd1	Regulation von Proliferation und Differenzierung von Epithelien
g)	Hes1, Math1, Pdx1	Transkriptionsfaktoren zur Differenzierung im Gastrointestinaltrakt
h)	Gastrin, Cck2r	lokale Expression, Einfluss auf Karzinogenese

Bei der Beurteilung der gewonnenen Daten wurden vor allem die folgenden Aspekte in Betracht gezogen:

- Expression bei den transgenen Tieren im Vergleich zu den Kontrollen;
- Unterschiede in der Expression in den Magenregionen Corpus und Antrum;
- Verlauf der Expression über die Zeit bei transgenen Tieren im Alter von 30, 60 und 90 Tagen.

a) Wnt-Signalkaskade

Die Wnt-Signalkaskade spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Proliferation von Epithelien im Gastrointestinaltrakt, sowohl während der Embryogenese als

auch bei adulten Individuen. Fehlregulierte Wnt-Signale werden mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht, zum Beispiel bei der Adenom-Karzinom-Sequenz in Colon und Rektum^{15,102}.

Wnt-Liganden werden sezerniert um die Entwicklung von benachbarten Zellen zu beeinflussen. Sie wirken dabei über verschiedene Rezeptoren auf zahlreiche intrazelluläre Vorgänge. Am besten beschrieben ist die kanonische Wnt-Kaskade, bei der die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor der Frizzled-Familie intrazellulär die Stabilisierung von β -Catenin bewirkt. β -Catenin wiederum führt im Zellkern zusammen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung bestimmter Zielgene⁹¹. Um ein verändertes Wnt-Signal im Gewebe transgener Tiere gegenüber Kontrollen oder im Verlauf der Tumorentwicklung nachweisen zu können, wurde mit RT-PCR die Expression von Genen untersucht, die sich an verschiedenen Stellen der Wnt-Kaskade befinden.

Es gibt bei Säugetieren insgesamt 19 Liganden der Wnt-Kaskade. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Expression von Wnt5a untersucht, da es Hinweise auf eine selektive Expression im Darm gibt (siehe Abbildung 3-9).

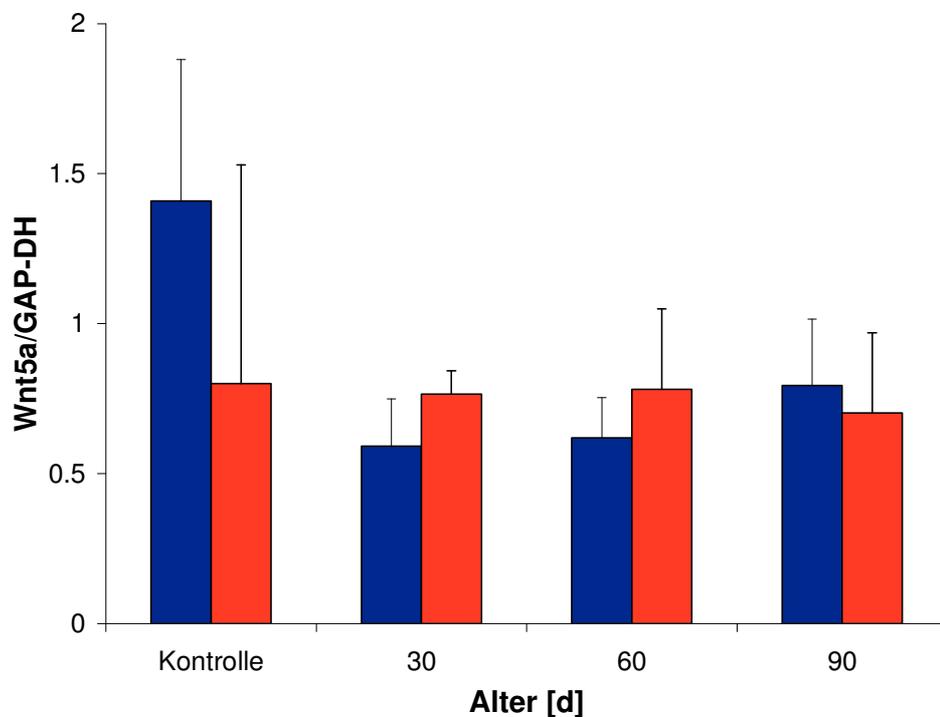


Abbildung 3-9: Expression von Wnt5a im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

Die statistische Analyse der gewonnenen Daten mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede, weder im Vergleich der Magenregionen Corpus und Antrum ($p = 0,699$), noch der Kontrollen gegenüber den einzelnen Zeitpunkten der Tumorentwicklung beziehungsweise der einzelnen Zeitpunkte der Tumorentwicklung untereinander ($p = 0,667$). Auch die Verläufe in den jeweiligen Magenregionen über die Zeit für sich betrachtet zeigten keinen signifikanten Verlauf ($p = 0,714$). Somit konnte hier für Wnt 5a keine veränderte Expression im Zuge der Tumorentwicklung nachgewiesen werden.

Die wichtigsten Rezeptoren der kanonischen Wnt-Kaskade gehören zur Frizzled-Familie. Es handelt sich dabei um Proteine mit sieben Transmembrandomänen. In dieser Arbeit wurde die Expression von Fzd5 untersucht (siehe Abbildung 3-10).

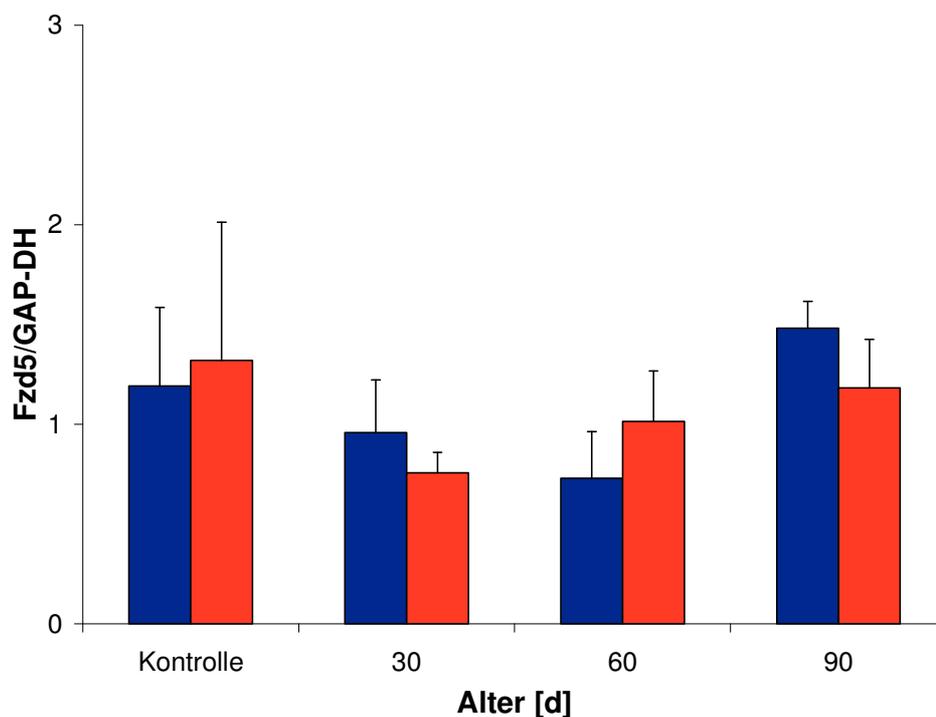


Abbildung 3-10: Expression von Fzd5 im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

Die Expression dieses Rezeptors zeigte keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Tumorentwicklung. Dies trifft auch auf die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit den Werten aus dem Magen Antrum von transgenen Tieren im Alter von 30, 60 und 90

Tagen zu. Die Teststärke lag hierbei jedoch bei 0,049 ($\alpha = 0,050$) und damit unter dem angestrebten Wert von 0,800. Dies bedeutet, dass es möglich ist, dass ein signifikanter Unterschied besteht, obwohl er in den erhobenen Daten nicht nachweisbar ist.

Lef1 ist ein Transkriptionsfaktor, der intrazellulär die Wirkung der Wnt-Kaskade vermittelt. Die Expression von Lef 1 zeigt im zeitlichen Zusammenhang mit der Tumorentwicklung jedoch keine signifikanten Veränderungen (siehe Abbildung 3-11).

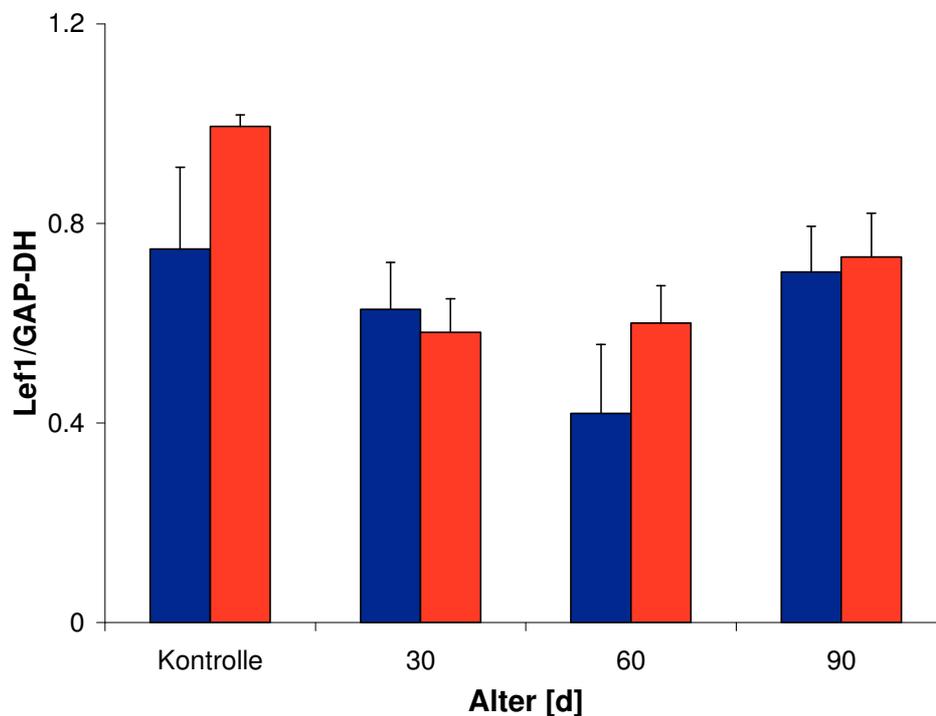


Abbildung 3-11 Expression von Lef1 im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

Mehrere wichtige Transkriptionsfaktoren für die Vermittlung des Wnt-Signals im Zellkern stammen aus der Tcf-Familie. Für die Analyse der Genexpression in dieser Arbeit wurde Tcf4 ausgewählt. Die Untersuchung dieses Gens ergab keine signifikante Zu- oder Abnahme der Expression von den Kontrollen zu den 30, 60 oder 90 Tage alten transgenen Tieren (siehe Abbildung 3-12, nächste Seite).

Dies trifft auch für Analyse der Daten aus dem Antrum bei 30, 60 und 90 Tage alten transgenen Tieren mit einfaktorieller Varianzanalyse zu, hier wies jedoch die Teststärke mit 0,406 ($\alpha = 0,050$) einen Wert auf, der unter dem anzustrebenden Wert von 0,800 lag. Dies bedeutet auch hier, dass es möglich ist, dass ein signifikanter Unterschied besteht, obwohl er anhand der erhobenen Daten nicht nachweisbar ist.

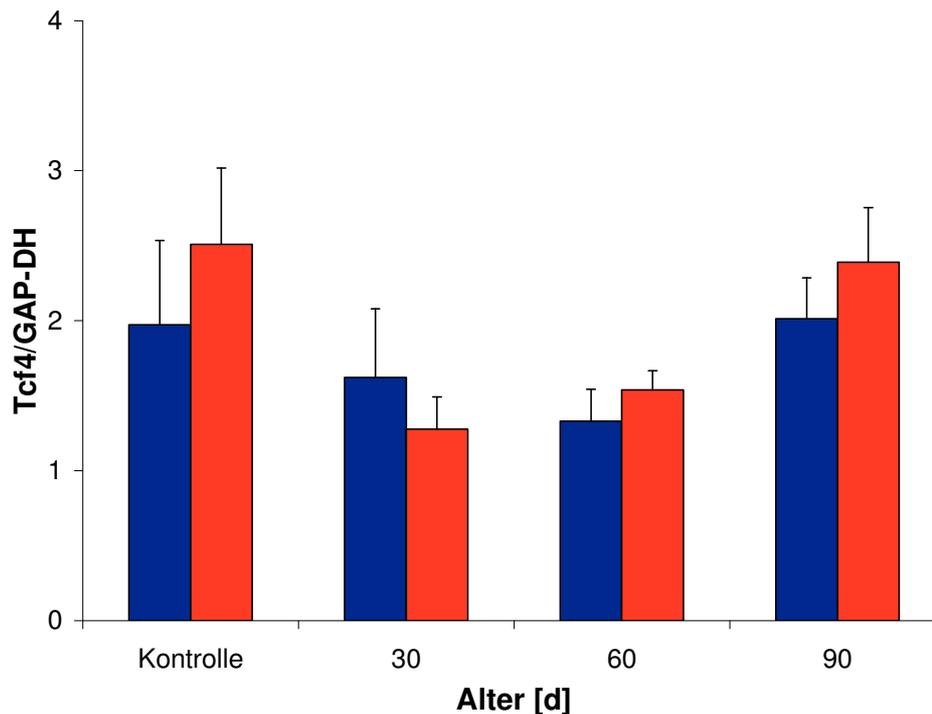


Abbildung 3-12: Expression von Tcf4 im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

Zusammengefasst zeigten die untersuchten Gene aus der Wnt-Signalkaskade somit keine signifikant veränderte Expression im Verlauf der Tumorentwicklung. Dies war auch bei den erhobenen Daten für Fzd5 und Tcf4 der Fall. Bei diesen Genen war jedoch die Teststärke unter 80 %. Dies bedeutet, dass ein möglicherweise bestehender Unterschied in der Expression aus den vorliegenden Daten nicht nachweisbar ist.

b) Hedgehog-Signalkaskade

Hedgehog-Signale sind mit die wichtigsten Determinanten der Embryonalentwicklung in verschiedenen Geweben^{94,95}. Aber auch später spielen sie bei Regenerationsvorgängen, zum Beispiel an Epithelien des Gastrointestinaltraktes, eine bedeutende Rolle^{95,133}. Veränderungen in der Hedgehog-Signalkaskade werden bei Tumoren in unterschiedlichen Organsystemen gefunden^{5,16}.

Das Hedgehog-Signal wird über sezernierte Proteine vermittelt, welche an membrangebundene Rezeptoren verschiedener Zellen binden. Diese steuern wiederum über intrazelluläre Transkriptionsfaktoren die Aktivierung nachgeschalteter Gene.

Ob Hedgehog-Gene als Mediatoren an der Induktion der Tumoren im vorliegenden Tiermodell in Frage kommen, wurde im Folgenden untersucht. Hierzu wurde die Expression verschiedener Liganden und eines Transkriptionsfaktors dieser Signalkaskade bestimmt.

Sonic hedgehog (Shh) ist darunter der am besten beschriebene Ligand der Hedgehog-Kaskade. Aus den durch RT-PCR gewonnenen Daten konnte für die Expression dieses Genes kein eindeutiger Trend im Zusammenhang mit der Tumorentwicklung identifiziert werden.

Eine vergleichsweise hohe mittlere Expression im Magen Corpus bei 30 Tage alten transgenen Tieren zeigte im Rangsummentest gegenüber den Kontrollen ($p = 0,286$) und den transgenen Tieren im Alter von 60 Tagen ($p = 0,111$) keinen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 3-13, nächste Seite).

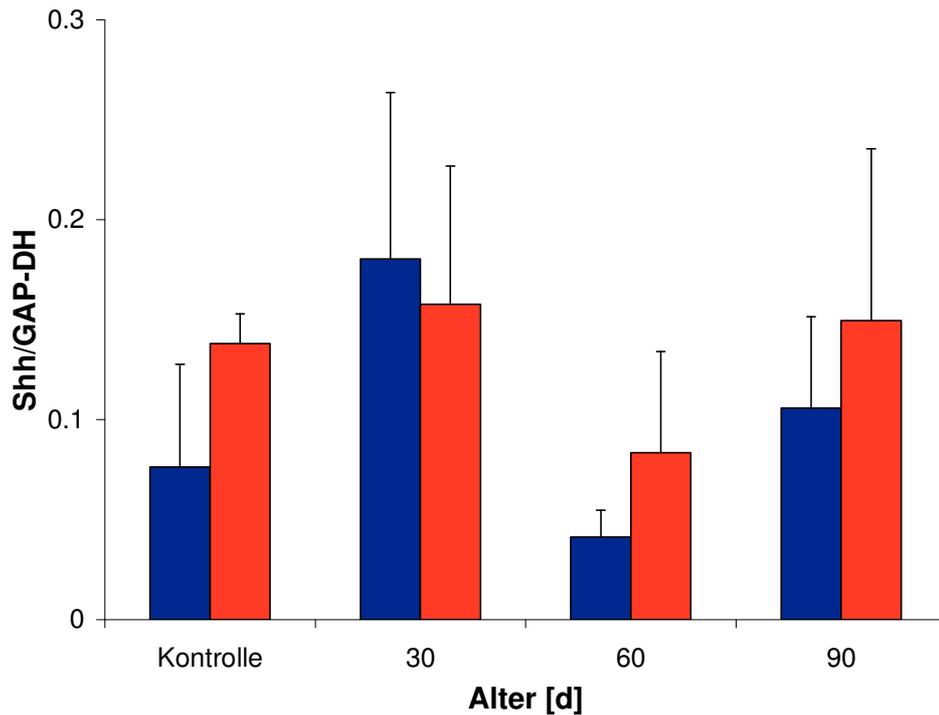


Abbildung 3-13: Expression von Shh im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

Ein weiterer Ligand des Hedgehog-Signalweges ist Desert hedgehog (Dhh). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dieses Gen wies bei 60 Tage alten Mäusen im Antrum einen hohen Expressionswert auf, der aber aus keinem erkennbaren Trend bei 30 oder bei 90 Tagen resultiert. Insgesamt waren zu diesem Zeitpunkt vier Werte erhoben worden. Bei zwei Gewebeproben waren mit 0,30 und 0,14 sehr hohe und bei zwei weiteren mit 0,02 und 0,01 sehr niedrige Werte nachgewiesen worden.

Da sich diese Entwicklung in der mittleren Genexpression bei Tieren im Alter von 90 Tagen nicht fortsetzt, wird davon ausgegangen, dass dieses Phänomen nicht mit der Tumorentwicklung im Zusammenhang steht. Möglicherweise liegt bei den beiden vergleichsweise hohen Werten ein technischer Fehler bei der Bestimmung der Expression von GAP-DH vor (siehe Abbildung 3-14, nächste Seite).

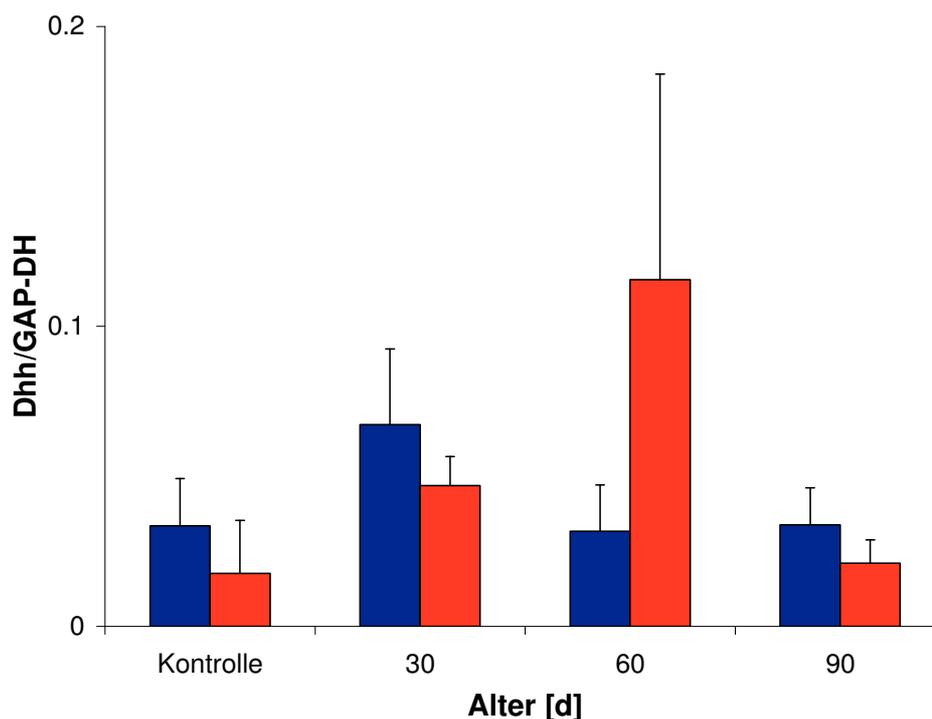


Abbildung 3-14: Expression von Dhh im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

Der dritte Ligand der Hedgehog-Kaskade, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, ist Indian Hedgehog (Ihh). Hier konnte bei Betrachtung der Expressionswerte ohne Berücksichtigung der Magenregion eine signifikante Abnahme der Expression im Verlauf der Tumorentwicklung ermittelt werden ($p = 0,009$; Varianzanalyse).

Im Rangsummentest zeigte sich dabei der Unterschied zwischen der mittleren Expression bei transgenen Tieren im Alter von 30 Tagen ($p = 0,013$) beziehungsweise denen im Alter von 60 Tagen ($p = 0,012$) auf der einen Seite und auf der anderen Seite der mittleren Expression von transgenen Tieren im Alter von 90 Tagen als signifikant.

Somit konnte hier gezeigt werden, dass die Expression von Ihh im Verlauf der Tumorentwicklung signifikant abnimmt (siehe Abbildung 3-15, nächste Seite).

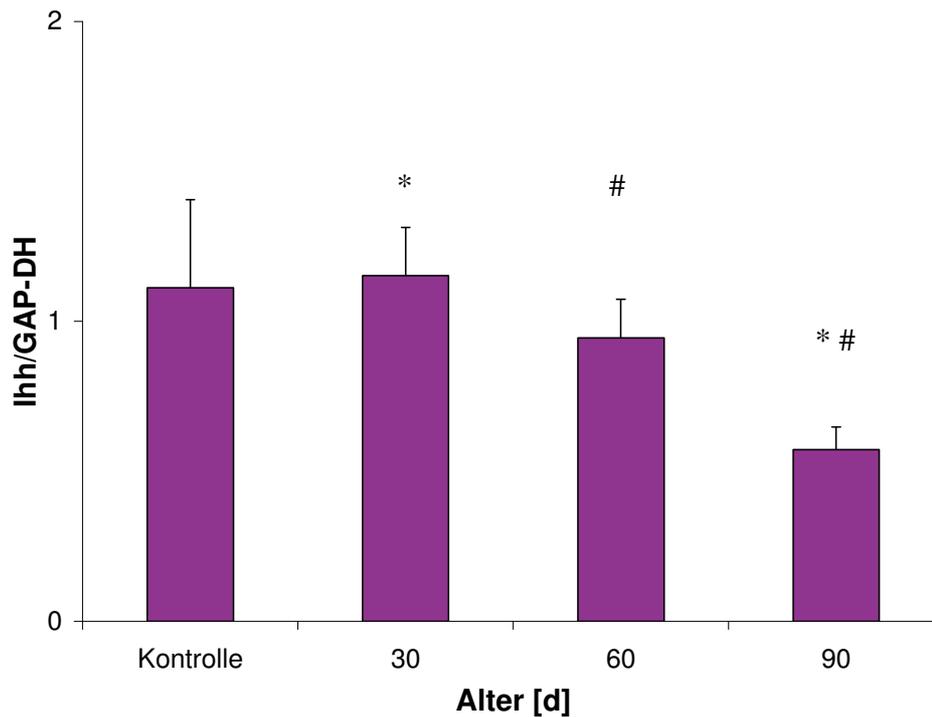


Abbildung 3-15: Expression von Ihh im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Werte aus Magen Corpus und Antrum violett; M + SEM;
*: $p = 0,013$, #: $p = 0,012$ (Rangsummentest).

Gli1 schließlich ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der Hedgehog-Signalkaskade. Bei Gli1 konnte aus den erhobenen Daten kein auffälliges Expressionsmuster erkannt werden (siehe Abbildung 3-16, nächste Seite).

Dies bestätigte sich auch in der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), sowohl für den Unterschied zwischen den Magenregionen ($p = 0,351$), als auch für Abweichungen zwischen den Altersstufen ($p = 0,795$), sowie wenn die Expressionswerte getrennt nach Magenregionen über die Zeit betrachtet wurden ($p = 0,456$).

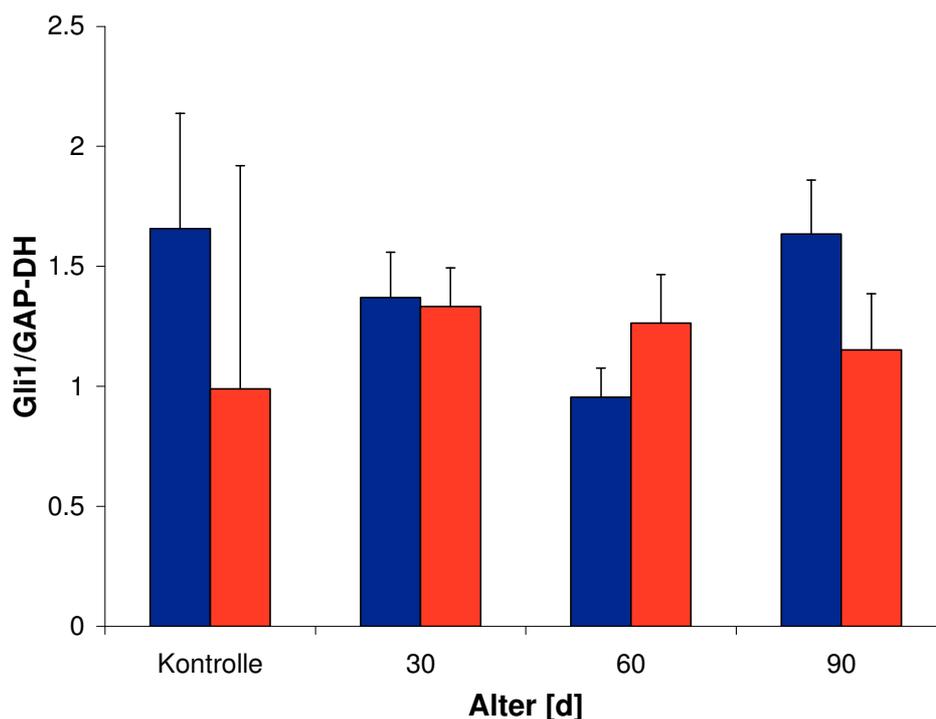


Abbildung 3-16: Expression von Gli1 im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

c) Notch-Signalkaskade

Notch-Signale leisten einen wichtigen Beitrag zur Differenzierung von Zellen im Gastrointestinaltrakt^{102,103}. Die Notch-Kaskade ist ein Weg der Signalübermittlung zwischen benachbarten Zellen, wobei sowohl Liganden als auch Rezeptoren jeweils Transmembranproteine vom Typ 1 sind (das bedeutet sie besitzen eine einzelne Transmembrandomäne). Es gibt einen kanonischen und einen nicht-kanonischen Weg der Signalübertragung durch die Notch-Kaskade. Abhängig vom Expressionsprofil der Notch-Liganden tragen diese zur Aufrechterhaltung von Stammzellmilieus im Magen-Darm-Trakt bei oder wirken als Signal zur Differenzierung⁶¹.

Ein fehlerhaftes Notch-Signal kann die Entstehung von Tumoren mit verursachen¹²³, darunter insbesondere im Magen und im Kolon⁶¹. Aus dieser Kaskade wurde die Expression des Liganden Dll1 und des Rezeptors Notch1 untersucht, da beide typischerweise im Magen-Darm-Trakt vorkommen⁶¹.

Ebenfalls untersucht wurden die durch die Notch-Kaskade nachgeschaltet regulierten Gene Hes1 und Math1. Sie werden im weiter unten folgenden Abschnitt g) Differenzierung besprochen.

Der Verlauf der durch RT-PCR bestimmten mittleren Expression des Liganden Dll1 über die Zeit zeigte keine Auffälligkeiten, die eine Beteiligung an der Tumorentwicklung im untersuchten Tiermodell vermuten lassen (siehe Abbildung 3-17).

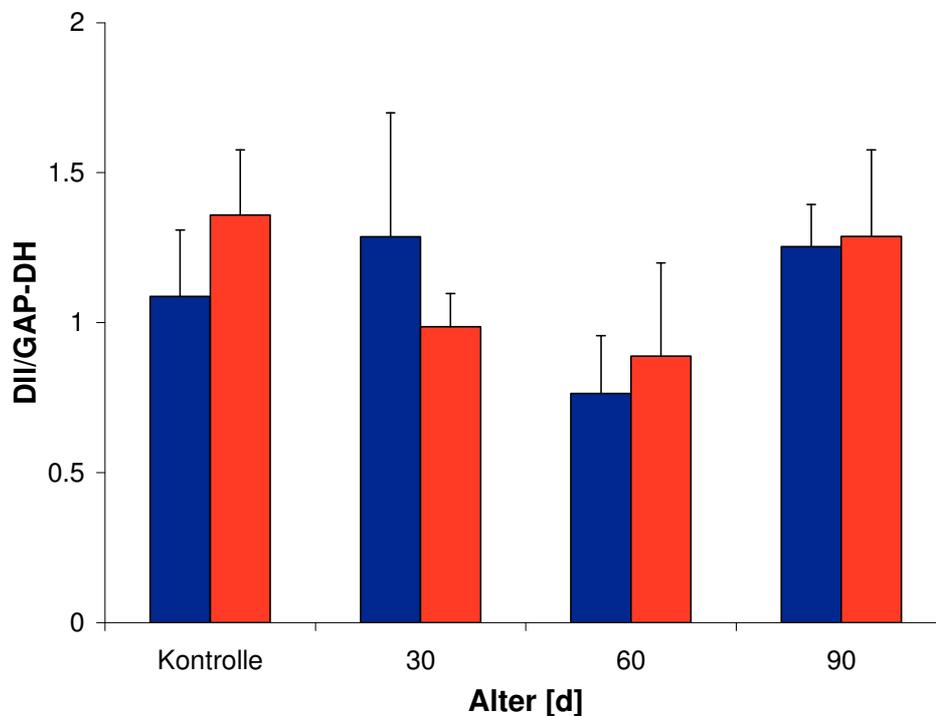


Abbildung 3-17: Expression von Dll1 im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

Die Expression des Rezeptors Notch1 hingegen nimmt im Antrum des Magens bei transgenen Tieren mit Fortschreiten der Tumorentwicklung ab (siehe Abbildung 3-18, nächste Seite). Dieser Verlauf zeigte sich im Rangsummentest, in dem die gemessenen

Werte aus dem Magen Antrum transgener Tiere im Alter von 30 Tagen mit denen von 90 Tage alten verglichen wurde, als signifikant ($p = 0,042$).

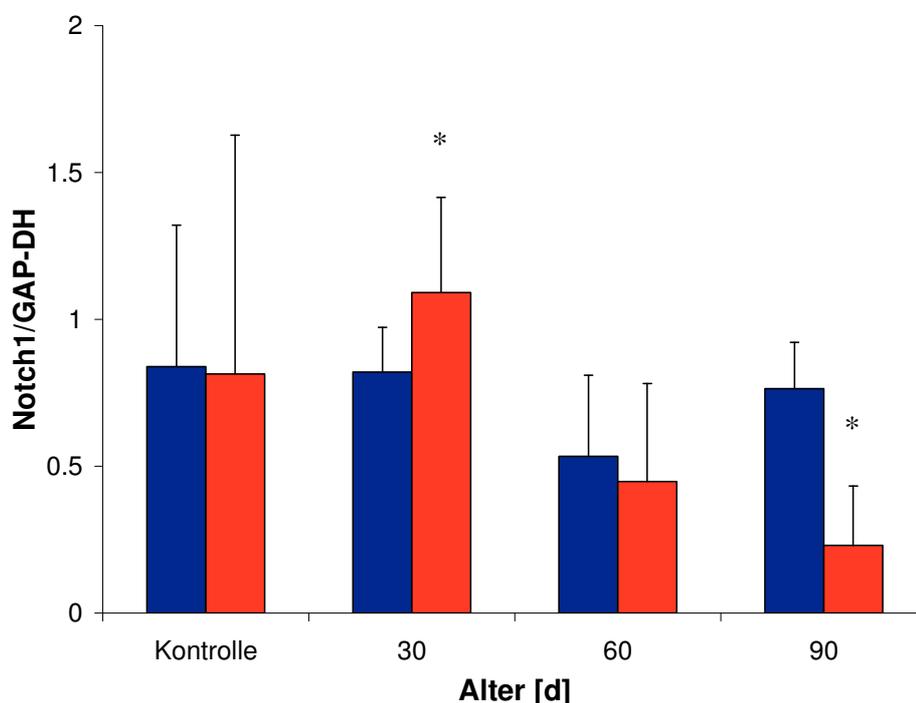


Abbildung 3-18: Expression von Notch1 im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau; Magen Antrum rot; M + SEM; *: $p = 0,042$ (Rangsummentest).

d) Egf-Rezeptor

Der Epidermal growth factor (Egf) ist der wichtigste Faktor für die Proliferation von Epithelzellen. Er ist auch in zahlreichen Tumorarten überexprimiert¹⁴⁴. Dadurch erschien es als möglich, dass der Tumor im hier untersuchten Tiermodell aufgrund der Stimulation bestimmter Zellen durch ein Egf-Signal entsteht. Dieses Signal wird über den Egf-Rezeptor (Egfr) vermittelt. Es handelt sich dabei um einen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, der zur ErbB-Familie von Rezeptoren gehört. Die Expression des Egf-Rezeptors wurde zu verschiedenen Zeitpunkten während der Entwicklung der Tumoren im Tiermodell bestimmt.

Es konnte dabei keine signifikante Veränderung der Expression im Verlauf der Tumorentwicklung nachgewiesen werden. Insbesondere zeigten sich im t-Test keine

signifikanten Unterschiede zwischen den Expressionswerten von 30 und 90 Tage alten transgenen Tieren ($p = 0,083$). Dabei war jedoch die Teststärke für $\alpha = 0,050$ mit 0,312 unter dem anzustrebenden Wert von 0,800. Dies bedeutet, dass ein möglicherweise existierender signifikanter Unterschied möglicherweise anhand der erhobenen Daten nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3-19).

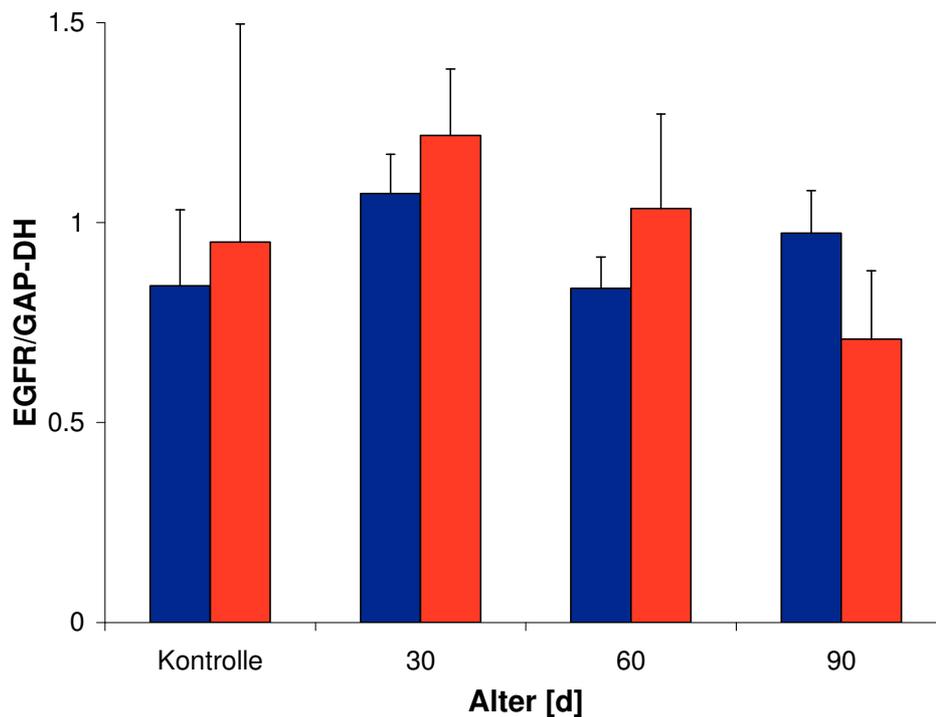


Abbildung 3-19: Expression des Egf-Rezeptors im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

e) Hgf-Rezeptor

Ein weiteres Mitglied der Rezeptoren-Familie ErbB ist der Hgf-Rezeptor (HgfR, Met). Dieser wird durch ein Gen kodiert, das allgemein als Proto-Onkogen angesehen wird, wobei es insbesondere invasives Wachstum begünstigt⁸⁴. HgfR spielt eine wichtige Rolle

in der Embryonalentwicklung und der Wundheilung. In Zellen gastrointestinaler Tumoren ist dieser Rezeptor oft überexprimiert^{96,117}.

Die Expression des Hgf-Rezeptors bewegt sich bei Kontrollen und transgenen Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils auf dem gleichen Niveau, somit ergibt sich hier kein Hinweis auf eine Beteiligung an der Tumorentwicklung in diesem Tiermodell (siehe Abbildung 3-20).

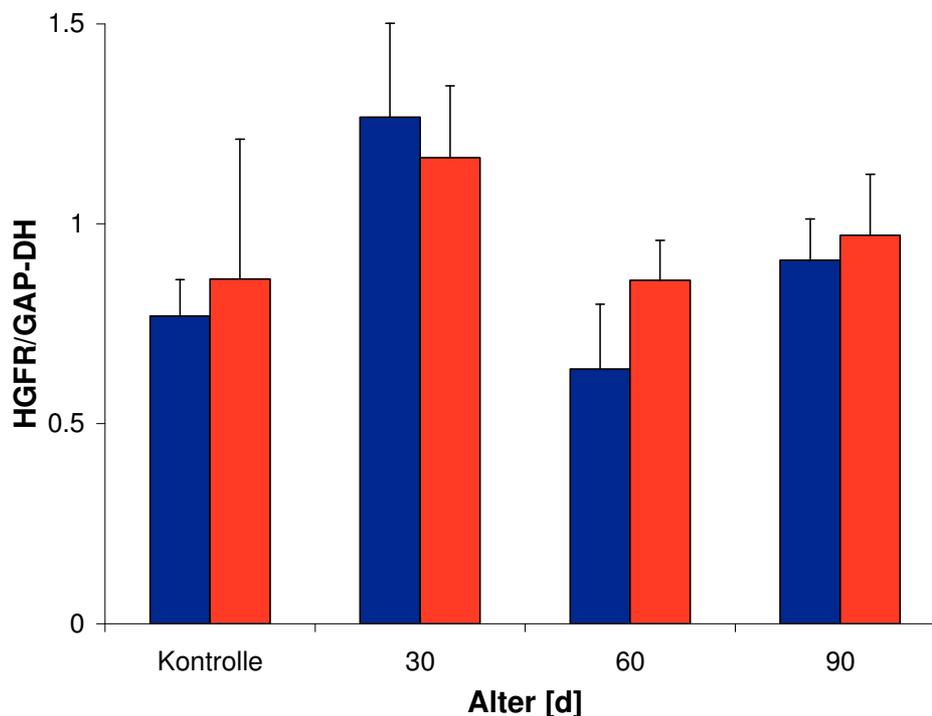


Abbildung 3-20: Expression des Hgf-Rezeptors im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

f) Pkd1

Die Proteinkinasen der Pkd-Familie sind Serin-/Threonin-Kinasen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der zytosolischen Abläufe verschiedener Signalkaskaden, welche die Proliferation und Differenzierung von Epithelien steuern^{136,150}.

Aus dieser Familie wurde die Proteinkinase D1 (Pkd1) ausgewählt. Ausgehend von den erhobenen Expressionswerten von Pkd1 lässt sich dabei keine Veränderung erkennen, die mit der Tumorentwicklung einhergeht (siehe Abbildung 3-21).

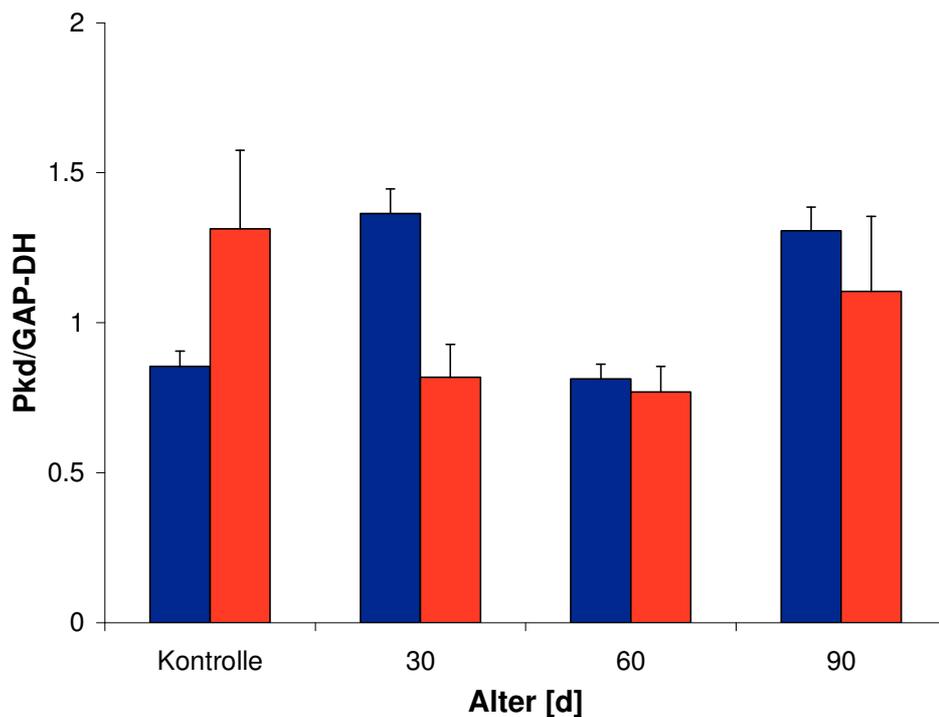


Abbildung 3-21: Expression von Pkd1 im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

g) Differenzierung

Grundsätzlich könnten sich die Tumorzellen aus zum Beispiel epithelialen Stammzellen oder differenzierten Zellen ableiten. In verschiedenen anderen Tiermodellen mit SV 40 large T-Antigen – induzierten Tumoren wurde ein neuroendokriner Phänotyp der Tumorzellen beschrieben^{18,53,82,97}. Um die Abstammung von differenzierten Zellen nachweisen zu können, wurde daher in dieser Arbeit auch die Expression verschiedener Differenzierungsfaktoren untersucht.

Die Transkriptionsfaktoren Hes1 und Math1 werden durch die Notch-Kaskade reguliert⁵⁹. Sie steuern im oberen Gastrointestinaltrakt die Differenzierung von Progenitorzellen zu sekretorischen Zellen¹⁰².

Die Expression von Hes1 zeigte keinen auffälligen Verlauf (siehe Abbildung 3-22). Die Abnahme der Genexpression bei transgenen Mäuse gegenüber den Kontrollen zeigte weder im Fall der 30 Tage alten ($p = 0,133$) noch der 90 Tage alten Tiere ($p = 0,222$) im Rangsummentest statistische Signifikanz.

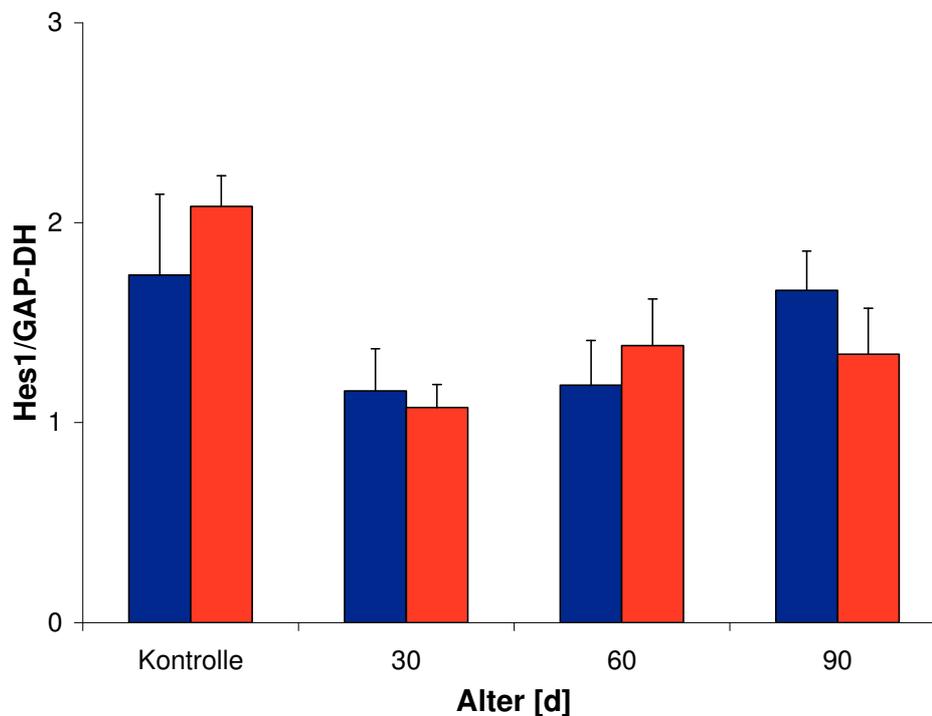


Abbildung 3-22: Expression von Hes 1 im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

Der Verlauf der Expressionswerte von Math1 zeigte in der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) weder für den Faktor Kontrollen beziehungsweise Alter ($p = 0,838$) noch für die Region des Magens ($p = 0,148$) signifikante Unterschiede. Dies ($p = 0,075$) ergab auch der gezielte Vergleich der Expressionswerte aus dem Antrum

des Magens der Kontrollen mit denen der 90 Tage alten Tiere im Rangsummentest (siehe Abbildung 3-23).

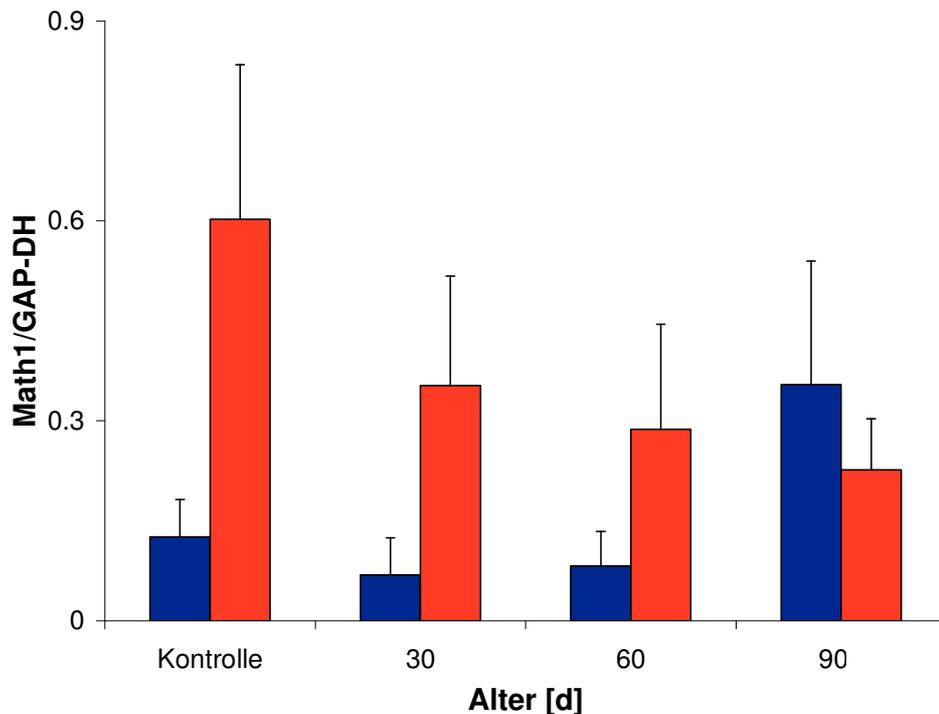


Abbildung 3-23: Expression von Math1 im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau, Magen Antrum rot; M + SEM.

Pdx1 ist als Transkriptionsfaktor an der Differenzierung endokriner Zellen in Magen, Duodenum und Pankreas beteiligt^{20,35}. Hier ist besonders im Antrum ein Abfall der Expression von den Kontrollen und den transgenen Tieren im Alter von 30 und 60 Tagen hin zu den Tieren im Alter von 90 Tagen (mit dem fortgeschrittensten Tumorstadium) zu verzeichnen (siehe Abbildung 3-24, nächste Seite).

Dieser Verlauf stellte sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) der Werte aus dem Magen Antrum als signifikant dar ($p = 0,028$). Im Rangsummentest zeigten darüber hinaus die Werte der Kontrollen und die der 90 Tage alten transgenen Tiere einen signifikanten Unterschied ($p = 0,028$).

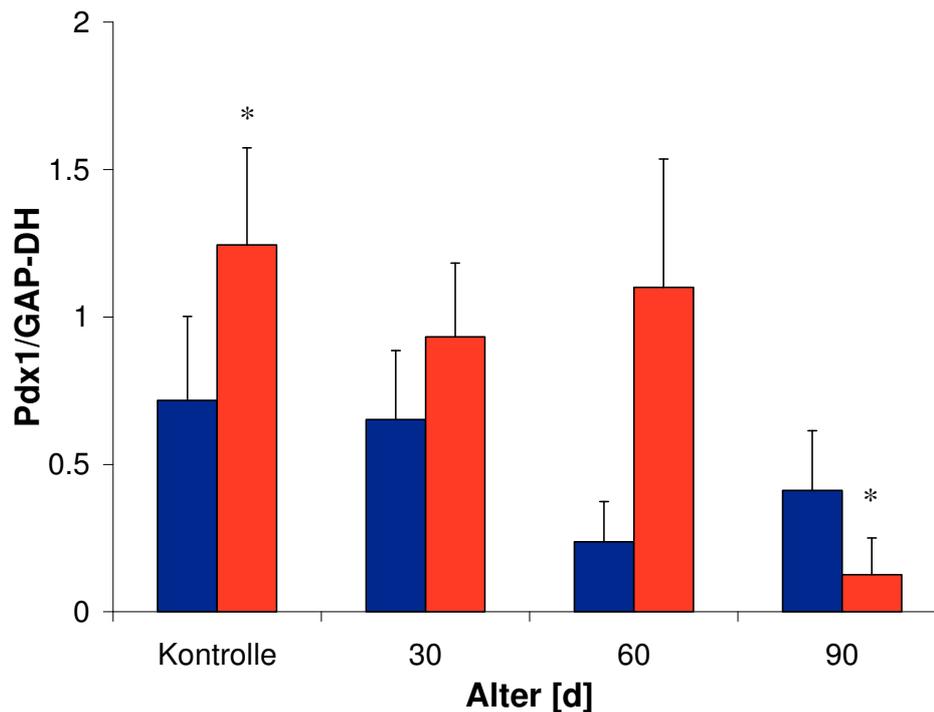


Abbildung 3-24: Expression von Pdx1 im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: Magen Corpus blau; Magen Antrum rot; M + SEM; *: $p = 0,028$ (Rangsummentest).

h) Gastrin und Cck2r

Das Antrum des Magens ist eine Region, die durch die Sekretion von Gastrin und Somatostatin auch endokrine Funktion besitzt. Dies führte zur Überlegung, ob ein lokal wirksames Hormon im hier untersuchten Tiermodell eine Rolle bei der Entstehung des Tumors spielt.

Besonders Gastrin erregte in diesem Zusammenhang die Aufmerksamkeit, da dieser Faktor auch die Proliferation von Zellen stimuliert. Zudem ist bekannt, dass Gastrin bei der Entstehung von Tumorerkrankungen, insbesondere des kolorektalen Karzinoms, mitwirkt^{73,108,143}. Es zeigte sich in der Folge, dass die mittlere Expression von Gastrin im Antrum des Magens bei transgenen Mäusen deutlich geringer ist als bei den Kontrollen. Im Bereich des Corpus war die Expression weitgehend unverändert (siehe Abbildung 3-25, nächste Seite).

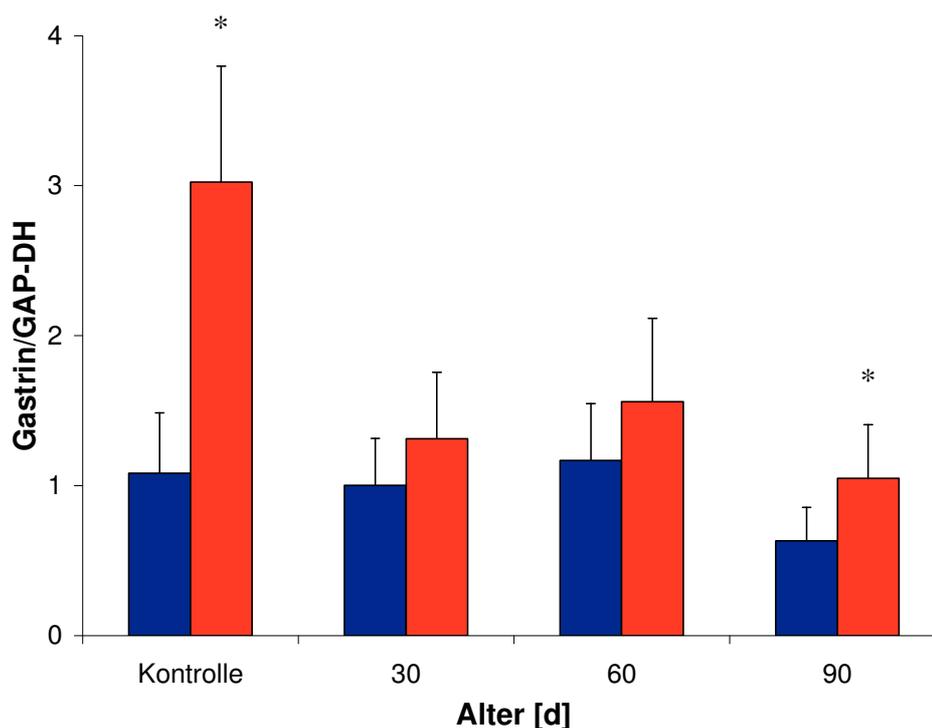


Abbildung 3-25: Expression von Gastrin im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

*Legende: Magen Corpus blau; Magen Antrum rot; M + SEM; *: $p = 0,039$ (t-Test).*

Dieser Verlauf zeigte in der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) Signifikanz sowohl im Hinblick auf die mittlere Expression in den Magenregionen, also Magen Corpus gegenüber Magen Antrum ($p = 0,015$), als auch im Verlauf der Tumorentwicklung, also Kontrolle gegenüber 30, 60 und 90 Tage alte Tiere ($p = 0,049$). Im t-Test stellte sich dabei der Unterschied in der mittleren Expression zwischen den Kontrollen und den 90 Tage alten transgenen Tieren als signifikant dar ($p = 0,039$).

Somit kann festgestellt werden, dass die Expression von Gastrin im untersuchten Gewebe im Verlauf der Tumorentwicklung abnimmt.

Bei veränderter Expression des Hormons Gastrin lag es nahe, auch die Expression des Gastrin-Rezeptors Cck2r (Cholezystokinin 2-Rezeptor) zu untersuchen. Dieser Rezeptor wird zum Beispiel von Belegzellen exprimiert. Eine Zunahme der Expression des Cck2-Rezeptors könnte auf eine Cck2r-exprimierende Zelle als Tumorzelle schließen lassen.

In der zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) stellte sich dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten aus den Magenregionen Corpus und Antrum dar ($p = 0,918$). Bei Betrachtung aller Werte zusammen, also ohne Berücksichtigung der

Magenregion, konnten jedoch ein statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p = 0,028$).

Es fand sich bei transgenen Tiere eine verstärkte mittlere Expression gegenüber den Kontrollen. Bei letzteren wurde ein mittlerer Wert von 0,41 bestimmt. Die gemessene mittlere Expression stieg mit zunehmender Tumorentwicklung an und erreichte ihren maximalen Wert bei den ältesten transgenen Tieren (90 Tage) mit 1,04 (siehe Abbildung 3-26).

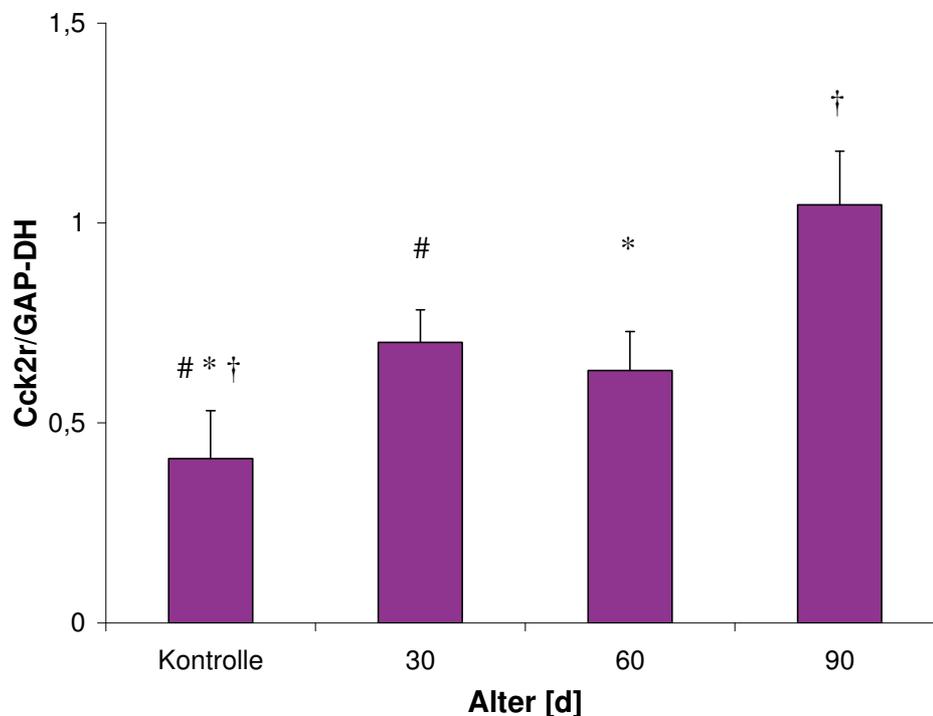


Abbildung 3-26: Expression des Cck2-Rezeptors im Verlauf der Tumorentwicklung (PCR).

Legende: *Werte aus Magen Corpus und Antrum violett; M + SEM;*
#: $p = 0,041$, *: $p < 0,001$, †: $p = 0,005$ (Rangsummentest).

Im Rangsummentest zeigten die mittleren Expressionswerte der transgenen Tiere aller Altersstufen jeweils einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollen, dies bei 30 Tage alten Tieren mit $p = 0,041$, bei 60 Tage alten Tieren mit $p < 0,001$ und bei 90 Tage alten Tieren mit $p = 0,005$.

Es findet sich also eine signifikant veränderte Expression sowohl von Gastrin als auch des Gastrin-Rezeptors Cck2r. Diese Veränderungen korrelieren indirekt (Gastrin) oder direkt (Cck2r) mit der Tumorentwicklung. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Vermutung formuliert, dass die Tumorzellen Cck2r-positiv sind.

Insgesamt musste jedoch an diesem Punkt die in einer früheren Studie erfolgte Charakterisierung des Tumors als Adenokarzinom⁹⁰ in Frage gestellt werden, da bei der Mehrzahl der für diese Tumorart typischen Faktoren und Signalkaskaden die hier untersucht worden waren keine Veränderung während der Tumorentwicklung feststellbar war.

Eigentlich wäre es nun nahe liegend gewesen, wie bisher auf der Grundlage von Überlegungen und Literaturrecherche weitere Gene auszuwählen und deren Expression im Verlauf mit RT-PCR zu untersuchen. Dies ist im Sinne hypothesengetriebener Wissenschaft ideal. In diesem Stadium der Arbeit stand jedoch mit der Mikroarray-Technologie eine Methode zur Verfügung, die eine quantitative Bestimmung der Expression nahezu aller bekannten Gene ermöglichte. Da sich somit ausgehend von den bisherigen Ergebnissen zahlreiche weitere Möglichkeiten zur Bildung von Hypothesen und deren Überprüfung ergaben, wurde in der Folge diese weitere Methode zur Anwendung gebracht.

3.4 Gesamtexpressionsanalyse

Um die Genexpression insgesamt darstellen zu können, wurde ergänzend zu den bisher erhobenen Daten mit einer Mikroarray-Analyse das gesamte Transkriptom (mRNA-Ebene) von Gewebe aus dem Antrum des Magens transgener Tiere quantitativ untersucht. Dieses Vorgehen mit offener Fragestellung erlaubte einen Vergleich mit den Ergebnissen der Voruntersuchungen mit RT-PCR, aber auch weitergehende Auswertungen und Darstellungen der erhaltenen Daten.

a) SV 40 large T-Antigen

Der verwendete Mikroarraychip „Sentrix Mouse-6 Expression Beadchip“ enthielt neben nahezu allen bekannten murinen Genen auch Tags, die Virusgene repräsentieren (darunter Gene des Friend murine leukemia virus, Murine adenovirus A, Murine sarcoma virus, aber auch des Simian Virus 40).

Somit lagen nach der Mikroarray-Analyse auch Daten zur Expression des SV 40 large T-Antigens vor. Hier bestätigten sich die zuvor gewonnenen Erkenntnisse: Die Expression des SV 40 large T-Antigens nimmt im Verlauf der Tumorentwicklung zu. Bei den Kontrollen kann erwartungsgemäß keine Expression nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-27).

Dieser Verlauf zeigte sich auch in der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) als signifikant ($p = 0,016$). Durch multiple Testungen nach Holm-Sidak konnte dabei der Unterschied zwischen der mittleren Expression der Kontrollen gegenüber den 90 Tage alten transgenen Tieren als signifikant identifiziert werden ($p = 0,004$). Darüber hinaus stellte sich auch der Unterschied zwischen der mittleren Expression bei 30 Tage alten und 90 Tage alten transgenen Tieren im t-Test als signifikant dar ($p = 0,015$).

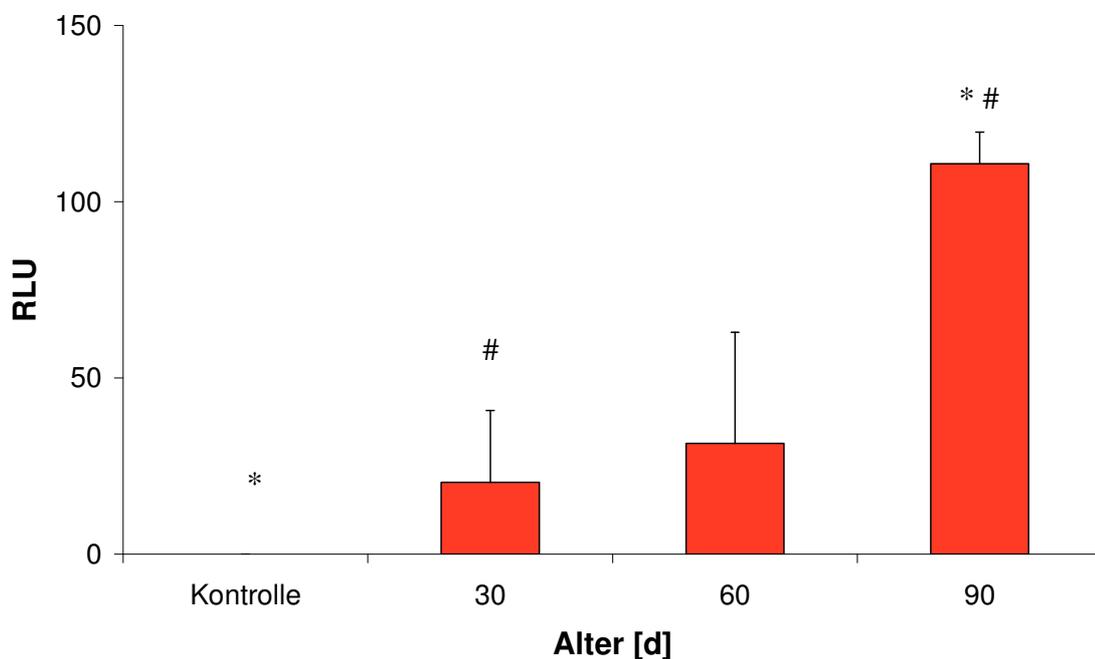


Abbildung 3-27: Expression des SV 40 large T-Antigens im Verlauf der Tumorentwicklung (Magen Antrum, Mikroarray-Analyse).

RLU: relative light units, relative Lichteinheiten; M + SEM;

**: $p = 0,004$ (Holm-Sidak), #: $p = 0,015$ (t-Test).*

b) Gastrin und Cck2r

Auch die Expression von Gastrin wurde mit der Mikroarray-Analyse erneut überprüft. Bei der Expression von Gastrin ist der Trend erkennbar, dass sie mit dem Fortschreiten des Tumors abnimmt. Dies ist analog zu den mit RT-PCR erhobenen Daten und stellt möglicherweise eine Verdrängung von Gastrin-produzierenden Zellen durch die Proliferation von Tumorzellen vor (siehe Abbildung 3-28).

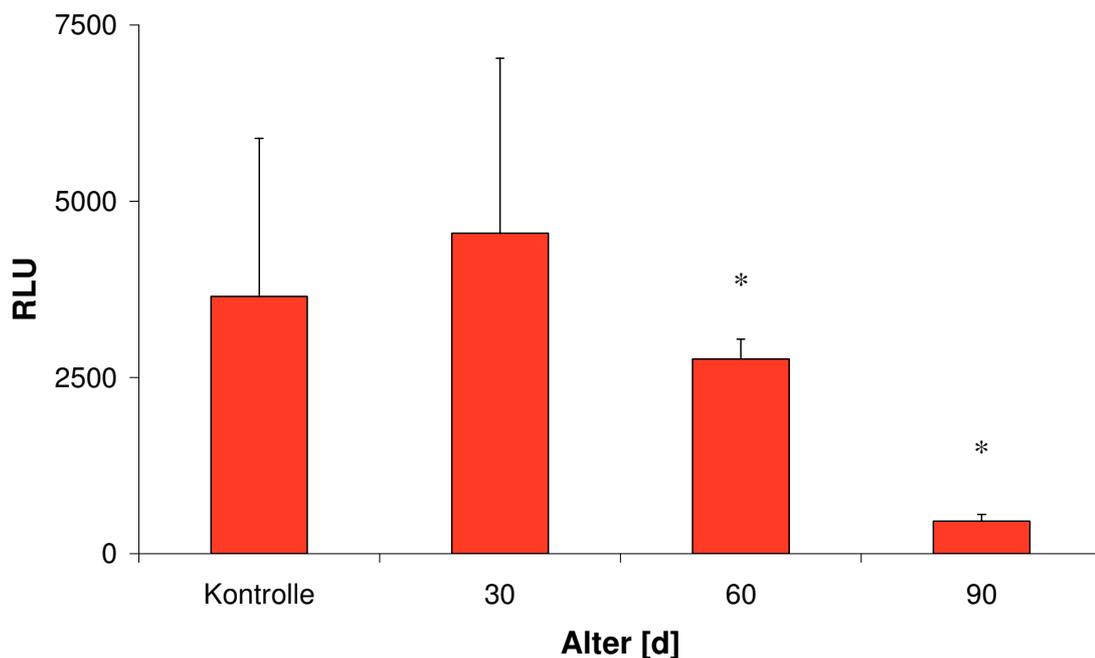


Abbildung 3-28: Expression von Gastrin im Verlauf der Tumorentwicklung (Magen Antrum, Mikroarray-Analyse).

*RLU: relative light units, relative Lichteinheiten; M + SEM; *: $p = 0,001$ (t-Test).*

Der Verlauf der Genexpression von Gastrin weist in der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) keine Signifikanz auf ($p = 0,406$), jedoch liegt die Teststärke (Power) mit 0,061 unter dem angestrebten Wert von 0,8. Dies bedeutet, dass hier ein signifikanter Unterschied bestehen könnte, der aus den vorliegenden Daten jedoch statistisch nicht nachgewiesen werden konnte. Berücksichtigt werden muss dabei aber, dass sich unter den Gewebeprobe der Kontrollen auch solche aus dem Corpus des Magens befanden. Vermutlich hat dies den Genexpressionswert für Gastrin hier hin zu einer geringeren Expression verfälscht. Im t-Test stellte sich der Unterschied zwischen der mittleren Ex-

pression der 60 Tage und der 90 Tage alten transgenen Tieren als signifikant heraus ($p = 0,001$), was eine Abnahme von Gastrin im Zuge der Tumorentwicklung belegt.

Auch im Fall des Cck2-Rezeptors konnten die Ergebnisse der Vorversuche bestätigt werden. Die Expression nimmt bei den transgenen Tieren gegenüber den Kontrollen zu und weist die höchste Expression bei den transgenen Mäusen im Alter von 90 oder mehr Tagen auf (siehe Abbildung 3-29).

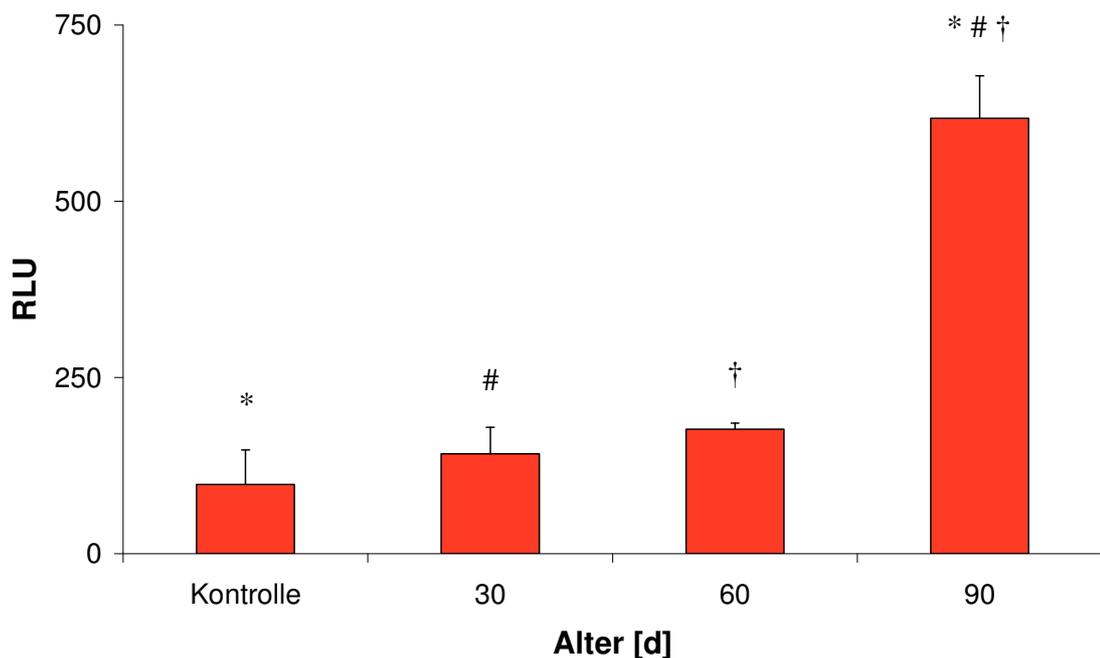


Abbildung 3-29: Expression des Cck2-Rezeptors im Verlauf der Tumorentwicklung (Magen Antrum, Mikroarray-Analyse).

*RLU: relative light units, relative Lichteinheiten; M + SEM; *, #, †: $p < 0,001$ (Holm-Sidak).*

Dieser Verlauf stellt sich auch in der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) als signifikant dar ($p < 0,001$). Mit multipler Testung nach der Methode von Holm-Sidak konnte zudem ein signifikanter Unterschied jeweils zwischen den Expressionswerten bei 90 Tage alten Tieren einerseits sowie den Kontrollen ($p < 0,001$), den 30 Tage alten ($p < 0,001$) und den 60 Tage alten Tieren ($p < 0,001$) auf der anderen Seite nachgewiesen werden.

Hiermit wurde daher die Annahme, dass die Tumorzellen im vorliegenden Modell Cck2r-positiv sind, als bestätigt angesehen. Als weitere Hypothese ergab sich die Vermutung, dass Gastrin eine Rolle bei der Initiierung der Tumorentstehung spielt. Zellen

mit dem Cck2-Rezeptor können im Antrum durch das dort sezernierte Gastrin stimuliert werden. Durch Expression des SV 40 large T-Antigens werden diese Zellen in der Folge zu Tumorzellen transformiert. Daraufhin vermehren sich die Zellen durch Proliferation und verdrängen andere Zellen in dieser Region, auch die zuvor stark vertretenen Gastrin-produzierenden Zellen.

Da die Mikroarray-Analyse mit einer Untersuchung bereits die Expression aller bekannten transkribierten Gene erfasst, wurden im Folgenden weitere Gene von gastrointestinalen Hormonen betrachtet, die im funktionellen Zusammenhang mit Gastrin und dem Cck2-Rezeptor stehen.

Dabei zeigten das Gastrin releasing peptide (Grp, siehe Abbildung 3-30) und Cholecystokinin (Cck, siehe Abbildung 3-31, nächste Seite) ein Expressionsmuster, das der Tumorentwicklung folgt. Beide Gene sind bei den Kontrollen und in frühen Tumorstadien unter der Nachweisgrenze und weisen bei den Mäusen mit einem Alter von 90 oder mehr Tagen maximale Expression auf.

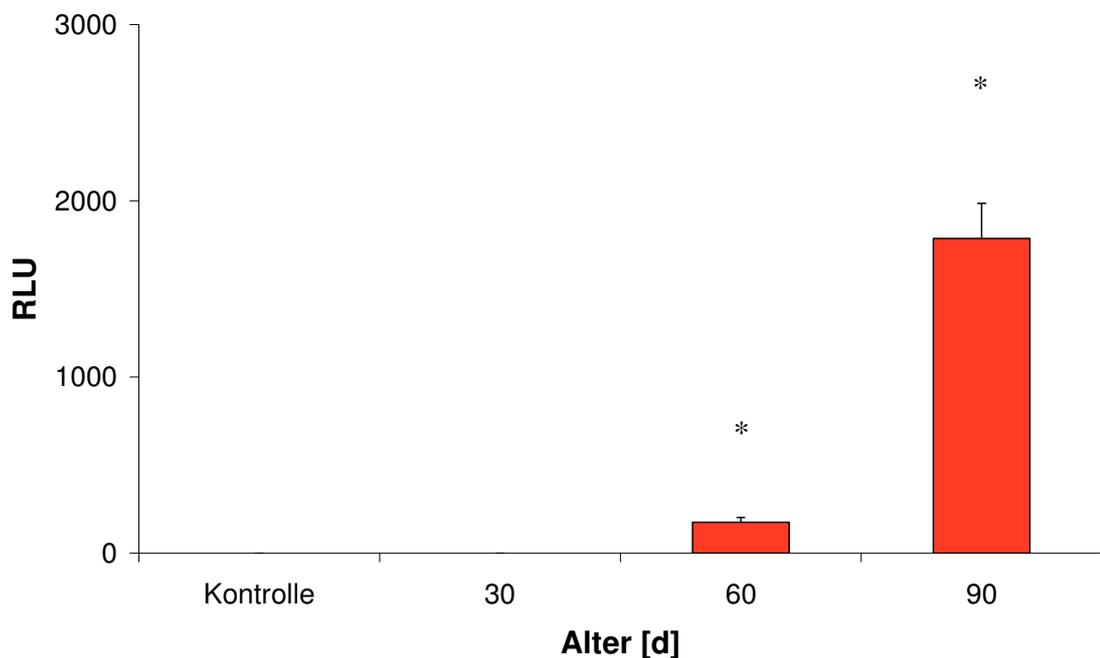


Abbildung 3-30: Expression von Grp im Verlauf der Tumorentwicklung (Magen Antrum, Mikroarray-Analyse).

*RLU: relative light units, relative Lichteinheiten; M + SEM; *: $p = 0,001$ (t-Test).*

Die Signifikanz des Verlaufs der mittleren Expression von Grp zeigte sich in der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf der Grundlage von Rangsummen nach Kruskal-Wallis ($p = 0,014$). Im t-Test wies auch die mittlere Expression bei 60 und 90 Tage alten transgenen Tieren einen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,001$).

Auch Cck wies in der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf der Grundlage von Rangsummen nach Kruskal-Wallis einen signifikanten Verlauf auf ($p = 0,024$). Hier zeigte sich ebenso im t-Test ein signifikanter Anstieg der mittleren Expression von 60 zu 90 Tage alten transgenen Tieren ($p = 0,004$).

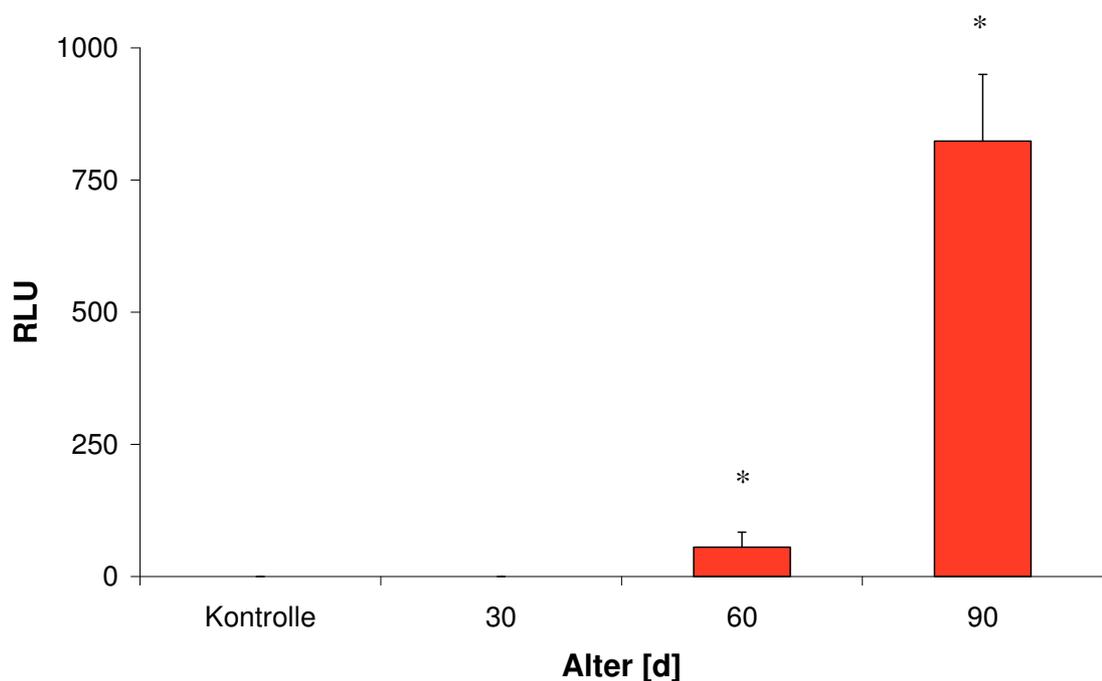


Abbildung 3-31: Expression von Cck im Verlauf der Tumorentwicklung (Magen Antrum, Mikroarray-Analyse).

*RLU: relative light units, relative Lichteinheiten; M + SEM; *: $p = 0,004$ (t-Test).*

Für die weiteren zuvor mit RT-PCR untersuchten Gene konnten in der Mikroarray-Analyse keine auffälligen Verläufe festgestellt werden. Teilweise waren die Expressionen dieser Gene allerdings auch unter der Nachweisgrenze.

Hierbei muss berücksichtigt werden, dass eine Untersuchung mit RT-PCR eine Amplifikation beinhaltet – bei 35 PCR-Zyklen wird das untersuchte cDNA-Material um das 2^{35} -fache vervielfältigt. Es ist daher möglich, dass Veränderungen der Expression, die

mit RT-PCR dargestellt werden können, zu gering sind, um mit der Microarray-Analyse (die ohne Amplifikation stattfindet) nachvollzogen werden zu können.

Über die im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Untersuchungen zur Expression einzelner Gene hinaus ermöglichten die Daten der Mikroarray-Analyse nun weitere Überlegungen. Zunächst wurde von den Möglichkeiten Gebrauch gemacht, große Datenmengen softwaregestützt als Genexpressionsprofil darzustellen.

c) Genexpressionsprofile

Im Folgenden werden Genexpressionsprofile dargestellt. Unter dem Begriff eines Genexpressionsprofils sollen in dieser Arbeit verschiedene Darstellungen der mit den Mikroarray-Analysen erhobenen Genexpressionswerte zum Zweck der Visualisierung verstanden werden. Es liegt somit nicht mehr eine Darstellung einzelner Genexpressionswerte vor, sondern ein Profil im Sinn eines Überblicks über einen großen Datenbestand.

Daraus ergibt sich der Nutzen solcher Darstellungen: es kann ein Überblick über Trends und Entwicklungen gewonnen werden. Ebenso sind Cluster-Analysen möglich. Auf dieser Grundlage können weitere Überlegungen angestellt werden, die sich auf die gesamte Genexpression in den untersuchten Geweben im Vergleich beziehen. Weiterführende Betrachtungen zu den erhobenen Datenmengen sollen sich am Ende dieses Abschnitts mit funktionellen Zusammenhängen beschäftigen.

In die folgenden Betrachtungen der Genexpressionsprofile konnten auch Daten eingeschlossen werden, die aus Mikroarray-Analysen einer Zellkultur der Tumorzellen des Tiermodells (GC-Zellen) stammen. Dies ermöglichte einen zusätzlichen Vergleich mit den verschiedenen Tumorstadien.

Streudiagramm

Um einen schnellen Überblick zu erhalten, ob sich überhaupt ein Unterschied in einer größeren Anzahl von Genexpressionswerten zwischen verschiedenen Gewebeproben nachweisen lässt, ist zunächst ein Streudiagramm geeignet.

In der folgenden Darstellung werden die gemessenen Expressionswerte als Koordinaten in einem 2-dimensionalen Koordinatensystem behandelt (siehe Abbildung 3-32, nächste Seite).

Ein Punkt in der Abbildung stellt ein Gen dar. Die Einheit der Abszisse ist die relative Expression im Durchschnitt der Gewebeprobe der Kontrollen. Auf der Ordinate wird die relative Expression im Durchschnitt der Gewebeprobe von Mäusen im Alter von 90 Tagen angetragen.

Liegt ein Punkt auf der Diagonalen, so bedeutet dies gleiche Expression dieses Genes bei den Kontrolle und den transgenen Tieren im Alter von 90 Tagen. Da in diese Darstellung nur Gene übernommen wurden, die zumindest ein minimale Veränderung zwischen den Kontrollen und 90 Tage alten Mäusen aufweisen, befinden sich wenige Punkte in der Nähe und keiner auf der Diagonalen.

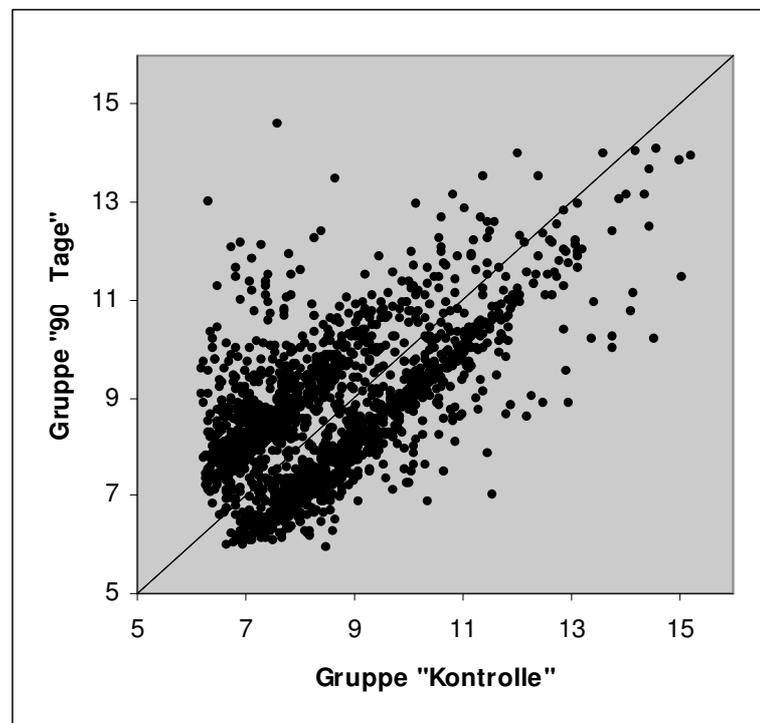


Abbildung 3-32: Darstellung der Expression einer Auswahl deregulierter Gene als Streudiagramm.

Abszisse: mittlerer Expressionswert bei Kontrollen

Ordinate: mittlerer Expressionswert bei 90 Tage alten transgenen Tieren

Die Abbildung zeigt Punkte zu beiden Seiten in unterschiedlicher Entfernung zur Diagonalen. Diese stellen Gene dar, deren Expression sich zwischen den Kontrollen und den Mäusen im Alter von 90 Tagen leicht bis sehr stark unterscheidet.

Aus dieser Darstellung lässt sich der Schluss ableiten, dass sich eine große Anzahl von Genen in ihrer Expression zwischen den Kontrollen und den 90 Tage alten transgenen Mäusen unterscheidet, weil sie im Vergleich zwischen Kontrollen und 90 Tage alten transgenen Tieren hoch- oder herunterreguliert sind. Es handelt sich bei hochregulierten Genen in der Regel um solche, die im Tumorgewebe aktiv sind, analog dazu stellen die herunterregulierten Gene die im Tumor verloren gegangenen Funktionen der Zellen im betrachteten Organ dar.

Eine Liste der deregulierten Gene findet sich in Anhang 2: ergänzende Daten, Tabelle A - 22. Besonders hinzuweisen ist dabei auf die stark erhöhte Expression von Genen wie Secretin (Sct), Secretogranin II (Sct2) Glucagon (Gcg) und Chromogranin A (Cga). Diese und zahlreiche weitere deregulierte Gene werden charakteristischerweise von neuroendokrinen Zellen exprimiert.

Eine weitere Darstellung, die prinzipiell auch einen Überblick über zahlreiche Expressionswerte ermöglicht, ist eine Multidimensionale Skalierung.

Multidimensionale Skalierung

Zur Darstellung von globalen Ähnlichkeiten und Unterschieden in der Genexpression im Verlauf der Tumorentwicklung und im Vergleich zu einer Zellkultur aus dem Tumor wurde eine Multidimensionale Skalierung durchgeführt. Grundlage hierzu waren die in den Mikroarray-Analysen erhobenen Genexpressionswerte.

Durch eine Multidimensionale Skalierung werden die in einer Mikroarray-Analyse erhobenen Daten rechnerisch soweit reduziert, dass sie als ein Punkt in einem dreidimensionalen Raum dargestellt werden können. Führt man die Multidimensionale Skalierung mit den Daten mehrerer Mikroarray-Analysen durch, so ergeben sich in diesem Raum ebenso viele Punkte mit definierten Abständen. Das Maß an Übereinstimmung der Daten zweier Analysen drückt sich durch den euklidischen Abstand zwischen deren Punkten aus. Da im dreidimensionalen Raum der euklidische Abstand dem anschaulichen Abstand entspricht, können somit leicht aus der Anschauung Schlüsse über Ähnlichkeiten der Genexpression gezogen werden.

Dieses statistische Verfahren wurde hier angewendet wie von Khan et. al.⁶⁵ und Hedenfalk et. al.⁴⁹ beschrieben. Es dient so zur Illustration unterschiedlicher Genexpressionsprofile in verschiedenen Klassen von Geweben (siehe Abbildung 3-33, nächste Seite).

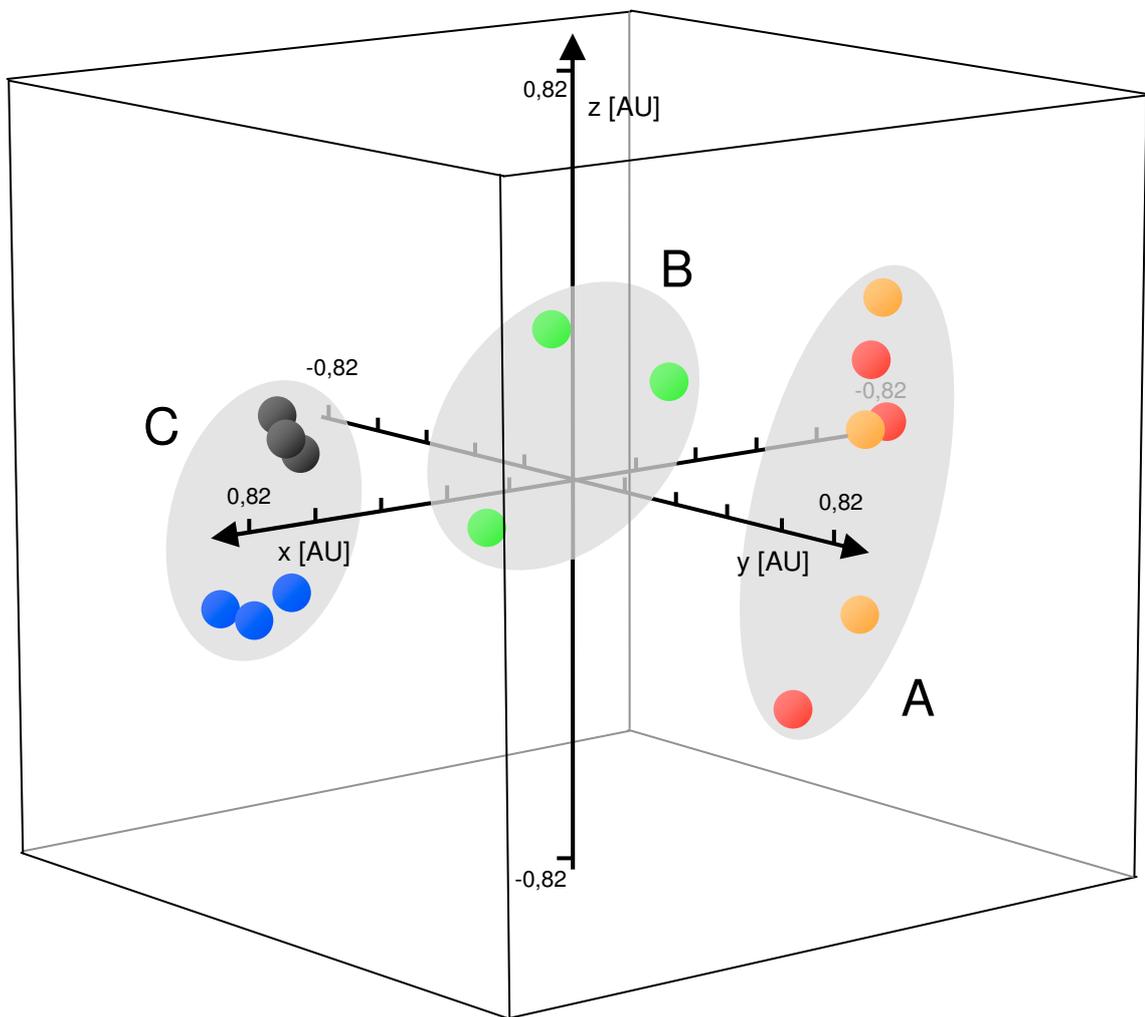


Abbildung 3-33: Multidimensionale Skalierung von Mikroarray-Daten.

Achsenkalierung: arbiträre Einheit [AU];

Farben

- orange:* Mikroarraydaten nichttransgener Mäuse (Kontrollen),
- rot:* Mikroarraydaten 30 Tage alter transgener Mäuse,
- grün:* Mikroarraydaten 60 Tage alter transgener Mäuse,
- blau:* Mikroarraydaten 90 Tage alter transgener Mäuse,
- schwarz:* Mikroarraydaten einer aus dem Tumor gewonnenen Zellkultur;

Schattierung

- A:* Cluster Kontrollen und 30 Tage alte transgene Mäuse,
- B:* Cluster 60 Tage alte transgene Mäuse,
- C:* Cluster 90 Tage alte transgene Mäuse und Zellkultur.

In der Abbildung ordnen sich die Punkte in drei Gruppen (Clustern) an, die mit der Entwicklung des Tumors korrelieren:

- Rechts (A in Abbildung 3-33) befinden sich die Punkte, welche die Expressionsdaten der Kontrollen und der transgenen Tiere im Alter von 30 Tagen repräsentieren.
- In der Mitte (B in Abbildung 3-33) findet man die Punkte, die für die Genexpression bei 60 Tage alten transgenen Tiere stehen.
- Links (C in Abbildung 3-33) befinden sich die Korrelate der 90 Tage alten Tiere und der Daten aus der Zellkultur der Tumorzellen.

Aus den Abstandsverhältnissen folgt somit, dass die Kontrollen und frühe Tumorstadien eine ähnliche Genexpression aufweisen. Noch engere Gemeinsamkeiten zeigt die Expression bei den Mäusen im Alter von 90 Tagen und der Zellkultur. Die Expression im Gewebe der Mäuse im Alter von 60 Tagen zeigt Eigenschaften, die sie zwischen diesen beiden Clustern positionieren.

Heatplot

Ein Heatplot schließlich ist eine häufig gesehene Darstellung einer großen Zahl von Genexpressionsdaten. Oft werden zudem die dargestellten Gene in Clustern zusammengefasst.

Bei den vorliegenden Werten teilen sich die untersuchten Gene nach ihrer Expression im Verlauf der Tumorentwicklung in zwei große Cluster (und zahlreiche weitere kleinere) auf, wobei eines Hoch- (A in Abbildung 3-34) und das andere Herunterregulation (B in Abbildung 3-34) bedeutet. Allgemein sieht es so aus, als würden Trends in der Genexpression, die sich im Verlauf der Tumorentwicklung gegenüber den Kontrollen darstellen, in der Zellkultur verstärkt fortsetzen (siehe Abbildung 3-34, nächste Seite).

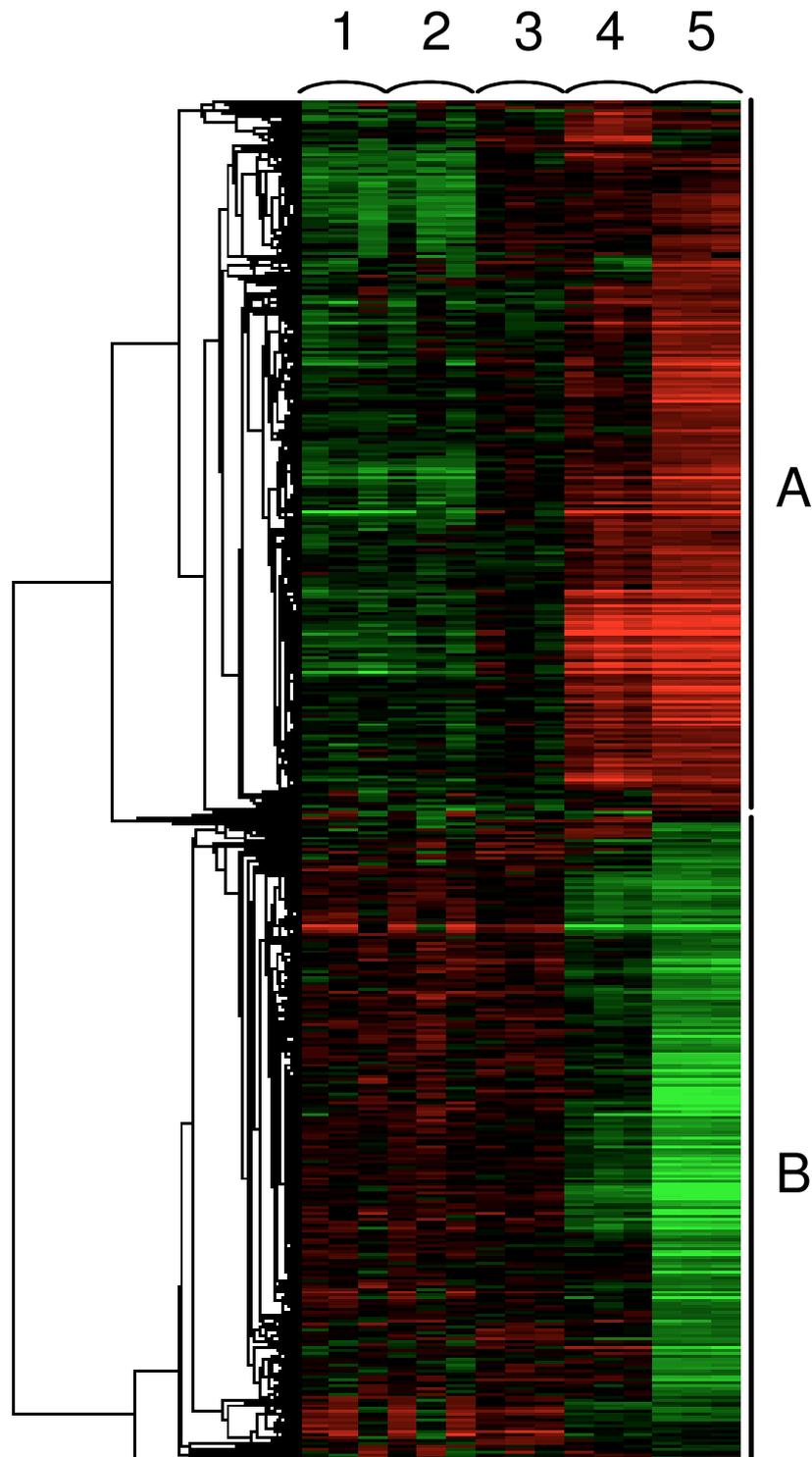


Abbildung 3-34: Heatplot von 3594 Genen im Verlauf der Tumorentwicklung.

Beschriftung:

1 = nichttransgene Kontrolltiere, 2 = 30 Tage, 3 = 60 Tage, 4 = 90 Tage alte transgene Tiere, 5 = Zellkultur (jeweils drei unabhängige Mikroarray-Analysen);

rot = Gen hier hochreguliert, schwarz = Gen hier mit mittlerer Expression, grün = Gen hier herunterreguliert;

A = Cluster hochregulierter Gene, B = Cluster herunterregulierter Gene.

Zusammengefasst lassen die drei vorgestellten Darstellungen von Genexpressionsprofilen folgende Schlüsse zu:

- Die Genexpression in Geweben verschiedener Tiere aus gleichen Gruppen (Kontrollen, 30/60/90 Tage, Zellkultur) verhalten sich ähnlich.
- Von den Kontrollen und den 30 über die 60 zu den 90 Tage alten transgenen Tieren findet eine kontinuierliche Veränderung der Genexpression statt, die mit der Tumorentwicklung parallel läuft.
- Die Genexpression in der Zellkultur der Tumorzellen verhält sich ähnlich der Genexpression bei 90 Tage alten transgenen Tieren.

Somit sind die vorgestellten Methoden geeignet, zunächst einen allgemeinen Überblick über die durch die Tumorentwicklung verursachten Veränderungen der Genexpression zu erhalten. Dabei stellte sich die Frage, mit welchen funktionellen Veränderungen diese einhergehen. Dies soll in den folgenden Abschnitten untersucht werden.

d) funktionelle Betrachtungen

Funktionen der Genprodukte deregulierter Gene

Für die Beschreibung von Genfunktionen bietet die Datenbank Gene Ontology^{10,47} einen hierarchisch gegliederten Wortschatz. Sie ist daher geeignet um darzustellen, welche Funktionen den Genprodukten der deregulierten Gene zugeordnet sind.

Hierzu wurden mit dem Programm GoSurfer¹⁵⁵ die bei den 90 Tage alten transgenen Tieren gegenüber den Kontrollen am stärksten deregulierten Gene mit der Gene Ontology-Datenbank verknüpft (eine Übersicht findet sich in Anhang 2: ergänzende Daten, Tabelle A - 22 auf Seite 109). Eine Auflistung dieser Gene und der Funktion ihrer jeweiligen Produkte wie in der dieser Tabelle gibt jedoch noch keinen guten Überblick. Daher wurden die Funktionen der Gene mit GoSurfer auch grafisch abgebildet. So wurde der Ausschnitt aus dem hierarchischen System von Gene Ontology dargestellt, der die Genfunktionen der im Tumorgewebe deregulierten Gene repräsentiert.

Dies erfolgte für die Funktionen der Genprodukte der 195 am stärksten hochregulierten (siehe Abbildung 3-35, Seite 69) und der 95 am stärksten herunterregulierten Gene (siehe Abbildung 3-36, Seite 70).

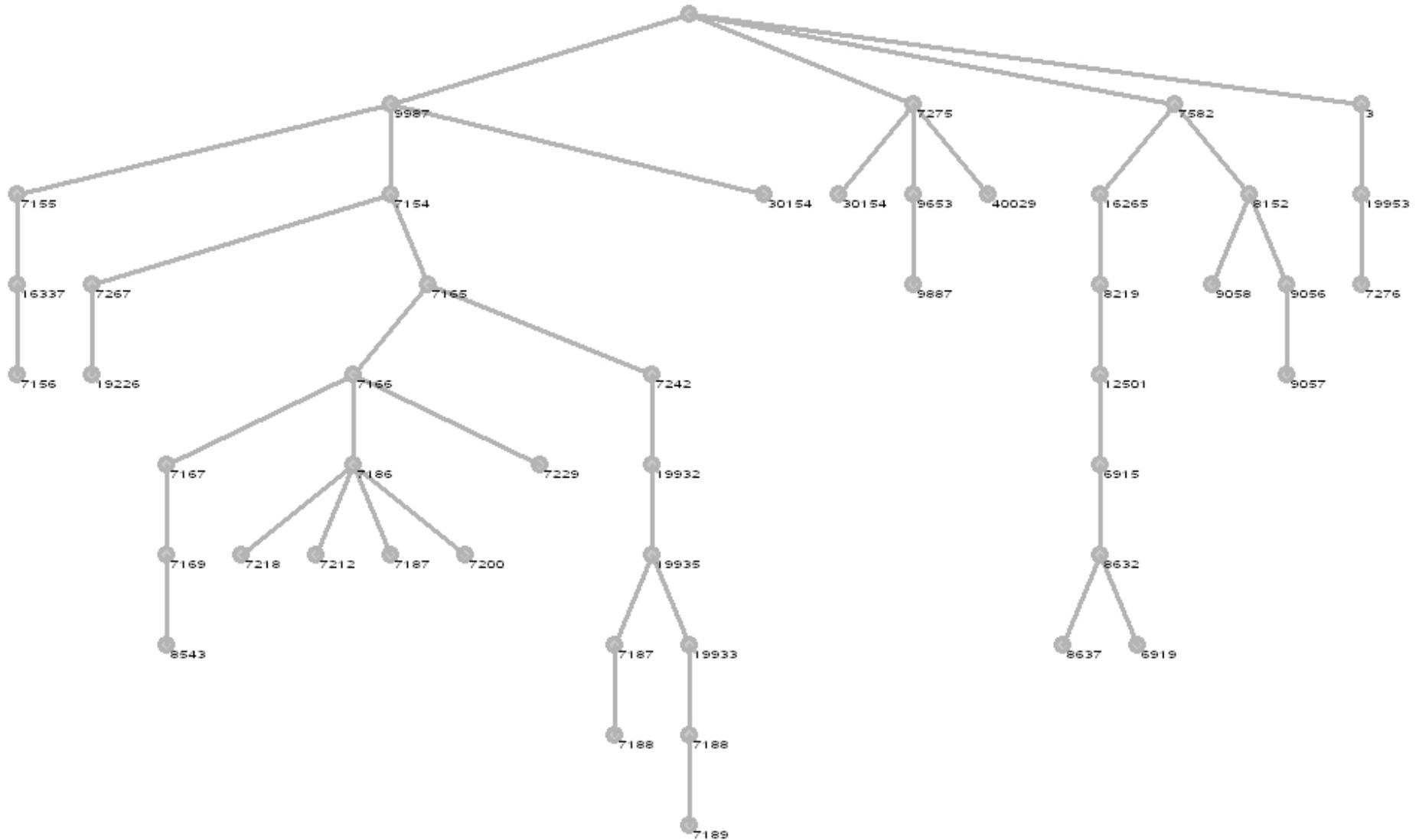


Abbildung 3-35: Darstellung der Funktionen der Genprodukte der 195 am stärksten hochregulierten Gene.

Gene Ontology-Kategorie „biological process“; Gene hochreguliert bei transgenen Mäusen im Alter von 90 Tagen im Vergleich zu den Kontrollen. Beschriftung: Gene Ontology ID, siehe Tabelle 3-3, Seite 71.

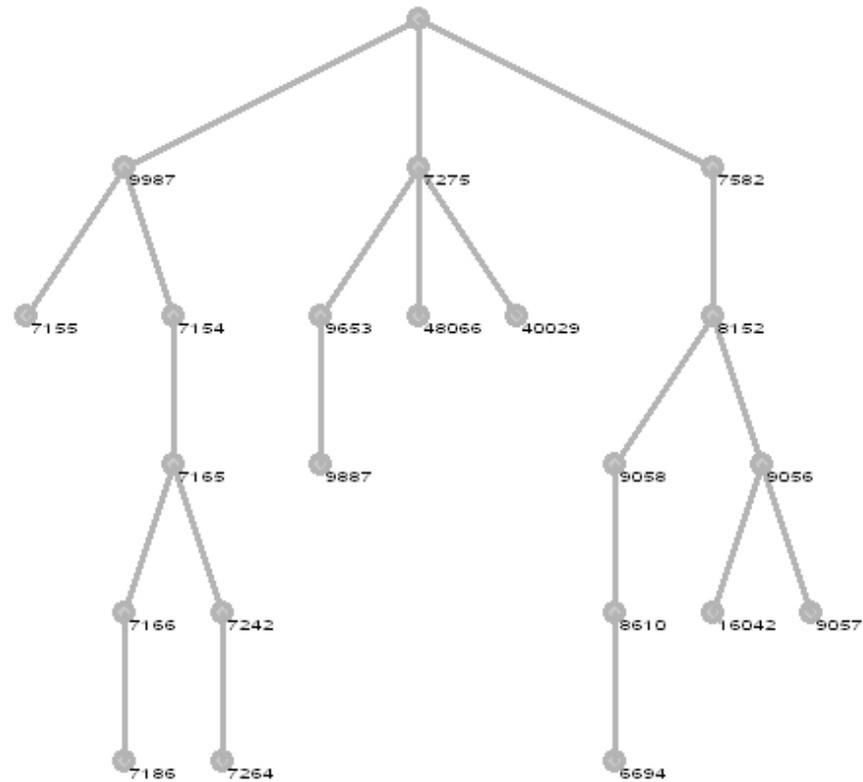


Abbildung 3-36: Darstellung der Funktionen der Genprodukte der 95 am stärksten herunterregulierten Gene.

Gene Ontology-Kategorie „biological process“; Gene herunterreguliert bei transgenen Mäusen im Alter von 90 Tagen im Vergleich zu den Kontrollen. Beschriftung: Gene Ontology ID, siehe Tabelle 3-3, Seite 71.

Tabelle 3-3: Funktionen der deregulierten Gene nach der Gene-Ontology-Datenbank (<http://www.geneontology.org/>)

Gene Ontology ID	Funktion
3	reproduction
6694	steroid biosynthetic process
6915	apoptosis
6919	activation of caspase activity
7154	cell communication
7155	cell adhesion
7156	homophilic cell adhesion
7165	signal transduction
7166	cell surface receptor linked signal transduction
7167	enzyme linked receptor protein signaling pathway
7169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway
7186	G-protein coupled receptor protein signaling pathway
7187	G-protein signaling, coupled to cyclic nucleotide second messenger
7188	G-protein signaling, coupled to cAMP nucleotide second messenger
7189	activation of adenylate cyclase activity by G-protein signaling pathway
7200	activation of phospholipase C activity by G-protein coupled receptor protein signaling
7212	dopamine receptor signaling pathway
7218	neuropeptide signaling pathway
7229	integrin-mediated signaling pathway
7242	intracellular signaling cascade
7264	small GTPase mediated signal transduction
7267	cell-cell signaling
7275	multicellular organismal development
7276	gamete generation
7582	unknown biological_process
8152	metabolic process
8219	cell death
8543	fibroblast growth factor receptor signaling pathway
8610	lipid biosynthetic process
8632	apoptosis
8637	apoptotic mitochondrial changes
9056	catabolic process
9058	biosynthetic process
9057	macromolecule catabolic process
9653	anatomical structure morphogenesis
9887	organ morphogenesis
9987	cellular process
12501	programmed cell death
16042	lipid catabolic process
16265	death
16337	cell-cell adhesion
19226	transmission of nerve impulse
19932	second-messenger-mediated signaling
19933	cAMP-mediated signaling
19935	cyclic-nucleotide-mediated signaling
19953	sexual reproduction
30154	cell differentiation
40029	regulation of gene expression, epigenetic
48066	pigmentation during development

Farbkodierung:

rot: Funktion tritt nur bei hochregulierten Genen auf;

schwarz: Funktion tritt bei hochregulierten und herunterregulierten Genen auf;

grün: Funktion tritt nur bei herunterregulierten Genen auf.

Somit zeigte sich in der Gene-Ontology-Domäne biologischer Prozess für die Genprodukte der hochregulierten Gene, dass sie

- den zellulären Prozessen (Gene-Ontology ID 9987)
 - Zelladhäsion (7155),
 - Zellkommunikation (7154) und
 - Zelldifferenzierung (30154) sowie
- der Entwicklung multizellulärer Organismen (7275) zugeordnet und darüber hinaus mit
- dem Zelltod (16265),
- dem Stoffwechsel (8152) und
- der Reproduktion (3) in Verbindung gebracht werden können.

Diese Funktionen decken sich weitgehend mit denen bei herunterregulierten Genen. Dabei sind nur Gene, deren Produkte Zelldifferenzierung (30154), Tod (16265) und Reproduktion (3) vermitteln, ausschließlich hochreguliert. Man muss jedoch hier beachten, dass es bei den verwendeten Methoden nicht möglich ist zu unterscheiden, ob es sich hierbei um Funktionen der Tumorzellen selbst oder beispielsweise um Reaktionen von umgebendem Gewebe der untersuchten Gewebeproben handelt.

Insgesamt illustriert diese Aufstellung, dass die durch die Tumorentstehung bewirkten Veränderungen in der Genexpression, wie sie in den vorhergehenden Abschnitten dargestellt wurden, auch mit Veränderungen in der funktionellen Ausrichtung der Gewebe einhergehen.

Betrachtung von Signalkaskaden

Nach heutigem Verständnis werden biologische Eigenschaften nur in Ausnahmefällen von einzelnen Genen vermittelt. Man geht davon aus, dass das Zusammenwirken von Genen in Signalkaskaden erst zu einem bestimmten Phänotyp führt. Bei der Betrachtung von Genexpressionsdaten könnte daher beispielsweise eine um 20% verstärkte Expression in allen Genen einer Signalkaskade biologisch relevanter sein als die 20fach erhöhte Expression eines einzelnen Gens^{17,126}.

Um Untersuchungen unter diesem Aspekt durchzuführen, wurde das Programm Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) verwendet^{17,126}. Mit GSEA kann die signifikante

Anreicherung von Mitgliedern einer Liste von Genen (Gene set) unter großen Zahlen deregulierter Gene nachgewiesen werden. Dies kann beispielsweise mit den bekannten Mitgliedern von Signalkaskaden erfolgen und vermittelt somit ein Bild davon, wie sich die Expression einer Signalkaskade als Ganzes verhält.

Um das Verhalten von Signalkaskaden im Verlauf der Tumorentwicklung zu untersuchen, wurden 811 Gene sets herangezogen welche in der Molecular Signature Database (MSigDB) des Programms GSEA (siehe <http://www.broad.mit.edu/gsea/msigdb/>) mit dem Merkmal „pathway“ (Signalkaskade) assoziiert waren.

Eine Analyse mit den Expressionswerte der 90 Tage alten Mäuse gegenüber den Kontrollen zeigte dann, dass 166 der 811 untersuchten Signalkaskaden signifikant dereguliert waren. Die Signifikanz von Daten wird vom Programm GSEA mit der False discovery rate (FDR) nachgewiesen. Nach Angaben der Hersteller des Programmes kann bei einer FDR von unter 0,25 davon ausgegangen werden, dass dem eine biologische Bedeutung zugrunde liegt. Allein 23 der 811 untersuchten Signalkaskaden wiesen eine False discovery rate (FDR) von unter 0,10 auf. Eine Übersicht dieser am stärksten deregulierten Signalkaskaden stellt Tabelle 3-4 auf der nächsten Seite dar. Weitergehende Informationen zu den Signalkaskaden finden sich unter <http://www.broad.mit.edu/gsea/msigdb/>.

Mit Bezug auf die Ergebnisse der RT-PCR ist das Auftreten der Wnt-Signalkaskade hier an vierter Stelle zunächst überraschend. Bei der Interpretation dieser Daten muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Gene set WNTPATHWAY andere Gene enthält als zuvor in dieser Arbeit mit RT-PCR untersucht wurden.

Mithilfe des Programms GSEA konnte somit nachgewiesen werden, dass neben den bereits in den vorangegangenen Analysen dargestellten Veränderungen der Genexpression von einzelnen Genen auch signifikante Veränderungen ganzer Signalkaskaden nachweisbar sind. Die wichtigste Erkenntnis in diesem Zusammenhang ist, dass die Wnt-Signalkaskade im Tumorgewebe gegenüber dem Gewebe nicht-transgener Kontrolliere hochreguliert ist.

Tabelle 3-4: Darstellung der 23 am stärksten deregulierten Signalkaskaden (90 Tage gegenüber Kontrollen, FDR < 0,10)

Name	Anzahl Gene	FDR
SULFUR_METABOLIC_PROCESS	30	0.0549
CHREBPPATHWAY	15	0.0549
BIOGENIC_AMINE_SYNTHESIS	15	0.0549
WNTPATHWAY	23	0.0647
CK1PATHWAY	15	0.0627
HSA05020_PARKINSONS_DISEASE	14	0.0614
MAPKKK_CASCADE	9	0.0666
HSA02010_ABC_TRANSPORTERS_GENERAL	39	0.0651
ARFPATHWAY	11	0.0640
OXYGEN_AND_REACTIVE_OXYGEN_SPECIES_METABOLIC_PROCESS	15	0.0631
CARM1PATHWAY	12	0.0716
BADPATHWAY	19	0.0732
NEGATIVE_REGULATION_OF_METABOLIC_PROCESS	186	0.0915
CALCIUM_REGULATION_IN_CARDIAC_CELLS	131	0.0889
NEGATIVE_REGULATION_OF_CELLULAR_METABOLIC_PROCESS	184	0.0866
SECRETORY_PATHWAY	59	0.0895
NOS1PATHWAY	19	0.0874
IL22BPPATHWAY	13	0.0856
SMOOTH_MUSCLE_CONTRACTION	135	0.0840
HSA01510_NEURODEGENERATIVE_DISEASES	33	0.0826
AKTPATHWAY	14	0.0887
REGULATED_SECRETORY_PATHWAY	9	0.0989
NEGATIVE_REGULATION_OF_RNA_METABOLIC_PROCESS	86	0.0970

Diese Ergebnisse zu deregulierten Signalkaskaden bildeten den Schlusspunkt der Untersuchungen in dieser Arbeit. Die über die Erkenntnis zur Deregulation der Wnt-Kaskade hinaus nun vorliegenden Daten zu veränderten Genfunktionen und deregulierten Signalkaskaden können in Zukunft zur Generierung von weiteren Hypothesen bei der Untersuchung des CEA424/Simian Virus 40 large T-Antigen – Modells dienen.

4) Diskussion

4.1 *Tiermodell und Methoden*

Die Untersuchung des CEA424/Simian Virus 40 large T-Antigen – Modells¹³⁰ ermöglichte das Studium der Entwicklung eines im Antrum des Magens transgener Tiere entstehenden autochthonen Tumors. Der Vorteil dieser Herangehensweise liegt in der Reproduzierbarkeit einer Tumorart durch Zucht in einer theoretisch beliebig großen Anzahl von Versuchstieren. Ein stabil reproduzierbarer Phänotyp in transgenen Tieren mit dem SV 40 large T-Antigen in Verbindung mit einem organspezifischen Promotor als „hybridem Onkogen“ wurde schon in zahlreichen anderen Tiermodellen beschrieben. Auch dort konnten solche Tiermodelle für weiterführende Untersuchungen eingesetzt werden, unter anderem zur Genexpression in den entstandenen Tumoren^{18,36,40,42,45,53,60,74,82,97,128,148}.

Tiermodelle für autochthone Tumoren, zu denen auch das in dieser Arbeit untersuchte Tiermodell gehört, sind grundsätzlich besser geeignet für Untersuchungen zur Krebsentstehung als beispielsweise Zellkulturen oder Tiere nach Injektion xenogener Tumorzellen. Sie können die komplexen Interaktionen bei der Tumorentstehung in einem Organ und dem gesamten Organismus besser abbilden als dies durch andere Methoden möglich ist^{54,135,142}.

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tiermodell wurden aufgrund der Verpaarung transgener Männchen mit nichttransgenen Weibchen in Zucht die Tiere vor Einschluss in die Untersuchungen auf Transgenität getestet. Dies erfolgte mit PCR an genomischer DNA. Bei der Gestaltung der Primer wurde die beschriebene Sequenz des Transgens zugrunde gelegt^{19,114,130}. Unter Verwendung dieser Primer wurde auch die Expression des Onkogens im Verlauf der Tumorentwicklung mit reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) nachvollzogen. Das SV 40 large T-Antigen konnte mit diesem Ansatz eindeutig nachgewiesen werden.

Um mögliche Einflüsse des Ortes der Integration des Transgens auf die organspezifische Expression des SV 40 large T-Antigens aufzuklären, sollte das Transgen im Genom der Maus lokalisiert werden. Denkbare Ansätze hierzu wären unter anderem Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)¹⁴¹, Southern blot¹²⁴, verschiedene Varianten der PCR sowie eine Sequenzierung des gesamten Genoms der transgenen Tiere. Mit

FISH konnte das Transgen von Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe nicht detektiert werden. Dies lag vermutlich an der mit insgesamt 3057 bp verhältnismäßig geringen Größe. Einer Sequenzierung des gesamten Genoms standen zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit Kostengründe im Weg, da der finanzielle Aufwand im Vergleich zum erhofften Erkenntnisgewinn als unverhältnismäßig erschien. Aufgrund der in der Arbeitsgruppe vorhandenen Expertise mit Molekularbiologie, insbesondere PCR, entschied man sich somit zur Aufklärung der Integrationsstelle für ein kommerziell erhältliches Kit, welches die Durchführung von Walking-PCR⁵⁵ ermöglichte. Mit dieser Methode war es in der Folge möglich, die Lokalisation aufzuklären.

Unter der Fragestellung, welche Gene und Signalkaskaden an der Tumorentwicklung beteiligt waren, wurden Genexpressionsanalysen mit Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Die Auswahl von Kandidatengenen erfolgte unter dem Eindruck der Charakterisierung einer Tumorzelllinie aus diesem Modell als Adenokarzinom durch Nöckel et. al.⁹⁰. Es wurden daher aus der Literatur Gene ausgewählt, bei denen eine Beteiligung an der Entwicklung eines Magenkarzinoms möglich erschien. So konnte im Sinne hypothesengetriebener Forschung gezielt die Expression ausgewählter Gene untersucht werden. Diese Methode findet jedoch ihre Grenzen beispielsweise im Design von Primern. So ist es aufgrund des Bindungsverhaltens komplementärer Basen nicht möglich, für jede beliebige Basensequenz ausreichend verlässliche Primer herzustellen. Darüber hinaus stellt die Durchführung von RT-PCR hohe methodische Anforderungen an den Experimentator. So ist während der Arbeit mit RNA im Labor äußerste Sorgfalt in die Freiheit des Arbeitsbereichs von RNAsen zu legen, da diese omnipräsenten Enzyme RNA unmittelbar degradieren. Innerhalb dieser Grenzen liegen die Stärken von RT-PCR jedoch in der quantitativen Darstellung auch kleinster Mengen von exprimierter RNA. Diese Methode erlaubt somit die quantitative Untersuchung der Genexpression in Gewebeproben aus dem Magen der in dieser Arbeit untersuchten transgenen Tiere.

Es zeigte sich bei den Vergleichen der ermittelten Genexpression, dass zwischen den Werten aus dem Corpus und dem Antrum des Magens mitunter kein signifikanter Unterschied bestand. Dies könnte einerseits durch eine Tumorausbreitung in den Corpus verursacht sein. Möglicherweise ist es aber andererseits auch ein Hinweis darauf, dass die makroskopisch vorgenommene Einteilung der Gewebeproben nicht immer eine ausreichende Trennschärfe zwischen den Magenregionen ermöglichte.

Die Methode der RT-PCR stößt auch an ihre Grenzen, je mehr Kandidatengene untersucht werden sollen. Hier steigt der materielle und zeitliche Aufwand linear an. Um über die bereits mit RT-PCR untersuchten Gene hinaus im Verlauf der Untersuchungen eine noch größere Anzahl weiterer Gene betrachten zu können, wurde eine weitere Methode benötigt, die einen hohen Durchsatz ermöglichte.

Es wurde daher eine Mikroarray-Analyse⁷⁰ der gesamten Genexpression auf RNA-Ebene durchgeführt. Als technische Plattform wurde hierfür die der Firma Illumina gewählt, da einerseits ein Kooperationspartner der Arbeitsgruppe diese routinemäßig anwendete, andererseits im Jahr 2007 Illumina mit der Bead-Technologie im Vergleich zu den Lösungen der Firma Affymetrix über technisch fortgeschrittenere Produkte verfügte². Mit der Durchführung einer Mikroarray-Analyse konnte in der Folge eine Datenbank der gesamten Genexpression über die Zeit der Tumorentwicklung erstellt werden (Expressionslibrary). Diese steht nun auch für Fragestellungen über die vorliegende Arbeit hinaus zur Verfügung. Weiterhin liegt nun eine Übersicht deregulierter Gene vor.

Über Durchführung und Auswertung von Mikroarray-Analysen wird bis heute kontrovers diskutiert. Seit die Mikroarray-Technologie zur Verfügung steht, herrscht die Überzeugung, dass für die umfassenden Datenmengen, die so gewonnen werden können, Standards nötig sind um Vergleichbarkeit und damit einen nachhaltigen Erkenntnisgewinn zu ermöglichen^{22,28}. Dies führte zur Gründung der Microarray and Gene Expression Data Society (MGED, www.mged.org), die 2001 mit „Minimal Information About a Microarray Experiment (MIAME)“ einen ersten Standard für Publikationen definierte²¹. Obwohl dieser weithin ausdrücklich begrüßt wurde¹, ist die Frage, ob und welche Standards für Mikroarray-Analysen nötig sind, bis heute umstritten¹⁰⁷.

Um die Qualität der Daten sicherzustellen, wurden in dieser Arbeit in jeder Altersgruppe sowie bei den Kontrollen jeweils drei Mikroarray-Untersuchungen durchgeführt und bei der Interpretation die Mittelwerte dieser Gruppen verwendet. Um weiterhin die in dieser Arbeit angewendeten Verfahren möglichst leicht nachvollziehbar und beurteilbar zu machen, wurden alle relevanten Daten zur Durchführung des Mikroarray-Experiments und zur Prozessierung der Daten im Kapitel 2) Tiere und Methoden aufgeführt. In der Auswertung wurden nur solche Gene berücksichtigt, für die in mindestens einer Untersuchung ein gültiger Expressionswert bestimmt werden konnte (als „present“ markiert). Bei der Betrachtung einzelner Gene wurde ein Anstieg um mindestens das 2fache als notwendig erachtet um einer veränderten Expression eine biologische Be-

deutung beizumessen. Allgemein ist und bleibt die Auswertung und Interpretation von Mikroarray-Daten jedoch weiterhin eine große Herausforderung. Hier sind bis heute keine Standards gesetzt.

In dieser Arbeit wurden die im Rahmen der Mikroarray-Analyse gewonnenen Daten unter zu Hilfenahme verschiedener Computerprogramme weiter analysiert. Eingesetzt wurde dabei BRB-Array Tools, GoSurfer und Gene set enrichment analysis (GSEA). Mit BRB-ArrayTools¹²¹ wurden zunächst Bearbeitung der Daten und Darstellungen der Genexpression möglich. Weiterhin konnte mit GoSurfer¹⁵⁵ durch die Verknüpfung der Expressionsdaten mit den Funktionen der Genprodukte ein Einblick erhalten werden, welche biologischen Funktionen sich mit der Tumorentwicklung verändern. Schließlich erlaubte GSEA^{17,87,126,127} die systematische Betrachtung ganzer Signalkaskaden. Dies zeigte einerseits die große Zahl der Möglichkeiten, die sich ausgehend von der Datengewinnung mit Mikroarray-Analysen ergeben, andererseits aber auch, dass in Zukunft weitere Standards nötig sind, um die Vergleichbarkeit bei Auswertung und Interpretation zu gewährleisten.

Zu den oben genannten Programmen wären zahlreiche Alternativen denkbar gewesen, darunter Anwendungen wie Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) und Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com/>), welche jeweils weit verbreitet sind⁹³. Die Entscheidung für die drei oben genannten Programme fiel dabei einerseits, da sie nicht-kommerziell erhältlich waren, andererseits da sie teilweise schon von Kooperationspartnern in Anwendung waren und somit hier bereits auf Erfahrungen zurückgegriffen werden konnte.

Vergleicht man die mit RT-PCR erhaltenen Ergebnisse mit denen aus der Mikroarray-Analyse, so muss berücksichtigt werden, dass eine Untersuchung mit PCR eine Amplifikation beinhaltet. 35 PCR-Zyklen bedeuten eine Vervielfältigung des untersuchten cDNA-Materials um das 2^{35} -fache. Es ist daher nicht grundsätzlich unvereinbar, wenn die mit den verschiedenen Methoden erhobenen Expressionsdaten zu einem Gen nicht identisch sind. So ist es beispielsweise möglich, dass Veränderungen der Expression, die mit RT-PCR dargestellt werden können, zu gering sind, um mit der Mikroarray-Analyse (die ohne Amplifikation stattfindet) nachvollzogen werden zu können. Andererseits besteht mit Mikroarray die Möglichkeit die Expression von Genen zu untersuchen, für die mit RT-PCR beispielsweise keine verlässlichen Primer gefunden werden konnten. Ein weiter Vorteil der Mikroarray-Analyse ist, dass die erhobenen

Daten in der Folge mit Analyseprogrammen unter Berücksichtigung beispielsweise funktioneller Zusammenhänge weiter ausgewertet werden können. Ein Beispiel für die Aufdeckung eines signifikanten Zusammenhangs durch eine solche Anwendung sind die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Wnt-Signalkaskade.

Hier ergaben zunächst die Expressionsanalysen der ausgewählte Gene *Wnt5a* (Ligand), *Fzd5* (Rezeptor) sowie *Lef1* und *Tcf4* (Transkriptionsfaktoren) mit RT-PCR (siehe Seite 80, Tabelle 4-1, I) keine statistisch signifikanten Veränderungen, aufgrund derer eine Beteiligung der Wnt-Kaskade an der Tumorentwicklung im untersuchten Tiermodell hätte vermutet werden können.

Die Analyse der Expressionsdaten aus der Mikroarray-Analyse mit dem Programm Gene set enrichment analysis (GSEA) zeigte jedoch ein anderes Bild. Die Gene des Gene sets WNTPATHWAY (siehe Seite 80, Tabelle 4-1, II) aus der Molecular Signatures Database (MSigDB)¹²⁶ waren im Tumorgewebe 90 Tage alter transgener Tiere gegenüber den Kontrollen signifikant hochreguliert (false discovery rate [FDR] 0,0647; nach Angaben des Herstellers des Programms kann ab $FDR < 0,25$ davon ausgegangen werden, dass dem Befund eine biologische Bedeutung zugrunde liegt). Damit war eine Hochregulation der Wnt-Signalkaskade gezeigt worden.

Diese beiden Befunde erscheinen auf den ersten Blick widersprüchlich. Es ist dabei jedoch zu bedenken, dass bei den genannten Analysen jeweils die Expressionswerte verschiedener Gene untersucht wurden. Insbesondere wurden mit den beiden Methoden jeweils verschiedene Homologe von *Fzd*, *Tcf* und *Wnt* betrachtet (siehe Seite 80, Tabelle 4-1, farbig markiert).

Darüber hinaus beruht GSEA auf dem Prinzip, dass geringe, aber gleichartige Veränderungen in mehreren Genen einer Signalkaskade im Sinne der biologischen Bedeutung aussagekräftiger sind als starke Veränderungen von einzelnen Genen^{17,126,127}. Solche Veränderungen können jedoch nur nachgewiesen werden durch die Auswertung von Daten der gesamten Genexpression, wie durch die Mikroarray-Analyse erhalten, in Kombination mit neuartigen Methoden der Bioinformatik, wie dem Programm GSEA.

Die beiden in der Untersuchung der Genexpression zur Anwendung gebrachten Methoden sollten daher nicht als konkurrierend, sondern vielmehr unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen spezifischen Vorteile als ergänzend betrachtet werden. Zusammengefasst sind dies für die RT-PCR die strikt hypothesengetriebene Herangehensweise und die Amplifikation, die es möglich macht auch noch geringfügige Veränderungen der Gen-

expression nachzuweisen. Demgegenüber sprechen für die Mikroarray-Analyse die umfassende Datenerhebung im Sinne einer Gesamtexpressionsanalyse sowie die breiten Möglichkeiten, die sich mit der computergestützten Aufarbeitung der gewonnenen Daten bieten.

Tabelle 4-1: untersuchte Gene der Wnt-Signalkaskade;

I Auswahl für RT-PCR	II Gene set „WNTPATHWAY“ der MSigDB ¹²⁶
<p style="text-align: center;"> Fzd5 Lef1 Tcf4 Wnt5a </p>	<p style="text-align: center;"> APC AXIN1 BTRC CCND1 CREBBP CSNK1A1 CSNK1D CSNK2A1 CTBP1 CTNNB1 DVL1 FRAT1 FZD1 GSK3B HDAC1 MADH4 MAP3K7 MAP3K7IP1 MYC NLK PPARD PPP2CA TCF1 TLE1 WIF1 WNT1 </p>

farbig markiert sind homologe Gene:

- grün: homologe Fzd-Rezeptoren
- orange: homologe Tcf-Transkriptionsfaktoren
- rot: homologe Wnt-Liganden

4.2 Wirkung des Onkogens

Das Tiermodell der CEA424/large-T-Antigen – transgenen Mäuse entstand durch die Insertion eines bekannten Onkogens (SV 40 large T-Antigen)¹⁹ zusammen mit einem organspezifischen Promotor (CEA424)^{48,114} als „hybridem Onkogen“⁴² in das Genom von Mäusen. Das ursprüngliche Ziel war, ein Modell für ein Colonkarzinom zu erhalten. Entgegen den Erwartungen entstand jedoch bei den Tieren ein invasiver Tumor im Antrum des Magens¹³⁰. Dieser Phänotyp war stabil und konnte in Zucht im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München weitergeführt werden.

Die Tatsache, dass der Tumor, der sich in einem transgenen Tiermodell mit einem hybriden Onkogen unter Beteiligung des SV 40 large T-Antigens entwickelt, von einer anderen Art ist als aufgrund der Auswahl des Promotors erwartet, wurde auch schon von Gum et. al. beschrieben⁴². Dies weist darauf hin, dass die Wechselwirkungen an Promotoren, die jeweils zur Expression eines nachgeschalteten SV 40 large T-Antigens führen, möglicherweise komplexer sind als aktuell angenommen.

Der Tumor entwickelte sich derart rasch, dass die Lebenserwartung der Tiere auf etwa 120 Tage limitiert war. Mäuse in Gefangenschaft erreichen sonst typischerweise Lebensspannen von bis zu vier Jahren²⁹. Ab einem Alter von etwa 100 Tagen nahmen die Tiere stark an Gewicht ab. Als Ursache hierfür wird eine Verlegung der Magenpassage durch den Tumor im Antrum vermutet. Bei einem Gewichtsverlust von mehr als 10% wurden die Tiere getötet.

Die Entstehung eines Tumors im Magen war verbunden mit dem Auftreten von ungesplicerter und gesplicerter mRNA des SV 40 large T-Antigens. Diese nimmt mit fortschreitendem Alter der Tiere zu, zuerst im Antrum des Magens, später auch im Corpus. Nicht-transgene Mäuse exprimieren das Onkogen erwartungsgemäß nicht. Bei transgenen Tieren steigt die Expression im Magen mit zunehmendem Alter an, außerhalb des Magens ist in keinem Stadium eine Expression nachweisbar. Zusammengenommen bestätigt dies die Annahme, dass es sich bei der Entwicklung des Tumors bei den CEA424/SV 40 large T-Antigen – transgenen Mäusen um einen vom SV 40 large T-Antigen getriebenen Prozess handelt. Andere Hypothesen zur Tumorentwicklung, wie eine loss-of-function-Mutation eines endogenen Tumorsuppressorgens oder eine gain-of-function-Mutation eines endogenen Protoonkogens erscheinen daher als unwahrscheinlich.

Die Wirkung des SV 40 large T-Antigens und verwandter Gene als Onkogen wurde schon eingehend beschrieben^{19,76,146,147} und erfolgt vor allem durch Inhibition der Wirkung von Tumor-Supressor-Genen wie p53 und verschiedenen Mitgliedern der Familie der Retinoblastom-Proteine (pRB)^{3,24}. Beim Menschen rufen Polyomaviren wie der JC Virus und der BK Virus, mit denen SV 40 eng verwandt ist, in seltenen Fällen auch Tumorerkrankungen hervor^{146,147}. Es gibt unterschiedliche Ansichten, ob SV 40 eine Rolle bei menschlichen Krebserkrankungen spielt. Der Virus wurde beispielsweise schon mit der Entstehung von Mesotheliomen in Zusammenhang gebracht. Insgesamt sind die Hinweise auf eine Beteiligung von SV 40 an menschlichen Krebserkrankungen bisher jedoch eher schwach^{39,100}.

Untersuchungen an den CEA424/large T-Antigen – transgenen Mäuse können somit als Tiermodell die spontane organspezifische Entwicklung eines Tumors abbilden. Solche Tumoren werden auch als autochthone Tumoren bezeichnet. Hier kann dargestellt werden, wie durch ein bekanntes Onkogen Zellen zu übermäßigem Wachstum transformiert werden und dadurch Tumoren entstehen. So können beispielhaft Veränderungen in der Genexpression und damit verbundene Veränderungen bestimmter Signalkaskaden untersucht werden.

4.3 Rolle der Integration des Transgens

Im hier untersuchten Tiermodell entstehen Tumore ausschließlich im Antrum des Magens und somit sogar spezifisch für einen Abschnitt eines Organs. Die gefundene Integration des Transgens auf dem Chromosom 4 scheint jedoch keinen Einfluss auf die organspezifische Tumorentwicklung zu haben.

Denkbar wäre gewesen, dass durch die Insertion des CEA424/SV 40 large T-Antigen – Transgens ein in diesem Abschnitt aktives Onkogen aktiviert (gain-of-function-Mutation) oder ein Tumorsupressorgen inaktiviert (loss-of-function-Mutation) wurde. Da sich in der Umgebung der Umgebung der Integrationsstelle jedoch solche Gene nicht finden, kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden.

Eine weitere Hypothese für diese Entwicklung war, dass die Integration des Transgens aufgrund einer Nachbarschaft zu in diesem Organteil besonders aktiven Genen zur Expression des T-Antigens führt. Beispiele hierfür wären etwa Hormone, die ausschließlich oder vorwiegend im Antrum des Magens gebildet werden, wie Gastrin.

In der Umgebung der ermittelten Insertionsstelle wurden jedoch keine Gene gefunden, die speziell im Antrum eine besonders starke Expression aufweisen. Die am nächsten zur Integrationsstelle liegenden definierten Gene mit bekannter Funktion sind stromaufwärts Lingo2 und Ifnk sowie stromabwärts Aco1. Lingo2 spielt eine Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung des zentralen und peripheren Nervensystems^{43,52}. Ifnk kodiert für das Zytokin Interferon- κ ¹³⁸. Aco1 ist beteiligt an der intrazellulären Regulation des Eisenstoffwechsels⁸, spielt eine Rolle bei Entzündungsreaktionen und besitzt als Aconitase eine Funktion im Citratzyklus¹³⁹. Für alle drei Gene ist keine besondere Funktion im Gastrointestinaltrakt bekannt. Es gibt auch keine Hinweise, dass eines dieser Gene speziell im Antrum des Magens stark exprimiert ist. Somit ist nach den vorliegenden Daten die organspezifische Tumorentwicklung in diesem Tiermodell kein Effekt durch vermehrte Transkription des Transgens aufgrund der Nähe zu einem organspezifisch stark exprimierten Gen.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Syder et. al.¹²⁸ bei der Untersuchung eines Tiermodells, bei dem das SV 40 large T-Antigen als Onkogen unter der Kontrolle des Atp4b-Promotors steht. Dabei wurden in unabhängigen Experimenten zwei transgene Mauslinien hergestellt. Es kann davon ausgegangen werden, dass damit das Transgen an zwei unterschiedlichen Stellen in das Genom der Tiere integriert wurde. Beide Mauslinien entwickelten jedoch ein gleichartiges invasives Magenkarzinom, was darauf hinweist, dass die Integrationsstelle hier keine Auswirkung auf den Phänotyp hat.

Die publizierten Daten von Thompson et. al. bei der Etablierung des in dieser Arbeit untersuchten Tiermodells belegen dabei, dass eine bestimmte Promotor/Onkogen-Kombination keinen festen Integrationsort hat¹³⁰: zunächst wurden unabhängig voneinander verschiedene Mauslinien mit dem identischen CEA424/SV 40 large T-Antigen - Transgen hergestellt. Diese zeigten Tumoren in verschiedenen Lokalisationen, unter anderem in der Lunge, in Bindegewebe und Knochen. Jedoch entwickelte nur eine Mauslinie stabil eine bestimmte Tumorart. Dies war der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Phänotyp mit einem Magentumor.

4.4 Organspezifische Tumorentstehung

Somit blieb eine zentrale Frage bei der Betrachtung des CEA424/SV 40 large T-Antigen Modells, warum sich der Tumor in diesem Tiermodell spezifisch im Antrum des

Magens entwickelt. Die Hypothese hierzu war in der Folge, dass organspezifische Signalkaskaden oder Faktoren über eine Aktivierung des CEA424-Promotors die Expression des SV 40 large T-Antigens hervorrufen.

Vom Expressionsprofil von CEA lässt sich jedoch nicht direkt ein Anhaltspunkt für die Ursache der organspezifischen Tumorentwicklung ableiten. Das Carzinoembryonale Antigen (CEA) ist bei vielen Krebsarten, charakteristischerweise bei Colonkarzinomen, hoch exprimiert und wird klinisch als Tumormarker verwendet⁸³. Beim Magenkarzinom kann auch eine erhöhte Expression vorliegen²⁷. Dies ist jedoch nicht immer der Fall, weswegen die klinische Anwendung als Tumormarker für das Magenkarzinom umstritten ist⁶⁶.

Die Auswahl von Genen, die als Kandidaten für die Ursache der organspezifischen Tumorentwicklung gesehen wurden, stand dabei zu Beginn der Arbeit unter dem Eindruck der Studie von Nöckel et. al.⁹⁰, die den Tumor des Tiermodells als Adenokarzinom beschrieben hatten.

Eine wesentliche Rolle bei den Überlegungen spielte daher die Wnt-Signalkaskade. Eine Beteiligung dieser Kaskade an der Entwicklung kolorektaler Tumoren wird heute kaum mehr bezweifelt^{9,15,46,102,140}. Wnt-Signale werden als der wesentliche Stimulus hinter der Proliferation epithelialer Zellen im Magen-Darm-Trakt gesehen¹³⁴. So konnten unter anderem Barker et. al. durch Untersuchungen am Wnt-Zielgen *Lgr5* nachweisen, dass Wnt-Signale ausschlaggebend sind für die Erhaltung von Stammzellen in den Krypten des Darmes und auch zu ihrer Proliferation beitragen¹⁴. Dies konnte zudem kürzlich eindrucksvoll für den Magen bestätigt werden¹³. Die in der Mikroarray-Analyse mit dem Programm GSEA nachgewiesene Hochregulation der Wnt-Signalkaskade im Tumorgewebe lässt auf eine Beteiligung an der Tumorentwicklung schließen. Ihre Funktion ist dabei am ehesten die eines Stimulus der Zellproliferation.

Demgegenüber nimmt die Expression von mehreren Differenzierungsfaktoren während der Tumorentwicklung ab. Bei *Ihh* handelt es sich dabei um einen Liganden der Hedgehog-Signalkaskade. Diese spielt eine wichtige Rolle bei Embryonalentwicklung und Differenzierung^{4,75,95,133}. Eine fehlerhafte Regulation dieses Signalweges etwa durch Mutation kann die Entwicklung von verschiedenen Tumoren in unterschiedlichen Organsystemen verursachen oder fördern^{4,5,89,94,140,144}. Besonders für Tumoren im Gastrointestinaltrakt ist eine Beteiligung von Hedgehog-Genen nachgewiesen^{16,75,95}. *Ihh* wird eine wichtige Funktion bei der Embryogenese des Antrums sowie bei Differenzie-

nung und Aufrechterhaltung epithelialer Zellpopulationen in diesem Abschnitt des Magens zugeschrieben⁶⁷.

Notch-Signale sind ebenfalls an der Regulation der Differenzierung von Zellen in den Krypten der Darmschleimhaut beteiligt. Insbesondere ist die Interaktion von Notch mit seinem Liganden Dll1 essentiell für die Differenzierung von Stammzellen in epitheliale Zellen^{61,132}. Analog dazu kann ein zu geringes Notch-Signal zur Entstehung von Tumoren beitragen^{61,102,103,113,123}. Notch1 ist besonders im oberen Gastrointestinaltrakt für die Funktion der Notch-Signalkaskade von Bedeutung¹¹⁰. Die Tatsache, dass mit Ihh und Notch1 zwei epitheliale Differenzierungsfaktoren im durch die Tumorentstehung geringer exprimiert werden, wird daher in diesem Tiermodell als Beleg dafür verstanden, dass epitheliale Zellen durch das Wachstum des Tumors verdrängt werden.

Der Transkriptionsfaktor Pdx1, der ebenfalls in den Tumoren geringere Expression als im Normalgewebe zeigt, ist in der Embryogenese essentiell für die Entwicklung des Pankreas²⁰. Im adulten Organismus ist Pdx1 insbesondere für die Funktion der β -Zellen notwendig und somit eine Voraussetzung für einen physiologischen Glukosestoffwechsel³⁵. Auch im Antrum des Magens hat Pdx1 eine wesentliche Bedeutung für die Entwicklung der Morphologie³⁵. Zudem korreliert die Expression von Pdx1 mit der Anzahl enteroendokriner Zellen, dazu zählen im Antrum insbesondere die Gastrin-produzierenden G-Zellen²⁰.

Unter diesem Gesichtspunkt ist es bemerkenswert, dass neben einer verminderten Expression von Pdx1 in dieser Arbeit auch gezeigt werden konnte, dass die Expression des Hormons Gastrin im Verlauf der Tumorentwicklung abnimmt. Die Expression von Gastrin wurde untersucht, da ein positiver Effekt dieses Peptidhormons auf die Entwicklung von Magenkarzinomen diskutiert wird¹⁴³. Auch wurde ein fördernder Einfluss auf Colonkarzinome beschrieben³⁰. Die Abnahme der Expression von Gastrin kann dabei als bestes Beispiel für einen angenommenen Verdrängungseffekt dienen. Gastrin wird spezifisch von G-Zellen vor allem im Antrum des Magens produziert¹¹⁵. Wenn diese Zellen nicht an der Tumorentwicklung beteiligt sind, was hiermit angenommen wird, nimmt ihre Zahl ab und damit das Expressionssignal von Gastrin im untersuchten Gewebe.

Bei der gleichzeitig mit Gastrin bestimmten Expression des Gastrin-Rezeptors Cck2r fand sich schließlich eine stark vermehrte Expression während der Tumorentwicklung. Der Cck2-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, dessen Liganden Gastrin

und Cholezystokinin darstellen. Außerhalb des zentralen Nervensystems spielt jedoch Cholezystokinin nur eine geringe Rolle, weswegen der Cck2-Rezeptor dort als Gastrin-Rezeptor bezeichnet wird³⁰. Die hier gefundene starke Expression des Cck2-Rezeptors in Tumorgewebe wurde als Hinweis darauf verstanden, dass die Tumorzellen den Cck2-Rezeptor exprimieren. Kürzlich wurde auch gezeigt, dass der Cck2-Rezeptor auf der Oberfläche von Zellen einen wesentlichen Beitrag bei der Transformation zu Tumorzellen leisten kann²⁵.

Eine organspezifische Induktion des Tumors in diesem Modell könnte daher am ehesten über den Cck2-Rezeptor erfolgen, da im Ort der Tumorentstehung, dem Antrum des Magens, physiologischerweise auch eine hohe Konzentration von Gastrin vorliegt¹¹⁵. Vorläufige, noch unveröffentlichte Ergebnisse untermauern diese Annahme: in einem Reporter-Assay, in dem in Kultur gehaltene Tumorzellen aus dem hier untersuchten Tiermodell untersucht wurden, konnte durch Pentagastrin die Expression des SV 40 large T-Antigens gesteigert werden³².

Bemerkenswert ist jedoch, dass bei der Mehrzahl der Gene, deren Expression in dieser Arbeit untersucht wurden, kein Zusammenhang mit der Tumorentstehung gefunden werden konnte. Eine Erklärung hierfür ergab sich durch die Untersuchungen zum Phänotyp der Tumorzellen.

4.5 Phänotyp der Tumorzellen

Mit den aus den Daten der Mikroarray-Analyse erstellten Genexpressionsprofilen waren auch Schlussfolgerungen zum ursprünglichen Phänotyp der Tumorzellen möglich. Die Ergebnisse von Nöckel et. al., die eine aus den Tumoren des Tiermodells etablierte Zelllinie untersuchten, ließen dabei zunächst den Phänotyp eines Adenokarzinoms vermuten⁹⁰.

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Untersuchungen wiesen jedoch in eine andere Richtung. Besonders die starke Expression von Genen wie Secretin (Sct), Secretogranin II (Sct2), Glucagon (Gcg) und Chromogranin A (Cga) legten einen neuroendokrinen Phänotyp nahe. Dies ist auch in Übereinstimmung mit anderen transgenen Tiermodellen für Krebs, bei denen das SV 40 large T-Antigen unter der Kontrolle verschiedener Promotoren als Onkogen diente. Dort wurde in der überwiegenden Zahl der Fälle ein neuroendokriner Phänotyp der Tumoren beschrieben. Je nach Promotor traten diese Tumoren in

Hypophyse und Schilddrüse¹⁸, in Pankreas und Colon⁷⁴, im Magen¹²⁸ oder in der Prostata^{36,53,60,82,97} auf. In selteneren Fällen resultierten nicht-neuroendokrine Phänotypen, darunter ein Tumor vergleichbar dem duktalem Carcinoma in situ (DCIS) der Brustdrüse⁴⁰, ein Tumor der β -Zellen des Pankreas⁴⁵ oder ein Adenokarzinom der Lunge¹⁴⁸.

Die Cluster-Darstellung in Form einer Hauptkomponentenanalyse lässt den Schluss zu, dass sich die Genexpression in den Tumorgeweben aus transgenen Mäusen mit höherem Alter deutlich von den anderen Gruppen von Gewebeproben unterscheidet. Eine ähnliche Expression zeigt eine aus dem Tumor der Tiere etablierte Tumorzelllinie. Dieser Befund resultiert wahrscheinlich auch aus einer veränderten Zellzusammensetzung: die Tumorzellen verdrängen in den untersuchten Geweben die normalen Zellen, damit überlagert die Genexpression der Tumorzellen die der anderen Zellen.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen zeigten darüber hinaus, dass in den Tumorgeweben Cholezystokinin (Cck) und Gastrin releasing peptide (Grp) hoch exprimiert sind. Grp wird in neuroendokrinen Zellen⁸¹, vor allem aber in vagalen peptidergen Neuronen¹¹⁶ exprimiert, Cck von neuroendokrinen ECL-Zellen^{30,71} und endokrinen I-Zellen der Dünndarmmucosa¹⁰⁴. Zudem sind unter den im Tumorgewebe stark hochregulierten Genen vor allem solche mit Bezug zu sekretorischer Funktion häufig vertreten, so zum Beispiel Secretin (Sct), Secretogranin II (Sct2) und Glucagon (Gcg). Auch Gene, welche typisch für neuroendokrine Zellen sind, sind hochreguliert, so zum Beispiel Chromogranin A (Cga). Zusammen weisen diese Befunde darauf hin, dass die Tumorzellen im untersuchten Tiermodell einen neuroendokrinen Phänotyp haben.

Die hohe Expression von Glucagon (Gcg) weist auch insofern auf einen neuroendokrinen Phänotyp hin, als dass im Kulturmedium, das von Barker et. al. zur Differenzierung von Stammzellen zu Zellen der sekretorischen Zellreihe des Magens verwendet wird, Exendin 4 enthalten ist¹³. Dies ist ein Analogon des Glucagon-like peptide-1 (Glp1), welches sich zusammen mit Glucagon (Gcg) auf mRNA-Ebene aus dem (Prä-) Proglucagon ableitet¹²². Da durch die in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptom-Analysen nicht eindeutig entscheidbar ist, ob die gefundene hohe mRNA-Expression auf Proteinebene zu Glucagon oder einem anderen vom Proglucagon abgeleiteten Peptid wie Glp1 führt, könnte hier ein weiterer Faktor vorliegen, der die Richtung der Differenzierung der Tumorzellen bestimmt.

Bemerkenswert ist auch, dass in den untersuchten Gewebeproben sowohl die oben genannten Hormone Cck und Grp als auch ihre Rezeptoren hoch exprimiert sind. Damit

ist möglicherweise ein Rückkopplungseffekt gefunden, der das Tumorwachstum zusätzlich treibt. Solche Effekte wurden schon an anderen Tumoren beschrieben^{72,108}. Unabhängig davon bewirken sowohl Cck als auch Grp Effekte, etwa im Bereich der Angiogenese, die ein Tumorwachstum begünstigen können^{78,81}.

Bei einem neuroendokrinen Phänotyp der Tumorzellen ist ihre Stammzelle die gemeinsame Stammzelle des Magen-Darm-Traktes. Aus dieser differenzieren sich sowohl die Zellen der absorptiven Reihe, zu denen die Enterozyten gehören, wie auch die der sekretorischen Reihe, zu denen die neuroendokrinen Zellen gehören¹³⁴. Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor Lgr5 ist der kürzlich beschriebene Marker für die gemeinsame intestinale Stammzelle^{12,13,14,134}. In den Genexpressionsprofilen aus dem Tumorgewebe kann die Expression von Lgr5 nicht nachgewiesen werden. Das weist darauf hin, dass es sich trotz des starken Wnt-Signals (siehe oben) bei den Tumorzellen nicht vorwiegend um Stammzellen handeln kann. Die Transformation zu Tumorzellen muss somit im Verlauf der Differenzierung zu neuroendokrinen Zellen erfolgen. Ebenso erscheint es unwahrscheinlich, dass Wnt die Tumorzellen selbst reguliert, da auch dann eine Expression des Wnt-Zielgens Lgr5 zu erwarten wäre. Aus welchem Grund also die Wnt-Kaskade hochreguliert ist und ob und gegebenenfalls wie sie die Tumorentwicklung beeinflusst kann somit hier nicht abschließend geklärt werden.

Der somit an diesem Modell nachgewiesene neuroendokrine Phänotyp steht, wie schon weiter oben ausgeführt, im Einklang mit zahlreichen weiteren Tumormodellen aus der Literatur, bei dem das SV 40 large T-Antigen als Onkogen verwendet wurde. Damit wurde auch eine Annahme von Syder et. al. aus dem Jahr 2004 bestätigt. Diese hatten auf der Grundlage der Ergebnisse bei der Untersuchung eines Magentumors in Atp4b/SV 40 large T-Antigen – transgenen Mäusen vermutet, dass der dort gefundene neuroendokrine Phänotyp auch in ähnlichen Tiermodellen zu finden sein müsste¹²⁸.

Ungeklärt ist noch die Frage nach den Ursprungszellen des Tumors. Einen Überblick über mögliche Kandidaten bietet Tabelle 4-2 auf der nächsten Seite. Wie aus der Tabelle erkennbar, gibt es mit den Charakteristika Cck2-Rezeptor und Chromogranin A-Sekretion mehrere Zellen, die als Ursprungszellen des Tumors in Frage kommen. Darunter sind die ECL-Zellen der Fundusdrüsen (Tabelle 4-2, *kursiv*) jedoch unwahrscheinlich, weil die Expression der Histidin-Decarboxylase im untersuchten Tumorgewebe nicht nachgewiesen werden konnte. Möglich erscheinen noch Vorläuferzellen, welche den Cck2-Rezeptor tragen, (Tabelle 4-2, *kursiv*). Dagegen spricht aller-

dings die Annahme eines verhältnismäßig differenzierten Zelltyps als Ursprung der Tumorzellen, wie oben beschrieben.

Die wahrscheinlichsten Ursprungszellen des Tumors in diesem Tiermodell sind nach den vorliegenden Daten somit differenzierte, Chromogranin A-sezernierende neuroendokrine Zellen (Tabelle 4-2, **fett**), wie sie von Schmitz et. al. in der Schleimhaut des Antrums nachgewiesen werden konnten¹¹². Dies ist auch mit der oben geäußerten Annahme vereinbar, dass die Transformation zur Tumorzelle im Verlauf der Differenzierung zur neuroendokrinen Zelle erfolgt.

Tabelle 4-2: Auswahl von Zellen in Magen und Dünndarm^{30,57,71,104,112,115,116,129,154}

Name	Vorkommen	Auswahl Rezeptoren (in Klammern: hauptsächlich Ligand)	Sekretionsprodukte
Becherzelle	Fundusdrüsen	Cck1r (Cholecystokinin)	Schleim
Hauptzelle	Fundusdrüsen	Cck1r (Cholecystokinin)	Pepsinogen
Belegzelle	Fundusdrüsen	Cck2r (Gastrin)	H ⁺ , Intrinsic factor
		Sst2 (Somatostatin)	
		M3 (Acetylcholin)	
		H2 (Histamin)	
* ECL-Zelle	Fundusdrüsen	Cck2r (Gastrin)	Histamin, Chromogranine
		Sst2 (Somatostatin)	
		M3 (Acetylcholin)	
* EC-Zelle	Fundus- und	M3 (Acetylcholin)	Serotonin, Neuropeptide
* D-Zelle	Fundus- und Pylorusdrüsen	Cck1r (Cholecystokinin)	Somatostatin; Amylin
		M2, M4 (Acetylcholin)	
		H3 (Histamin)	
* neuroendokrine	Antrumschleimhaut	Cck2r (Gastrin)	Chromogranin A
† G-Zelle	Pylorusdrüsen	Bb2 (Gastrin releasing peptide)	Gastrin
† I-Zelle	Dünndarmmucosa		Cholecystokinin
<i>Vorläuferzellen können Cck1r oder Cck2r oder beide aufweisen</i>			

* = neuroendokrine, † = endokrine Zelle

Dabei bleibt noch die Frage, warum Nöckel et. al.⁹⁰ zu einem anderen Ergebnis bezüglich des Phänotyps der Tumorzellen in diesem Tiermodell kommen. Die Klassifikation als Adenokarzinom wurde durch das Ergebnis immunhistochemischer Studien und einer Expressionsanalyse der epithelialen Marker EpCAM und CEACAM1 an aus dem Tier-

modell gewonnenen Tumorzellen in Zellkultur vorgenommen. Es ist zu beachten, dass die in der vorliegenden Dissertation präsentierten Daten eine Analyse der gesamten transkribierten RNA von Gewebeproben direkt aus dem Tumorgewebe darstellt und somit ein durchaus breiteres Bild der Genexpression und damit des Phänotyps der Zellen im untersuchten Gewebe ermöglicht. Dies spricht für die hier geäußerten Schlussfolgerungen, die sich zudem in Übereinstimmung zu Beispielen von anderen Tiermodellen mit dem SV 40 large T-Antigen als Onkogen befinden, die aus der Literatur bekannt sind.

Die Tatsache, dass es sich hier um einen neuroendokrinen Tumor handelt, erklärt auch, warum die mit RT-PCR untersuchten Signalwege, die typisch für Magenzellen sind, bei der Tumorentstehung in diesem Modell keine Rolle spielen. Entgegen der Annahmen zu Beginn der vorliegenden Arbeit ist das hier untersuchte Tiermodell auch nicht geeignet, um Schlüsse zum Magenkarzinom zu ziehen. Es stellt jedoch ein stabiles Modell zur SV 40 large T-Antigen – induzierten Mutagenese dar. Inwieweit darüber hinaus allgemeine Fragestellungen zu neuroendokrinen Tumoren an diesem Modell untersucht werden können, sollte unbedingt Gegenstand weiterführender Untersuchungen werden.

4.6 Weiterführende Ansätze

Bei der weiteren Charakterisierung des CEA424/SV 40 large T-Antigen – Tiermodells sind verschiedene Ansätze denkbar, wie sie schon im Laufe der Anfertigung dieser Arbeit erkennbar waren:

So sollte anhand von immunhistochemischen Studien an den Geweben aus den Tumoren der transgenen Tiere der Cck2-Rezeptor an der Oberfläche der Tumorzellen nachgewiesen werden. Dies würde eine der Kernaussagen dieser Arbeit weiter belegen.

Durch den Einsatz von Mikrodissektion in Verbindung mit Mikroarray-Analysen könnte die Genexpression der Tumorzellen noch differenzierter und im Vergleich zum umgebenden Gewebe betrachtet werden. Auch ist die Mikroarray-Technologie ein Gebiet, auf dem in naher Zukunft noch große Fortschritte zu erwarten sind, insbesondere bei der Formulierung von Standards bei der Auswertung. Aber auch durch noch exaktere Definitionen von Genen oder leistungsfähigerer Analysesoftware wären Verbesserungen denkbar.

ChIP-chip^{23,152} wäre zudem eine Methode, die am Modell der CEA424/large T-Antigen – transgenen Mäuse eine Lücke im bisherigen Wissensstand schließen könnte. Von einer Untersuchung der Regulation des Promotors CEA424 könnte so abgeleitet werden, über welche intrazellulären Differenzierungsfaktoren die organspezifische Tumorentwicklung im Antrum zustande kommt. Diese Einsichten könnten besonders auch für das bessere Verständnis von CEA-exprimierenden Tumoren interessant sein.

Ein großer Vorteil des in dieser Arbeit untersuchten Tiermodells ist auch, dass eine Zelllinie vorliegt, die wie in dieser Arbeit gezeigt, das gleiche Expressionsmuster wie der Tumor der transgenen Tiere hat. Die Kombination dieser beiden potentiellen Untersuchungsgegenstände macht weitere Fragestellungen, insbesondere zur Regulation möglich. Schließlich kann an der seit kurzem zur Verfügung stehenden Möglichkeit der Kultur der gemeinsamen intestinalen Stammzelle, wie sie von Barker et. al. beschrieben wurde¹³, die hier geäußerte Hypothese zur Entwicklung der Tumorzellen aus diesen Stammzellen überprüft werden.

Zusammenfassung

Krebserkrankungen sind für betroffene Menschen eine große Belastung und für moderne Gesundheitssysteme ein wesentlicher Kostenfaktor. Nach dem aktuellen Stand der Forschung entstehen Tumoren durch Fehlregulation von Proliferation und Differenzierung einzelner Zellen. Dies kann in Tiermodellen nachgebildet werden. Eine besonders hohe Aussagekraft haben dabei Tiermodelle, bei denen spontan ein autochthoner Tumor entsteht. Ein solcher Tumor kann durch Verwendung eines hybriden Onkogens aus einem organspezifischen Promotor und einem bekannten Onkogen hervorgerufen werden. Ein Beispiel hierfür sind CEA424/SV 40 large T-Antigen – transgene Mäuse, sie entwickeln reproduzierbar einen Tumor im Antrum des Magens.

Durch Untersuchungen an diesem Tiermodell sollte die organspezifische Expression des Tumors geklärt werden. Hypothesen hierzu waren einerseits, dass die organspezifische Entwicklung dieser Tumoren ein Effekt der Integration ist, andererseits, dass im betroffenen Organ spezifische Stimulatoren ursächlich sind. Zudem sollte auf der Grundlage von Genexpressionsdaten die Ursprungszelle der Tumoren identifiziert werden.

Hierzu wurde zunächst mit Walking-PCR die Integrationsstelle identifiziert. Darüber hinaus wurde mit RT-PCR gezielt die Expression von Genen untersucht, welche an der Regulation von Proliferation und Differenzierung des Magens beteiligt sind. Mikroarray-Analysen und ihre Auswertung mit verschiedenen Computerprogrammen dienten darüber hinaus zur Erstellung von Genexpressionsprofilen zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorentwicklung.

Das Transgen wurde auf dem Chromosom 4 der transgenen Mäuse lokalisiert. Ein Einfluss der Integrationsstelle auf die organspezifische Tumorentstehung konnte dabei nicht gesehen werden. Die Genexpressionsanalyse ergab, dass im Verlauf der Tumorentwicklung die Wnt-Signalkaskade hochreguliert ist. Dieser Signalweg ist als wichtiger Stimulator der Proliferation vor allem in Stammzellmilieus des Gastrointestinaltraktes bekannt. Weiterhin zeigte sich für die Differenzierungsfaktoren *Ihh*, *Notch1* und *Pdx1* sowie für das Hormon Gastrin mit fortschreitender Tumorentwicklung eine verminderte Expression, was auf einen Verlust der Differenzierung im Tumorgewebe schließen lässt.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen belegen auch, dass der hier untersuchte Tumor einen neuroendokrinen Phänotyp aufweist. Dies steht im Gegensatz zu ur-

sprünglichen Annahmen, die sich auf eine frühere Studie zu diesem Modell stützen. Unter Berücksichtigung der bekannten Literatur zu Tiermodellen mit dem SV 40 large T-Antigen als Onkogen ist ein neuroendokriner Phänotyp jedoch schlüssig.

Gezeigt wurde im Rahmen dieser Arbeit zuletzt auch, dass Tumorzellen den Gastrin-Rezeptor Cck2r überexprimieren. Zusammen mit den aus der Mikroarray-Analyse gewonnenen Genexpressionsprofilen wurde dadurch eine neuroendokrine Cck2r-positive Zellpopulation der Antrumukosa als Tumorzelle identifiziert. Die Transformation zur Tumorzelle muss dabei in einem fortgeschrittenen Stadium der Differenzierung erfolgen, da Lgr5, der Marker für die gemeinsamen Stammzellen des Gastrointestinaltraktes, im Tumorgewebe nicht nachweisbar ist. Als Induktor für die organspezifische Tumorentwicklung kommt Gastrin in Frage, da dieses Hormon im Antrum des Magens typischerweise stark exprimiert wird und insbesondere da die Tumorzellen wahrscheinlich den Gastrin-Rezeptor Cck2r exprimieren. Vorläufige Ergebnisse aus einem Reporter-Assay zeigen zudem, dass in einer Kultur der Tumorzelle Pentagastrin die Expression des SV 40 large T-Antigens stimuliert.

Anhand weiterführender Untersuchungen sollten diese Hypothesen geprüft werden. Besonders immunhistochemische Rezeptoranalysen, Reporterassays oder die Differenzierung transgener gastrointestinaler Stammzellen in Kultur können dabei von großem Nutzen sein.

Anhang 1: Material

Geräte und Laborausstattung

- Geldokumentationssystem: UV-Tisch Gel Doc 1000 (integrierte Kamera), Software Molecular Analyst 1.5, Firma Bio-Rad, 80939 München
- Elektrophoresekammern: Firma MWG-Biotech, 85560 Ebersberg
- Homogenisator: DIAX 900, Firma Heidolph Instruments, 91126 Schwabach
- Inkubationen: DNA Thermal Cycler 480, Firma PerkinElmer, 63110 Rodgau-Jügesheim
- Parafilm: American Can Company, Greenwich, Connecticut 06830, USA
- Photometer: BioPhotometer, Firma Eppendorf, 22331 Hamburg
- Reaktionsgefäße: 1,5 ml Biosphere Micro Tube, Firma Sarstedt, 51582 Nümbrecht; für PCR 0,5 ml PCR SoftTube, Firma BioZym Scientific, 31833 Hessisch Oldendorf
- Spannungsquelle für Agarose-Gelelektrophorese: PowerSupply PPS 200-1D, Firma MWG-Biotech, 85560 Ebersberg
- Thermozykler für PCR: RoboCycler Gradient 40 Temperature Cycler, Firma Stratagene, 1101 CB Amsterdam Zuidooost, Niederlande
- Gefäße: 2,0 ml TwistTop skirted vials, Firma Sorenson Bioscience, Salt Lake City, Utah 84107, USA
- Zentrifuge: Centrifuge 5415 R, Firma Eppendorf, 22339 Hamburg
- Mikroskop: Axioskop 40, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 81379 München

Chemikalien und Substrate

- Bovines Serum Albumin BSA: Firma New England Biolabs, 65926 Frankfurt am Main
 - destilliertes Wasser/dH₂O (RNasefrei): Aqua ad iniectabilia Braun, Firma B. Braun Melsungen, 34209 Melsungen
-

-
- Ladepuffer für Agarosegele: Verdünnung von 6x Loading Dye Solution (Firma Fermentas, 68789 St. Leon-Rot) mit Glycerol im Verhältnis 1:3
 - RNAlater: Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen
 - RNase away: RNase Free Denaturing Agent, Firma Continental Laboratory Products, Northampton NN3 9HG, GB
 - 5x First-Strand-Puffer (Firma Invitrogen, 76131 Karlsruhe)
 - 10x NH₄ Puffer (Firma PAN-Biotech, 94501 Aidenbach)
 - 50 mM MgCl₂ Puffer (Firma PAN-Biotech, 94501 Aidenbach)

Enzyme

- Restriktionsenzyme (mit spezifischem Puffer): Firma New England Biolabs, 65926 Frankfurt am Main
- M-MLV Reverse Transkriptase 200 U/μl (Firma Invitrogen, 76131 Karlsruhe)
- PANscript Polymerase 5 U/μl (Firma PAN-Biotech, 94501 Aidenbach)
- RNase-Inhibitor 30 U/μl (Firma Eppendorf, 22339 Hamburg)

Kitsysteme

- DNA Walking SpeedUp Premix Kit: Firma Seegene, Rockville, Maryland 20850, USA
- NucleoSpin RNA II Kit: Firma Macherey-Nagel, 52355 Düren
- NucleoSpin Extrakt II Kit: Firma Macherey-Nagel, 52355 Düren

Antikörper

SV 40 large T-Antigen: SV40 T Ag (v-300), Nr. SC-20800, Santa Cruz Biotechnology, Inc., 69115 Heidelberg

Oligonukleotide

- dNTP-Mix je 10 mM: Verdünnung von je 10 µl 100 mM dATP-, dTTP-, dCTP- und dGTP-Lösung (Firma Eppendorf, 22339 Hamburg) mit 60 µl dH₂O
- 1,0 µl Oligo p(dT)₁₅-Primer 45 µM (Firma Roche Diagnostics, 68305 Mannheim),
- Größenmarkierungen auf Agarosegelen (Marker):
 - a) GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder,
 - b) GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder und
 - c) MassRuler™ Express LR Forward DNA Ladder; alle Firma Fermentas, 68789 St. Leon-Rot (siehe Abbildung A - 1).

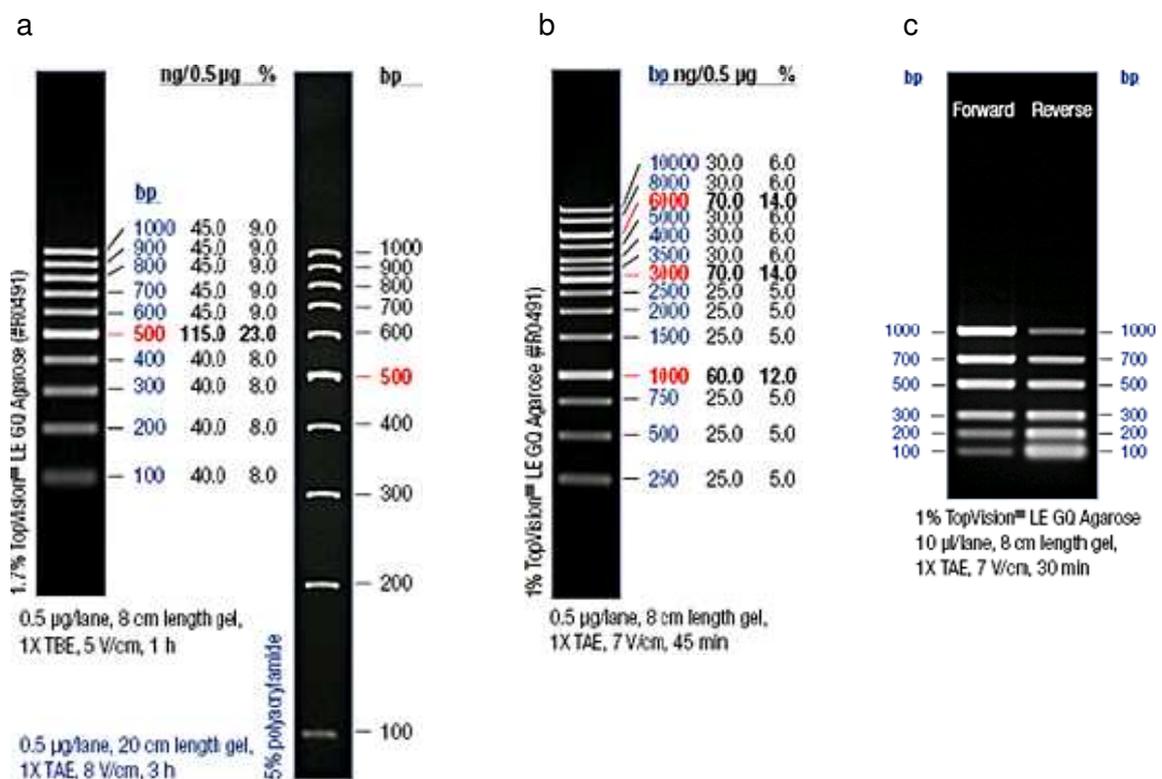


Abbildung A - 1: Größenmarkierungen auf Agarosegelen (Marker)

- a: GeneRuler™ 100 bp
b: GeneRuler™ 1 kb;
c: MassRuler™ Express LR Forward DNA Ladder

- PCR-Primer: Firma MWG-Biotech, 85560 Ebersberg (100 µM Stocklösungen, Verdünnung mit dH₂O auf eine Konzentration von 20 µM) – für eine Übersicht der verwendeten Primer siehe Tabelle A - 1 und Tabelle A - 2.

Tabelle A - 1: verwendete Primer für murine Gene:

murines Gen	RefSeq Zuordnungsnummer ¹⁰¹	laborinterne Nummer*	Sequenz	Amplikon [bp]	T _m † [°C]	PCR – Zyklen
Cck2-Rezeptor	NM_007627.1	P 578-f	5' – GAG CGA TAC AGC GCC ATC TG –3'	253	62,0	25 – 30
		P 579-r	5' – CCA TAA CCA GCG CCG GGA TG –3'			
Dhh	NM_007857.1	P 554-f	5' – GTA CGC CTA CGT GTG ACT GA –3'	510	62,0	35 – 40
		P 555-r	5' – GAA CAC CGG TGC AAA GTC AC –3'			
Dll1	NM_007865.1	P 572-f	5' – CAA GAA CGG AGC GAG CTG CA –3'	320	62,0	30 – 35
		P 573-r	5' – CAT TGT CCT CGC AGT ACC TC –3'			
Egf-Rezeptor	NM_007912.1	P 582-f	5' – CAC CTG TGT GAA GAA GTG CC –3'	470	58,0	25 – 30
		P 583-r	5' – TGA TGT TCA GGC CAA CGA CC –3'			
Fzd5	NM_022721.1	P 558-f	5' – GTG GTC TGT GCT GTG CTT CAT –3'	370	60,0	30 – 35
		P 559-r	5' – GGC AGC AAG GTG GAA GTA CTG –3'			

* f: Vorwärtsprimer; r: Rückwärtsprimer (Sequenz komplementär zur kodierenden Gensequenz)

† primerspezifische Annealingtemperatur T_m für diese Primerkombination (in Vorversuchen optimiert).

murines Gen	RefSeq Zuordnungs- Nummer	laborinterne Nummer	Sequenz	Amplikon [bp]	T_m [°C]	PCR – Zyklen
Gastrin	NM_010257.1	P 584-f	5' – CTG GCT CTA GCT ACC TTC TC –3'	204	56,0	25 – 30
		P 585-r	5' – CAT TCG TGG CCT CTC CTT CT –3'			
GAP-DH	M32599.1	P 282-f	5' – TGC CAT TTG CAG TGG CAA AGT GG –3'	438	60,0	18 – 23
		P 283-r	5' – TTG TCA TGG ATG ACC TTG GCC AGG –3'			
Gli1	NM_010296.1	P 556-f	5' – CCA GCA GCA TGA GCT CTG CT –3'	490	62,0	30 – 35
		P 557-r	5' – CCA ACC TCT GGA TCC TCC TG –3'			
Hes1	NM_008235.1	P 576-f	5' – CAG CCA GTG TCA ACA CGA CAC –3'	278	60,0	30 – 35
		P 577-r	5' – GTA TTT CCC CAA CAC GCT CG –3'			
Hgf-R (Met)	NM_008591.1	P 580-f	5' – GAC TCC CAT CCT GTA TCT CC –3'	420	58,0	25 – 30
		P 581-r	5' – CGT ATT TGT CGT GCT CTC GC –3'			
Ihh	NM_010544.1	P 552-f	5' – GGC GCT ACG AAG GCA AGA TC –3'	460	62,0	25 – 30
		P 553-r	5' – ACA CGC TCC CCG TTC TCT AG –3'			
Lef1	NM_010703.1	P 560-f	5' – CAC AAC TGG CAT CCC TCA TC –3'	238	58,0	35 – 40
		P 561-r	5' – CAG GAT CTG GTT GAT AGC TGC –3'			
Math1 (Atoh1)	NM_007500.1	P 574-f	5' – GTA GTG GAC GAG CTT GGC TGC –3'	260	62,0	30 – 35
		P 575-r	5' – CTC TCC GAC ATT GGG AGT CTG –3'			

murines Gen	RefSeq Zuordnungs- Nummer	laborinterne Nummer	Sequenz	Amplikon [bp]	T _m [°C]	PCR – Zyklen
Notch1	NM_008714.1	P 570-f	5' – CAG GCT ACA CAG GAA GCA TG –3'	490	62,0	30 – 35
		P 571-r	5' – GCC AAC AAC AAC TCA CAC GT –3'			
Pdx1 (Ipft1)	NM_008814.1	P 562-f	5' – CAC AGC TCT ACA AGG ACC CG –3'	461	62,0	25 – 30
		P 563-r	5' – CTT CTC CAG CTC CAG CAG CT –3'			
Pkd1	Z34524.1	P 628-f	5' – CAG AGC CCC AGC TTT CTG TG –3'	340	62,0	30 – 35
		P 629-r	5' – GAG CTG AAT CGG CCG TCC GA –3'			
Shh	NM_009170.1	P 550-f	5' – GTG AAG CTG CGA GTG ACC GA –3'	560	62,0	35 – 40
		P 551-r	5' – CGT TCA GCC ACC ACG TAC AC –3'			
Tcf4	NM_013685.1	P 564-f	5' – GCT CTG AGA GGC AGC CAT TC –3'	360	62,0	25 – 30
		P 565-r	5' – CAG GCG CTC ACG GGC ATT AT –3'			
Wnt5a	XM_192763.1	P 568-f	5' – CAT CGG AGA TGG AAC TGC AG –3'	240	60,0	35 – 40
		P 569-r	5' – GCC ATA GTC GAT GTT GTC TCC –3'			

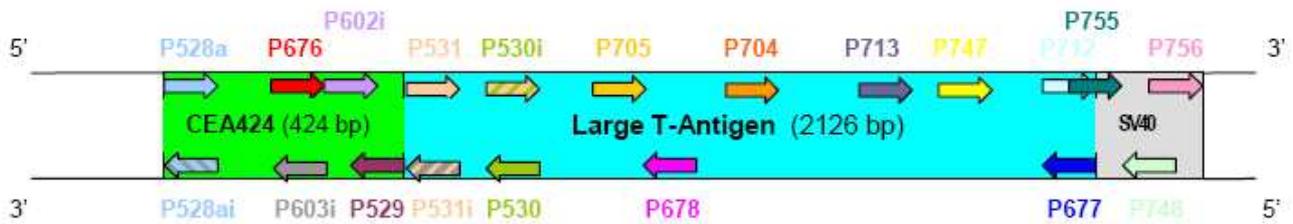


Abbildung A - 2: CEA424SV 40 /large T-Antigen - Transgen mit Position von Primern

(B. Lorenz, Labor Prof. Enders)

Tabelle A - 2: verwendete Primer im CEA424SV 40 /large T-Antigen - Transgen

laborinterne Nummer	Sequenz	T _m [*] [°C]
P 528 a	5' - GGA GAG CAT GGG GAG ACC CG -3'	65,5
P 528 ai [†]	5' - CGG GTC TCC CCA TGC TCT CC -3'	65,5
P 529 [†]	5' - CTC CAT GGT CTC TGC TGT CTG -3'	61,8
P 530 [†]	5' - AAT TCT GAA GGA AAG TCC TTG G -3'	56,5
P 530i	5' - CAA GGA CTT TCC TTC AGA ATT -3'	54,0
P 531	5' - TAA TGG ACC TTC TAG GTC TTG A -3'	56,5
P 531i [†]	5' - TCA AGA CCT AGA AGG TCC ATT A -3'	56,5
P 602i	5' - GCA GAG GGA GGA AGG ACA GCA G -3'	65,8
P 603i [†]	5' - CTC AGC ATC ACG TGG GTC ATG G -3'	64,0
P 676	5' - GAC CAC ACC CAT GAC CCA CG -3'	63,5
P 677 [†]	5' - CAT GTT CAG GGG GAG GTG TGG -3'	65,7
P 678 [†]	5' - GGT ACT TAT AGT GGC TGG GCT G -3'	62,1
P 704	5' - GCT GGA GTT GCT TGG CTA CAC TG -3'	64,2
P 705	5' - CAG GTG GGT TAA AGG AGC ATG A -3'	60,3
P 712	5' - CCA CAC CTC CCC CTG AAC CTG -3'	65,7
P 713	5' - CAG AGC AGA ATT GTG GAG TGG A -3'	60,3
P 747	5' - GAA CAT GGA AGA CTC AGG GCA TG -3'	62,4
P 748 [†]	5' - ATT TGT GAT GCT ATT GCT TTA TTT G -3'	54,8
P 755	5' - CCC TGA ACC TGA TTC ATA AAA TGA ATG C -3'	62,2

* Annealingtemperatur laut Herstellerangabe (Fa. MWG biotech, 85560 Ebersberg)

[†] Rückwärtsprimer (Sequenz komplementär zur kodierenden Gensequenz)

Anhang 2: ergänzende Daten

Lokalisation des Transgens

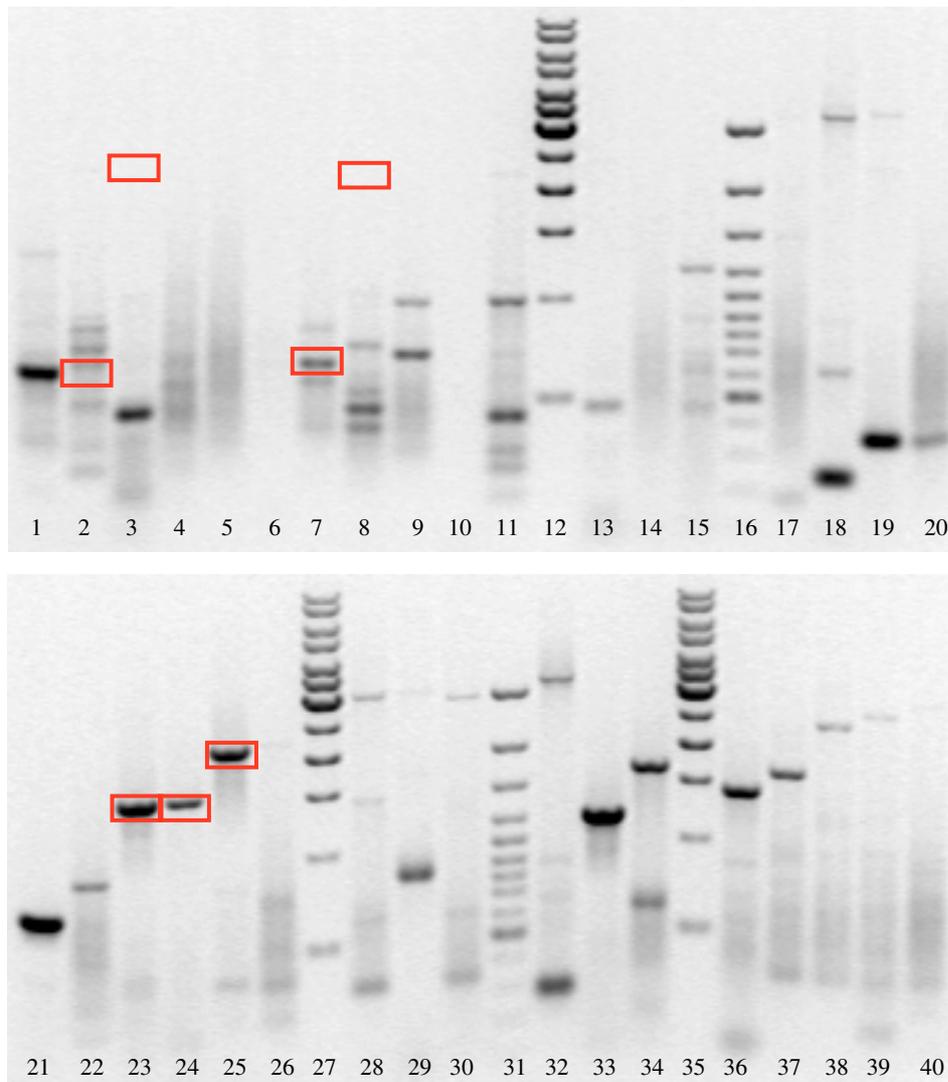


Abbildung A - 3: Elektrophoresegele zur Anordnung des Transgens

Beschriftung:

12, 27, 35: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder; 16, 31: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder; 2: nur P 603i (erwartete Fragmentgröße ca. 600bp); 3: P 530 (ca. 2400bp); 7: P 747 (ca. 700bp); 8: P 704 (ca. 2300bp); 23: P 747 & P 530 (ca. 1600bp); 24: P 705 & P 528ai (ca. 1600bp); 25: P 530i & 603i (ca. 2200bp);

: erwarteten Lage eines Fragments (2, 3, 7, 8: bei mehrfacher inverser Integration; 23, 24, 25: bei mehrfacher gleichsinniger Integration).

Banden in Abbildung 3-7b auf Seite 34: hier Nummer 23 (= 3-7b 3), 24 (= 3-7b 2), 25 (= 3-7b 1)

Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Angegeben ist jeweils der Quotient des Expressionswertes des Gens durch den Expressionswert von GAP-DH im jeweiligen Gewebe.

Tabelle A - 3: SV 40 large T-Antigen, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle	30	60	90
Mittelwert	0,000	0,000	0,059	0,086
Standardfehler	0,000	0,000	0,050	0,027
Anzahl	6	9	8	20

Tabelle A - 4: Wnt 5a, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	1,409	0,800	0,592	0,765	0,619	0,781	0,794	0,702
Standardfehler	0,471	0,730	0,158	0,077	0,135	0,269	0,221	0,267
Anzahl	5	1	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 5: Fzd 5, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	1,192	1,319	0,958	0,758	0,730	1,016	1,481	1,183
Standardfehler	0,394	0,693	0,263	0,102	0,234	0,251	0,135	0,243
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 6: *Lef 1*, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	0,749	0,994	0,628	0,582	0,419	0,600	0,702	0,733
Standardfehler	0,164	0,023	0,093	0,067	0,138	0,075	0,092	0,087
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 7: *Tcf 4*, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	1,972	2,509	1,620	1,277	1,310	1,538	2,014	2,391
Standardfehler	0,561	0,509	0,458	0,214	0,213	0,129	0,272	0,364
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 8: *Shh*, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	0,076	0,138	0,180	0,158	0,041	0,083	0,106	0,150
Standardfehler	0,051	0,015	0,083	0,069	0,013	0,050	0,046	0,086
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 9: Dhh, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	0,033	0,176	0,067	0,047	0,032	0,116	0,034	0,021
Standardfehler	0,016	0,018	0,025	0,010	0,015	0,069	0,012	0,008
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 10: Ihh, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Mittelwert	1,112		1,152		0,945		0,572	
Standardfehler	0,294		0,161		0,129		0,076	
Anzahl	6		9		8		20	

Tabelle A - 11: Gli 1, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	1,657	0,990	1,369	1,333	0,955	1,263	1,635	1,152
Standardfehler	0,481	0,930	0,189	0,161	0,121	0,202	0,226	0,235
Anzahl	4	2	5	4	4	4	12	7

Tabelle A - 12: Dll 1, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	1,087	1,359	1,287	0,986	0,764	0,889	1,253	1,288
Standardfehler	0,221	0,218	0,413	0,110	0,193	0,311	0,140	0,288
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 13: Notch 1, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	0,839	0,814	0,821	1,091	0,534	0,448	0,764	0,230
Standardfehler	0,481	0,814	0,152	0,324	0,275	0,334	0,158	0,202
Anzahl	4	2	5	4	4	4	12	7

Tabelle A - 14: Egf-Rezeptor, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	0,842	0,951	1,073	1,218	0,836	1,035	0,974	0,708
Standardfehler	0,190	0,545	0,099	0,166	0,078	0,236	0,106	0,171
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 15: Hgf-Rezeptor, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	0,770	0,862	1,267	1,165	0,637	0,859	0,909	0,972
Standardfehler	0,091	0,350	0,235	0,180	0,162	0,099	0,103	0,153
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 16: Pkd 1, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	0,854	1,313	1,364	0,818	0,812	0,769	1,307	1,104
Standardfehler	0,180	0,262	0,605	0,110	0,065	0,085	0,158	0,250
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 17: Hes 1, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	1,737	2,081	1,158	1,076	1,187	1,385	1,662	1,343
Standardfehler	0,405	0,154	0,211	0,114	0,223	0,233	0,196	0,229
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 18: Math 1, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	0,126	0,602	0,069	0,353	0,082	0,287	0,354	0,227
Standardfehler	0,056	0,232	0,056	0,164	0,052	0,157	0,186	0,076
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 19: Pdx 1, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	0,717	1,245	0,652	0,932	0,238	1,100	0,412	0,125
Standardfehler	0,284	0,329	0,234	0,250	0,135	0,435	0,202	0,125
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 20: Gastrin, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle		30		60		90	
Lokalisation	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum	Magen Corpus	Magen Antrum
Mittelwert	1,083	3,024	1,002	1,313	1,169	1,560	0,631	1,049
Standardfehler	0,402	0,772	0,313	0,442	0,378	0,555	0,223	0,359
Anzahl	4	2	5	4	4	4	13	7

Tabelle A - 21: Cck2-Rezeptor, Originaldaten der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Alter [d]	Kontrolle	30	60	90
Mittelwert	0,411	0,702	0,631	1,045
Standardfehler	0,120	0,081	0,098	0,134
Anzahl	6	9	8	20

Mikroarray-Daten

Tabelle A - 22: Liste der 100 am stärksten deregulierten Gene (die 50 am stärksten hochregulierten, und die 50 am stärksten herunterregulierten);

RefSeq: RefSeq- Zuordnungsnummer¹⁰¹

f: Beschreibung der Funktion des Genproduktes nach Gene Ontology¹⁰ (falls vorhanden; ggf. Oberbegriff) – Abkürzungen **ha**=Hormonaktivität, **ca**=Enzym, **era**=Regulation enzymatischer Reaktionen, **b**=Bindung, **tfa**=Aktivität als Transkriptionsfaktor, **sta**=Signaltransduktion, **sma**=Strukturmolekül, **tr**=Transport; **ATP**=ATPase;

p: Beschreibung eines Prozesses, an denen das Genprodukt beteiligt ist, nach Gene Ontology (falls vorhanden; ggf. Oberbegriff) – Abkürzungen **inf**=Entzündungsreaktion, **br**=Regulation, **st**=Signaltransduktion, **npc**=negative Regulation des programmierten Zelltods, **mp**=Metabolismus, **trans**=Transkription, **cyc**=Zellzyklus, **dp**=Entwicklung, **tr**=Transport, **cp**=anderer zellulärer Prozess, **apt**=Apoptose, **cad**=Zelladhäsion, **res**=Abwehrfunktion;

n: *n*-fache Veränderung der mittleren Expression bei 90 Tage alten transgenen Tieren gegenüber den Kontrollen (Beispiel: die Expression von Sct beträgt bei 90 Tage alten transgenen Tieren das 126,648fache der Expression bei den Kontrollen);

RefSeq	murines Gen	Beschreibung	f	p	n
NM_011328.1	Sct	Mus musculus secretin (Sct), mRNA.	ha		126.648
NM_008100.2	Gcg	Mus musculus glucagon (Gcg), mRNA.	ha	br	110.880
NM_009129.1	Scg2	Mus musculus secretogranin II (Scg2), mRNA.	ca	inf	105.234
NM_177981.1	Hap1	Mus musculus huntingtin-associated protein 1 (Hap1), transcript variant 1, mRNA.			39.327
AK010966	2510015F01Rik	Nicht verfügbar			37.894
NM_009162.2	Sgne1	Mus musculus secretory granule neuroendocrine protein 1, 7B2 protein (Sgne1), mRNA.	era	br	28.103
NM_018863.2	Pdyn	Mus musculus prodynorphin (Pdyn), mRNA.	ha	st	28.007
NM_009049.1	Resp18	Mus musculus regulated endocrine-specific protein 18 (Resp18), mRNA.			27.974
NM_011428	Snap25	Mus musculus synaptosomal-associated protein 25 (Snap25), mRNA.	b	br	27.786

RefSeq	murines Gen	Beschreibung	f	p	n
NM_009382.2	Thy1	Mus musculus thymus cell antigen 1, theta (Thy1), mRNA.	era	npc	26.622
NM_178114.2	AI415330	Mus musculus expressed sequence AI415330 (AI415330), mRNA.	b	npc	24.557
NM_007906.2	Eef1a2	Mus musculus eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 (Eef1a2), mRNA.	b	npc	19.698
*NM_016672	Ddc	Mus musculus dopa decarboxylase (Ddc), mRNA.	ca	mp	16.991
NM_009252.1	Serpina3n	Mus musculus serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3N (Serpina3n), mRNA.	era	inf	16.964
NM_007960.1	Etv1	Mus musculus ets variant gene 1 (Etv1), mRNA.	tfa	trans	16.800
NM_025565.1	2600017H08Rik	Mus musculus RIKEN cDNA 2600017H08 gene (2600017H08Rik), mRNA.		cyc	16.325
NM_133195	Brunol4	Mus musculus bruno-like 4, RNA binding protein (Drosophila) (Brunol4), mRNA.	b	dp	15.812
NM_009749	Bex2	Mus musculus brain expressed X-linked 2 (Bex2), mRNA.			15.794
†NM_007693.1	Chga	Mus musculus chromogranin A (Chga), mRNA.	b		15.654
NM_172784.1	Lrp11	Mus musculus low density lipoprotein receptor-related protein 11 (Lrp11), mRNA.	sta	tr	15.503
NM_025893.1	1500031H04Rik	Mus musculus RIKEN cDNA 1500031H04 gene (1500031H04Rik), mRNA.	b		15.186
*NM_016672.1	Ddc	Mus musculus dopa decarboxylase (Ddc), mRNA.	ca	mp	14.589
NM_173016.2	AI427515	Mus musculus expressed sequence AI427515 (AI427515), mRNA.	ca		13.919
NM_178676.2	Entpd3	Mus musculus ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (Entpd3), mRNA.	ca	mp	13.180
NM_009295.1	Stxbp1	Mus musculus syntaxin binding protein 1 (Stxbp1), mRNA.	ca	tr	12.518
NM_198627.1	Gm691	Mus musculus gene model 691, (NCBI) (Gm691), mRNA.			12.353
NM_023850.1	Chst1	Mus musculus carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1 (Chst1), mRNA.	ca	inf	12.024
†NM_007693.1	Chga	Mus musculus chromogranin A (Chga), mRNA.	b		11.836
NM_009305.1	Syp	Mus musculus synaptophysin (Syp), mRNA.	b	tr	11.389
NM_011268.1	Rgs9	Mus musculus regulator of G-protein signaling 9 (Rgs9), mRNA.	sta	st	11.226
NM_013509.2	Eno2	Mus musculus enolase 2, gamma neuronal (Eno2), mRNA.	ca	mp	10.986
NM_008817	Peg3	Mus musculus paternally expressed 3 (Peg3), mRNA.	b	apt	10.617
NM_013892.2	Pcsk1n	Mus musculus proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor (Pcsk1n), mRNA.	ca	mp	10.154
NM_011581.1	Thbs2	Mus musculus thrombospondin 2 (Thbs2), mRNA.	b	cad	9.864
nicht verfügbar	2900075A18Rik	Nicht verfügbar			9.609
NM_013873.3	Sult4a1	Mus musculus sulfotransferase family 4A, member 1 (Sult4a1), mRNA.	ca	mp	9.412
NM_133859.1	Olfml3	Nicht verfügbar			9.267

RefSeq	murines Gen	Beschreibung	f	p	n
NM_178641.3	Inpp5f	Mus musculus inositol polyphosphate-5-phosphatase F (Inpp5f), mRNA.			9.258
NM_145602.1	Ndrp4	<i>Nicht verfügbar</i>		dp	8.970
D78265.1	Mus musculus	Mus musculus mRNA for pancortin-4, complete cds.			8.772
NM_176933	Dusp4	Mus musculus dual specificity phosphatase 4 (Dusp4), mRNA.	ca		8.717
XM_358544.1	LOC381283	Mus musculus hypothetical gene supported by AK083095 (LOC381283), mRNA.			8.408
NM_029823.1	6530401D17Rik	Mus musculus RIKEN cDNA 6530401D17 gene (6530401D17Rik), mRNA.			8.056
NM_026081.3	Gprasp1	<i>Nicht verfügbar</i>	b		8.013
NM_008665.2	Myt1	Mus musculus myelin transcription factor 1 (Myt1), mRNA.	tfa	dp	7.702
AK051573	Ddx26	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26			7.636
NM_029796.2	Lrg1	Mus musculus leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 (Lrg1), mRNA.	ca		7.624
NM_133764.1	0610006O14Rik	Mus musculus RIKEN cDNA 0610006O14 gene (0610006O14Rik), mRNA.	ca	mp	7.624
NM_010330.2	Emb	Mus musculus embigin (Emb), mRNA.			7.616
NM_020026.2	B3galt3	Mus musculus UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 3 (B3galt3), mRNA.	ca	mp	7.263
NM_029727.1	2210006M16Rik	Mus musculus RIKEN cDNA 2210006M16 gene (2210006M16Rik), mRNA.			0.248
AK011069	Hbb-b1	hemoglobin, beta adult major chain			0.246
NM_008998.2	Rab17	Mus musculus RAB17, member RAS oncogene family (Rab17), mRNA.	b	st	0.243
NM_053200.1	Ces3	Mus musculus carboxylesterase 3 (Ces3), mRNA.	ca	mp	0.240
XM_133801.3	Gga2	Mus musculus golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2 (Gga2), mRNA.			0.239
NM_053248	Slc5a5	Mus musculus solute carrier family 5 (sodium iodide symporter), member 5 (Slc5a5), mRNA.	tr	tr	0.231
NM_009964.1	Cryab	Mus musculus crystallin, alpha B (Cryab), mRNA.	sma	st	0.229
<i>nicht verfügbar</i>	2210016H18Rik	<i>Nicht verfügbar</i>			0.223
NM_175249.2	2310020A21Rik	Mus musculus RIKEN cDNA 2310020A21 gene (2310020A21Rik), mRNA.		mp	0.217
XM_129164.2	LOC226017	Mus musculus similar to L-lactate dehydrogenase B chain (LDH-B) (LDH heart subunit) (LDH-H) (LOC226017), mRNA.			0.213
NM_008218.1	Hba-a1	Mus musculus hemoglobin alpha, adult chain 1 (Hba-a1), mRNA.	b	tr	0.212
NM_173370.3	Cds1	Mus musculus CDP-diacylglycerol synthase 1 (Cds1), mRNA.	ca	mp	0.211
NM_009207.1	Slc4a2	Mus musculus solute carrier family 4 (anion exchanger), member 2 (Slc4a2), mRNA.	tr	tr	0.207
NM_011128.1	Pnliprp2	Mus musculus pancreatic lipase-related protein 2 (Pnliprp2), mRNA.	ca	mp	0.206

RefSeq	murines Gen	Beschreibung	f	p	n
AK011016	Hbb-b1	hemoglobin, beta adult major chain			0.202
AK003096	Hbb-b1	hemoglobin, beta adult major chain			0.200
AK002258	Hbb-b1	hemoglobin, beta adult major chain			0.196
AK011053	Hbb-b1	hemoglobin, beta adult major chain			0.196
AK010873	Hbb-b1	hemoglobin, beta adult major chain			0.195
XM_484933	Pcp4l1	<i>Nicht verfügbar</i>			0.194
<i>nicht verfügbar</i>	D630004K10Rik	<i>Nicht verfügbar</i>			0.183
<i>nicht verfügbar</i>	Muc5ac	<i>Nicht verfügbar</i>			0.181
NM_008509.1	Lpl	Mus musculus lipoprotein lipase (Lpl), mRNA.	ca	mp	0.176
NM_025622.1	Lgals2	Mus musculus lectin, galactose-binding, soluble 2 (Lgals2), mRNA.	b		0.176
AK011067	Hbb-b1	hemoglobin, beta adult major chain			0.169
NM_016754.3	Mylpf	Mus musculus myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle (Mylpf), mRNA.	b	cp	0.168
NM_153418.1	U46068	Mus musculus cDNA sequence U46068 (U46068), mRNA.	b		0.165
NM_026713.1	Mogat1	<i>Nicht verfügbar</i>	ca	mp	0.164
NM_008492.2	Ldh2	Mus musculus lactate dehydrogenase 2, B chain (Ldh2), mRNA.	ca	mp	0.154
NM_172205	Sbsn	Mus musculus suprabasin (Sbsn), mRNA.			0.149
NM_178086.2	Fa2h	Mus musculus fatty acid 2-hydroxylase (Fa2h), mRNA.			0.146
AK010993	Hbb-b1	hemoglobin, beta adult major chain			0.144
[‡] NM_018731	Atp4a	Mus musculus ATPase, H ⁺ /K ⁺ transporting, alpha polypeptide (Atp4a), mRNA.	ATP	tr	0.125
NM_009215.1	Sst	Mus musculus somatostatin (Sst), mRNA.		br	0.121
NM_010174.1	Fabp3	Mus musculus fatty acid binding protein 3, muscle and heart (Fabp3), mRNA.	b	mp	0.111
NM_023463.2	Ly6g6c	Mus musculus lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C (Ly6g6c), mRNA.			0.109
NM_008118.2	Gif	Mus musculus gastric intrinsic factor (Gif), mRNA.	b	tr	0.109
NM_172469.1	Clic6	Mus musculus chloride intracellular channel 6 (Clic6), mRNA.	tr	tr	0.105
NM_009724.1	Atp4b	Mus musculus ATPase, H ⁺ /K ⁺ transporting, beta polypeptide, gastric specific (Atp4b), mRNA.	ATP	tr	0.095
NM_009692.1	Apoa1	Mus musculus apolipoprotein A-I (Apoa1), mRNA.	b	mp	0.094
NM_009944.2	Cox7a1	Mus musculus cytochrome c oxidase, subunit VIIa 1 (Cox7a1), mRNA.	ca	mp	0.087
[§] NM_021488.3	Ghrl	Mus musculus ghrelin (Ghrl), mRNA.	ha	br	0.086

RefSeq	murines Gen	Beschreibung	f	p	n
NM_010660.1	Krt1-10	Mus musculus keratin complex 1, acidic, gene 10 (Krt1-10), mRNA.	b	cp	0.082
NM_025458.1	1810015P03Rik	Mus musculus RIKEN cDNA 1810015P03 gene (1810015P03Rik), mRNA.		tr	0.082
[§] NM_021488.3	Ghrl	Mus musculus ghrelin (Ghrl), mRNA.	ha	br	0.082
NM_025469.1	Clps	Mus musculus colipase, pancreatic (Clps), mRNA.	ca	mp	0.081
XM_128552.1	Pdip	<i>Nicht verfügbar</i>			0.072
[‡] NM_018731.1	Atp4a	Mus musculus ATPase, H ⁺ /K ⁺ transporting, alpha polypeptide (Atp4a), mRNA.	ATP	tr	0.059
NM_011107.1	Pla2g1b	Mus musculus phospholipase A2, group IB, pancreas (Pla2g1b), mRNA.	b	mp	0.050
NM_183257.1	1810073K19Rik	Mus musculus RIKEN cDNA 1810073K19 gene (1810073K19Rik), mRNA.	ha	res	0.042

* tags desselben Gens Ddc (NM_016672)

† tags desselben Gens Chga (NM_007693)

‡ tags desselben Gens Atp4a (NM_018731)

§ tags desselben Gens Ghrl (NM_021488.3)

Literaturverzeichnis

- (1) ohne Autor (2002): *Microarray standards at last*. **Nature**; 419 (6905), 323.
 - (2) ohne Autor (2006): *The chips are down*. **Nature**; 444 (7117), 256-257.
 - (3) AHUJA D., Saenz-Robles M T & Pipas J M (2005): *SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation*. **Oncogene**; 24 (52), 7729-7745.
 - (4) ALTABA A., Mas C & Stecca B (2007): *The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer*. **Trends Cell Biol**; 17 (9), 438-447.
 - (5) ALTABA A., Stecca B & Sanchez P (2004): *Hedgehog--Gli signaling in brain tumors: stem cells and paradevelopmental programs in cancer*. **Cancer Lett**; 204 (2), 145-157.
 - (6) ALTSCHUL S. F., Gish W, Miller W, Myers E W & Lipman D J (1990): *Basic local alignment search tool*. **J Mol Biol**; 215 (3), 403-410.
 - (7) ALTSCHUL S. F., Madden T L, Schaffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman D J (1997): *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. **Nucleic Acids Res**; 25 (17), 3389-3402.
 - (8) ANDREWS N. C. & Schmidt P J (2007): *Iron homeostasis*. **Annu Rev Physiol**; 69, 69-85.
 - (9) AOKI K. & Taketo M M (2007): *Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene*. **J Cell Sci**; 120 (Pt 19), 3327-3335.
 - (10) ASHBURNER M., Ball C A, Blake J A, Botstein D, Butler H, Cherry J M, Davis A P, Dolinski K, Dwight S S, Eppig J T, Harris M A, Hill D P, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese J C, Richardson J E, Ringwald M, Rubin G M & Sherlock G (2000): *Gene ontology: tool for the unification of biology*. *The Gene Ontology Consortium*. **Nat Genet**; 25 (1), 25-29.
 - (11) BALMAIN A. (2002): *Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models*. **Cell**; 108 (2), 145-152.
 - (12) BARKER N. & Clevers H (2007): *Tracking down the stem cells of the intestine: strategies to identify adult stem cells*. **Gastroenterology**; 133 (6), 1755-1760.
 - (13) BARKER N., Huch M, Kujala P, van de W M, Snippert H J, van Es J H, Sato T, Stange D E, Begthel H, van den B M, Danenberg E, van den B S, Korving J, Abo A, Peters P J, Wright N, Poulsom R & Clevers H (2010): *Lgr5(+ve) Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro*. **Cell Stem Cell**; 6 (1), 25-36.
 - (14) BARKER N., van Es J H, Kuipers J, Kujala P, van den B M, Cozijnsen M, Haegerbarth A, Korving J, Begthel H, Peters P J & Clevers H (2007): *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5*. **Nature**; 449 (7165), 1003-1007.
 - (15) BEHRENS J. (2005): *The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis*. **Biochem Soc Trans**; 33 (Pt 4), 672-675.
 - (16) BIAN Y. H., Huang S H, Yang L, Ma X L, Xie J W & Zhang H W (2007): *Sonic hedgehog-Gli1 pathway in colorectal adenocarcinomas*. **World J Gastroenterol**; 13 (11), 1659-1665.
-

-
- (17) BILD A. & Febbo P G (2005): *Application of a priori established gene sets to discover biologically important differential expression in microarray data.* **Proc Natl Acad Sci U S A**; 102 (43), 15278-15279.
- (18) BOSSE P., Bernex F, De S P, Salaun P & Panthier J J (1997): *Multiple neuroendocrine tumours in transgenic mice induced by c-kit-SV40 T antigen fusion genes.* **Oncogene**; 14 (22), 2661-2670.
- (19) BOTTERI F. M., van Der Putten H, Wong D F, Sauvage C A & Evans R M (1987): *Unexpected thymic hyperplasia in transgenic mice harboring a neuronal promoter fused with simian virus 40 large T antigen.* **Mol Cell Biol**; 7 (9), 3178-3184.
- (20) BOYER D. F., Fujitani Y, Gannon M, Powers A C, Stein R W & Wright C V (2006): *Complementation rescue of Pdx1 null phenotype demonstrates distinct roles of proximal and distal cis-regulatory sequences in pancreatic and duodenal expression.* **Dev Biol**; 298 (2), 616-631.
- (21) BRAZMA A., Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball C A, Causton H C, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege F C, Kim I F, Markowitz V, Matese J C, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J & Vingron M (2001): *Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data.* **Nat Genet**; 29 (4), 365-371.
- (22) BRAZMA A., Robinson A, Cameron G & Ashburner M (2000): *One-stop shop for microarray data.* **Nature**; 403 (6771), 699-700.
- (23) CALLINAN P. A. & Feinberg A P (2006): *The emerging science of epigenomics.* **Hum Mol Genet**; 15 Spec No 1:R95-101., R95-101.
- (24) CARACCILOLO V., Reiss K, Khalili K, De Falco G & Giordano A (2006): *Role of the interaction between large T antigen and Rb family members in the oncogenicity of JC virus.* **Oncogene**; 25 (38), 5294-5301.
- (25) CHAO C., Han X, Ives K, Park J, Kolokoltsov A A, Davey R A, Moyer M P & Hellmich M R (Article online ahead of print, published online August 20, 2009): *CCK(2) receptor expression transforms non-tumorigenic human NCM356 colonic epithelial cells into tumor forming cells.* **Int J Cancer**; DOI: 10.1002/ijc.24845.
- (26) CHEN H. Z., Tsai S Y & Leone G (2009): *Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control.* **Nat Rev Cancer**; 9 (11), 785-797.
- (27) CHEVINSKY A. H. (1991): *CEA in tumors of other than colorectal origin.* **Semin Surg Oncol**; 7 (3), 162-166.
- (28) DAVENPORT R. J. (2001): *Microarrays. Data standards on the horizon.* **Science**; 292 (5516), 414-415.
- (29) DE MAGALHAES J. P. & Costa J (2009): *A database of vertebrate longevity records and their relation to other life-history traits.* **J Evol Biol**; 22 (8), 1770-1774.
- (30) DUFRESNE M., Seva C & Fourmy D (2006): *Cholecystokinin and gastrin receptors.* **Physiol Rev**; 86 (3), 805-847.
-

-
- (31) EADES-PERNER A. M., van Der P H, Hirth A, Thompson J, Neumaier M, von K S & Zimmermann W (1994): *Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern.* **Cancer Res**; 54 (15), 4169-4176.
- (32) ENDERS G., persönliche Mitteilung.
- (33) FENTON R. G. & Longo D L: Cancer Cell Biology and Angiogenesis; in: Fauci A S, Braunwald E, Kasper D L, Hauser S L, Longo D L, Jameson J L & Loscalzo J (Hrsg.), *Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th edition.* **Mc Graw Hill**, New York 2008; 498 - 513.
- (34) FISHER BOX J. (1987): *Guinness, Gosset, Fisher and Small Samples.* **Statistical Science**; 2 (1), 45-52.
- (35) FUJITANI Y., Fujitani S, Boyer D F, Gannon M, Kawaguchi Y, Ray M, Shiota M, Stein R W, Magnuson M A & Wright C V (2006): *Targeted deletion of a cis-regulatory region reveals differential gene dosage requirements for Pdx1 in foregut organ differentiation and pancreas formation.* **Genes Dev**; 20 (2), 253-266.
- (36) GARABEDIAN E. M., Humphrey P A & Gordon J I (1998): *A transgenic mouse model of metastatic prostate cancer originating from neuroendocrine cells.* **Proc Natl Acad Sci U S A**; 95 (26), 15382-15387.
- (37) GATENBY R. A. (2009): *A change of strategy in the war on cancer.* **Nature**; 459 (7246), 508-509.
- (38) GATENBY R. A., Silva A S, Gillies R J & Frieden B R (2009): *Adaptive therapy.* **Cancer Res**; 69 (11), 4894-4903.
- (39) GAZDAR A. F., Butel J S & Carbone M (2002): *SV40 and human tumours: myth, association or causality?* **Nat Rev Cancer**; 2 (12), 957-964.
- (40) GREEN J. E., Shibata M A, Yoshidome K, Liu M L, Jorcyk C, Anver M R, Wigginton J, Wiltrout R, Shibata E, Kaczmarczyk S, Wang W, Liu Z Y, Calvo A & Couldrey C (2000): *The C3(1)/SV40 T-antigen transgenic mouse model of mammary cancer: ductal epithelial cell targeting with multistage progression to carcinoma.* **Oncogene**; 19 (8), 1020-1027.
- (41) GREENBERG N. M., DeMayo F, Finegold M J, Medina D, Tilley W D, Aspinall J O, Cunha G R, Donjacour A A, Matusik R J & Rosen J M (1995): *Prostate cancer in a transgenic mouse.* **Proc Natl Acad Sci U S A**; 92 (8), 3439-3443.
- (42) GUM J. R., Jr., Hicks J W, Crawley S C, Yang S C, Borowsky A D, Dahl C M, Kakar S, Kim D H, Cardiff R D & Kim Y S (2004): *Mice expressing SV40 T antigen directed by the intestinal trefoil factor promoter develop tumors resembling human small cell carcinoma of the colon.* **Mol Cancer Res**; 2 (9), 504-513.
- (43) HAINES B. P. & Rigby P W (2008): *Expression of the Lingo/LERN gene family during mouse embryogenesis.* **Gene Expr Patterns**; 8 (2), 79-86.
- (44) HAMMARSTROM S. (1999): *The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues.* **Semin Cancer Biol**; 9 (2), 67-81.
-

-
- (45) HANAHAHAN D. (1985): *Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes*. **Nature**; 315 (6015), 115-122.
- (46) HANAHAHAN D. & Weinberg R A (2000): *The hallmarks of cancer*. **Cell**; 100 (1), 57-70.
- (47) HARRIS M. A., Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, Eilbeck K, Lewis S, Marshall B, Mungall C, Richter J, Rubin G M, Blake J A, Bult C, Dolan M, Drabkin H, Eppig J T, Hill D P, Ni L, Ringwald M, Balakrishnan R, Cherry J M, Christie K R, Costanzo M C, Dwight S S, Engel S, Fisk D G, Hirschman J E, Hong E L, Nash R S, Sethuraman A, Theesfeld C L, Botstein D, Dolinski K, Feierbach B, Berardini T, Mundodi S, Rhee S Y, Apweiler R, Barrell D, Camon E, Dimmer E, Lee V, Chisholm R, Gaudet P, Kibbe W, Kishore R, Schwarz E M, Sternberg P, Gwinn M, Hannick L, Wortman J, Berriman M, Wood V, de la C N, Tonellato P, Jaiswal P, Seigfried T & White R (2004): *The Gene Ontology (GO) database and informatics resource*. **Nucleic Acids Res**; 32 (Database issue), D258-D261.
- (48) HAUCK W. & Stanners C P (1995): *Transcriptional regulation of the carcinoembryonic antigen gene. Identification of regulatory elements and multiple nuclear factors*. **J Biol Chem**; 270 (8), 3602-3610.
- (49) HEDENFALK I., Duggan D, Chen Y, Radmacher M, Bittner M, Simon R, Meltzer P, Gusterson B, Esteller M, Kallioniemi O P, Wilfond B, Borg A, Trent J, Raffeld M, Yakhini Z, Ben-Dor A, Dougherty E, Kononen J, Bubendorf L, Fehrle W, Pittaluga S, Gruvberger S, Loman N, Johannsson O, Olsson H & Sauter G (2001): *Gene-expression profiles in hereditary breast cancer*. **N Engl J Med**; 344 (8), 539-548.
- (50) HIDDEMANN W., Huber H, Feuring-Buske M, Lindner L H & Bartram C R: Was ist Krebs?; in: Hiddemann W, Huber H & Bartram C R (Hrsg.), *Die Onkologie*. **Springer Verlag**, Berlin 2004.
- (51) HOLM S. (1979): *A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure*. **Scandinavian Journal of Statistics**; 6 (2), 65-70.
- (52) HOMMA S., Shimada T, Hikake T & Yaginuma H (2009): *Expression pattern of LRR and Ig domain-containing protein (LRRIG protein) in the early mouse embryo*. **Gene Expr Patterns**; 9 (1), 1-26.
- (53) HU Y., Ippolito J E, Garabedian E M, Humphrey P A & Gordon J I (2002): *Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice*. **J Biol Chem**; 277 (46), 44462-44474.
- (54) HUSS W. J., Maddison L A & Greenberg N M (2001): *Autochthonous mouse models for prostate cancer: past, present and future*. **Semin Cancer Biol**; 11 (3), 245-260.
- (55) HWANG I. T., Kim Y J, Kim S H, Kwak C I, Gu Y Y & Chun J Y (2003): *Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification*. **Biotechniques**; 35 (6), 1180-1184.
- (56) IVICS Z., Li M A, Mates L, Boeke J D, Nagy A, Bradley A & Izsvak Z (2009): *Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates*. **Nat Methods**; 6 (6), 415-422.
- (57) JENSEN R. T., Battey J F, Spindel E R & Benya R V (2008): *International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states*. **Pharmacol Rev**; 60 (1), 1-42.
-

-
- (58) JUNTILLA M. R. & Evan G I (2009): *p53--a Jack of all trades but master of none*. **Nat Rev Cancer**; 9 (11), 821-829.
- (59) KAGEYAMA R., Ishibashi M, Takebayashi K & Tomita K (1997): *bHLH transcription factors and mammalian neuronal differentiation*. **Int J Biochem Cell Biol**; 29 (12), 1389-1399.
- (60) KAPLAN-LEFKO P. J., Chen T M, Ittmann M M, Barrios R J, Ayala G E, Huss W J, Maddison L A, Foster B A & Greenberg N M (2003): *Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model*. **Prostate**; 55 (3), 219-237.
- (61) KATO M. & Katoh M (2007): *Notch signaling in gastrointestinal tract (review)*. **Int J Oncol**; 30 (1), 247-251.
- (62) KELLEY W. L. & Georgopoulos C (1997): *The T/t common exon of simian virus 40, JC, and BK polyomavirus T antigens can functionally replace the J-domain of the Escherichia coli DnaJ molecular chaperone*. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 94 (8), 3679-3684.
- (63) KENNADY P. K. & Parnaik V K (1992): *Incomplete splicing of simian virus 40 large T antigen transcripts in a transformed mouse cell line*. **Virology**; 190 (1), 480-484.
- (64) KENT W. J., Sugnet C W, Furey T S, Roskin K M, Pringle T H, Zahler A M & Haussler D (2002): *The human genome browser at UCSC*. **Genome Res**; 12 (6), 996-1006.
- (65) KHAN J., Simon R, Bittner M, Chen Y, Leighton S B, Pohida T, Smith P D, Jiang Y, Gooden G C, Trent J M & Meltzer P S (1998): *Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays*. **Cancer Res**; 58 (22), 5009-5013.
- (66) KIM D. Y., Kim H R, Shim J H, Park C S, Kim S K & Kim Y J (2000): *Significance of serum and tissue carcinoembryonic antigen for the prognosis of gastric carcinoma patients*. **J Surg Oncol**; 74 (3), 185-192.
- (67) KOLTERUD A., Grosse A S, Zacharias W J, Walton K D, Kretovich K E, Madison B B, Waghray M, Ferris J E, Hu C, Merchant J L, Dlugosz A A, Kottmann A H & Gumucio D L (2009): *Paracrine Hedgehog signaling in stomach and intestine: new roles for hedgehog in gastrointestinal patterning*. **Gastroenterology**; 137 (2), 618-628.
- (68) KOMÁREK V.: Gross Anatomy; in: Hedrich H J & Bullock G (Hrsg.), *The Laboratory Mouse*. **Elsevier Academic Press**, London 2004; 117 - 132.
- (69) KRUSKAL W. H. & Wallis W A (1952): *Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis*. **Journal of the American Statistical Association**; 47 (260), 583-621.
- (70) KUHN K., Baker S C, Chudin E, Lieu M H, Oeser S, Bennett H, Rigault P, Barker D, McDaniel T K & Chee M S (2004): *A novel, high-performance random array platform for quantitative gene expression profiling*. **Genome Res**; 14 (11), 2347-2356.
- (71) KULAKSIZ H., Arnold R, Goke B, Maronde E, Meyer M, Fahrenholz F, Forssmann W G & Eissele R (2000): *Expression and cell-specific localization of the cholecystokinin B/gastrin receptor in the human stomach*. **Cell Tissue Res**; 299 (2), 289-298.
- (72) LANGO M. N., Dyer K F, Lui V W, Gooding W E, Gubish C, Siegfried J M & Grandis J R (2002): *Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck*. **J Natl Cancer Inst**; 94 (5), 375-383.
-

-
- (73) LEE H. K., Lee H J, Hur K, Lee H S, Kim W H, Michaeli D, Choe K J & Yang H K (2005): *Growth effect of gastrin on gastric cancer and its clinical implications for gastric cancer surgery.* **Oncol Rep**; 14 (2), 383-388.
- (74) LEE Y. C., Asa S L & Drucker D J (1992): *Glucagon gene 5'-flanking sequences direct expression of simian virus 40 large T antigen to the intestine, producing carcinoma of the large bowel in transgenic mice.* **J Biol Chem**; 267 (15), 10705-10708.
- (75) LEES C., Howie S, Sartor R B & Satsangi J (2005): *The hedgehog signalling pathway in the gastrointestinal tract: implications for development, homeostasis, and disease.* **Gastroenterology**; 129 (5), 1696-1710.
- (76) LI D., Zhao R, Lilyestrom W, Gai D, Zhang R, DeCaprio J A, Fanning E, Jochimiak A, Szakonyi G & Chen X S (2003): *Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen.* **Nature**; 423 (6939), 512-518.
- (77) LONGO D. L.: Approach to the Patient with Cancer; in: Fauci A S, Braunwald E, Kasper D L, Hauser S L, Longo D L, Jameson J L & Loscalzo J (Hrsg.), *Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th edition.* **Mc Graw Hill**, New York 2008.
- (78) LUI V. W., Thomas S M, Zhang Q, Wentzel A L, Siegfried J M, Li J Y & Grandis J R (2003): *Mitogenic effects of gastrin-releasing peptide in head and neck squamous cancer cells are mediated by activation of the epidermal growth factor receptor.* **Oncogene**; 22 (40), 6183-6193.
- (79) MAEDA N., Fan H & Yoshikai Y (2008): *Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms.* **Rev Med Virol**; 18 (6), 387-405.
- (80) MANN H. B. & Whitney D R (1947): *On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other.* **The Annals of Mathematical Statistics**; 18 (1), 5-60.
- (81) MARTINEZ A., Zudaire E, Julian M, Moody T W & Cuttitta F (2005): *Gastrin-releasing peptide (GRP) induces angiogenesis and the specific GRP blocker 77427 inhibits tumor growth in vitro and in vivo.* **Oncogene**; 24 (25), 4106-4113.
- (82) MASUMORI N., Thomas T Z, Chaurand P, Case T, Paul M, Kasper S, Caprioli R M, Tsukamoto T, Shappell S B & Matusik R J (2001): *A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential.* **Cancer Res**; 61 (5), 2239-2249.
- (83) MAYER R. J.: Gastrointestinal Tract Cancer; in: Fauci A S, Braunwald E, Kasper D L, Hauser S L, Longo D L, Jameson J L & Loscalzo J (Hrsg.), *Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th edition.* **Mc Graw Hill**, New York 2008.
- (84) MAZZONE M. & Comoglio P M (2006): *The Met pathway: master switch and drug target in cancer progression.* **FASEB J**; 20 (10), 1611-1621.
- (85) MERLO L. M., Pepper J W, Reid B J & Maley C C (2006): *Cancer as an evolutionary and ecological process.* **Nat Rev Cancer**; 6 (12), 924-935.
- (86) MEYER N. & Penn L Z (2008): *Reflecting on 25 years with MYC.* **Nat Rev Cancer**; 8 (12), 976-990.
-

-
- (87) MOOTHA V. K., Lindgren C M, Eriksson K F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly M J, Patterson N, Mesirov J P, Golub T R, Tamayo P, Spiegelman B, Lander E S, Hirschhorn J N, Altshuler D & Groop L C (2003): *PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes*. **Nat Genet**; 34 (3), 267-273.
- (88) MORIN P. J., Trent J M, Collins F S & Vogelstein B: Cancer Genetics; in: Fauci A S, Braunwald E, Kasper D L, Hauser S L, Longo D L, Jameson J L & Loscalzo J (Hrsg.), *Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th edition*. **Mc Graw Hill**, New York 2008.
- (89) MULLOR J. L., Sanchez P & Altaba A (2002): *Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease*. **Trends Cell Biol**; 12 (12), 562-569.
- (90) NOCKEL J., van den Engel N K, Winter H, Hatz R A, Zimmermann W & Kammerer R (2006): *Characterization of gastric adenocarcinoma cell lines established from CEA424/SV40 T antigen-transgenic mice with or without a human CEA transgene*. **BMC Cancer**; 6:57., 57.
- (91) NUSSE R.: The Wnt Homepage, <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>; abgerufen am 16.01.2010.
- (92) OECD (Hrsg.): *Health at a Glance 2009: OECD Indicators*. **OECD Publishing**, Paris 2009.
- (93) OLSON N. E. (2006): *The microarray data analysis process: from raw data to biological significance*. **NeuroRx**; 3 (3), 373-383.
- (94) OMENETTI A. & Diehl A M (2008): *The adventures of sonic hedgehog in development and repair. II. Sonic hedgehog and liver development, inflammation, and cancer*. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**; 294 (3), G595-G598.
- (95) PARKIN C. A. & Ingham P W (2008): *The adventures of Sonic Hedgehog in development and repair. I. Hedgehog signaling in gastrointestinal development and disease*. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**; 294 (2), G363-G367.
- (96) PENNACCHIETTI S., Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S & Comoglio P M (2003): *Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene*. **Cancer Cell**; 3 (4), 347-361.
- (97) PEREZ-STABLE C., Altman N H, Mehta P P, Deftos L J & Roos B A (1997): *Prostate cancer progression, metastasis, and gene expression in transgenic mice*. **Cancer Res**; 57 (5), 900-906.
- (98) POLAGER S. & Ginsberg D (2009): *p53 and E2f: partners in life and death*. **Nat Rev Cancer**; 9 (10), 738-748.
- (99) POPESKO P., Rajtová V & Horák J (Hrsg.): *A colour atlas of small laboratory animals; Volume 2: Rat, mouse and golden hamster*. **Wolfe Publishing**, London 1992.
- (100) POULIN D. L. & DeCaprio J A (2006): *Is there a role for SV40 in human cancer?* **J Clin Oncol**; 24 (26), 4356-4365.
- (101) PRUITT K. D., Tatusova T & Maglott D R (2007): *NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins*. **Nucleic Acids Res**; 35 (Database issue), D61-D65.
-

-
- (102) RADTKE F. & Clevers H (2005): *Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin.* **Science**; 307 (5717), 1904-1909.
- (103) RADTKE F., Schweisguth F & Pear W (2005): *The Notch 'gospel'.* **EMBO Rep**; 6 (12), 1120-1125.
- (104) REHFELD J. F. (2004): *Clinical endocrinology and metabolism. Cholecystokinin.* **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**; 18 (4), 569-586.
- (105) RHEAD B., Karolchik D, Kuhn R M, Hinrichs A S, Zweig A S, Fujita P A, Diekhans M, Smith K E, Rosenbloom K R, Raney B J, Pohl A, Pheasant M, Meyer L R, Learned K, Hsu F, Hillman-Jackson J, Harte R A, Giardine B, Dreszer T R, Clawson H, Barber G P, Haussler D & Kent W J (Article online ahead of print, published online November 11, 2009): *The UCSC genome browser database: update 2010.* **Nucleic Acids Res**; DOI: 10.1093/nar/gkp939.
- (106) ROBERT-KOCH-INSTITUT & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.): *Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends.*, 6. überarbeitete Auflage. Berlin 2008.
- (107) ROGERS S. & Cambrosio A (2007): *Making a new technology work: the standardization and regulation of microarrays.* **Yale J Biol Med**; 80 (4), 165-178.
- (108) ROZENGURT E. & Walsh J H (2001): *Gastrin, CCK, signaling, and cancer.* **Annu Rev Physiol**; 63:49-76., 49-76.
- (109) SAMBROCK J. & Russel D W: Preparation of genomic DNA from mouse tails and other small samples; in: *Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition.* **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York 2001; 6.23 - 6.25.
- (110) SANDER G. R. & Powell B C (2004): *Expression of notch receptors and ligands in the adult gut.* **J Histochem Cytochem**; 52 (4), 509-516.
- (111) SAUSVILLE E. A. & Longo D L: Principles of Cancer Treatment; in: Fauci A S, Braunwald E, Kasper D L, Hauser S L, Longo D L, Jameson J L & Loscalzo J (Hrsg.), *Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th edition.* **Mc Graw Hill**, New York 2008.
- (112) SCHMITZ F., Goke M N, Otte J M, Schrader H, Reimann B, Kruse M L, Siegel E G, Peters J, Herzig K H, Folsch U R & Schmidt W E (2001): *Cellular expression of CCK-A and CCK-B/gastrin receptors in human gastric mucosa.* **Regul Pept**; 102 (2-3), 101-110.
- (113) SCHONHOFF S. E., Giel-Moloney M & Leiter A B (2004): *Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells.* **Endocrinology**; 145 (6), 2639-2644.
- (114) SCHREWE H., Thompson J, Bona M, Hefta L J, Maruya A, Hassauer M, Shively J E, von K S & Zimmermann W (1990): *Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression.* **Mol Cell Biol**; 10 (6), 2738-2748.
- (115) SCHUBERT M. L. (2007): *Gastric secretion.* **Curr Opin Gastroenterol**; 23 (6), 595-601.
- (116) SCHUBERT M. L. & Peura D A (2008): *Control of gastric acid secretion in health and disease.* **Gastroenterology**; 134 (7), 1842-1860.
-

-
- (117) SEIDEN-LONG I. M., Brown K R, Shih W, Wigle D A, Radulovich N, Jurisica I & Tsao M S (2006): *Transcriptional targets of hepatocyte growth factor signaling and Ki-ras oncogene activation in colorectal cancer*. **Oncogene**; 25 (1), 91-102.
- (118) SHAPIRO S. S. & Wilk M B (1965): *An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)*. **Biometrika**; 52 (3/4), 591-611.
- (119) SIDAK Z. (1967): *Rectangular Confidence Regions for the Means of Multivariate Normal Distributions*. **J Am Stat Assoc**; 62 (318), 626-633.
- (120) SIMON R., Korn E, McShane L, Radmacher M, Wright G & Zhao Y (Hrsg.): *Design and Analysis of DNA Microarray Investigations*. **Springer Verlag**, New York 2003.
- (121) SIMON R., Lam A, Li M C, Ngan M, Menenzes S & Zhao Y (2007): *Analysis of Gene Expression Data Using BRB-Array Tools*. **Cancer Inform**; 3, 11-17.
- (122) SINCLAIR E. M. & Drucker D J (2005): *Proglucagon-derived peptides: mechanisms of action and therapeutic potential*. **Physiology (Bethesda)**; 20, 357-365.
- (123) SJOLUND J., Manetopoulos C, Stockhausen M T & Axelson H (2005): *The Notch pathway in cancer: differentiation gone awry*. **Eur J Cancer**; 41 (17), 2620-2629.
- (124) SOUTHERN E. M. (1975): *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. **J Mol Biol**; 98 (3), 503-517.
- (125) STATISTISCHES BUNDESAMT (Hrsg.): *Statistisches Jahrbuch 2007 für die Bundesrepublik Deutschland*. Wiesbaden 2007.
- (126) SUBRAMANIAN A., Tamayo P, Mootha V K, Mukherjee S, Ebert B L, Gillette M A, Paulovich A, Pomeroy S L, Golub T R, Lander E S & Mesirov J P (2005): *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 102 (43), 15545-15550.
- (127) SWEET-CORDERO A., Mukherjee S, Subramanian A, You H, Roix J J, Ladd-Acosta C, Mesirov J, Golub T R & Jacks T (2005): *An oncogenic KRAS2 expression signature identified by cross-species gene-expression analysis*. **Nat Genet**; 37 (1), 48-55.
- (128) SYDER A. J., Karam S M, Mills J C, Ippolito J E, Ansari H R, Farook V & Gordon J I (2004): *A transgenic mouse model of metastatic carcinoma involving transdifferentiation of a gastric epithelial lineage progenitor to a neuroendocrine phenotype*. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 101 (13), 4471-4476.
- (129) TARASOVA N. I., Romanov V I, Da Silva P P & Michejda C J (1996): *Numerous cell targets for gastrin in the guinea pig stomach revealed by gastrin/CCKB receptor localization*. **Cell Tissue Res**; 283 (1), 1-6.
- (130) THOMPSON J., Epting T, Schwarzkopf G, Singhofen A, Eades-Perner A M, van Der Putten H. & Zimmermann W (2000): *A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy*. **Int J Cancer**; 86 (6), 863-869.
- (131) THOMPSON J. A., Grunert F & Zimmermann W (1991): *Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives*. **J Clin Lab Anal**; 5 (5), 344-366.
-

-
- (132) VAN DEN BRINK G. R., de Santa Barbara P & Roberts D J (2001): *Development. Epithelial cell differentiation--a Mather of choice*. **Science**; 294 (5549), 2115-2116.
- (133) VAN DEN BRINK G. R., Hardwick J C, Tytgat G N, Brink M A, Ten Kate F J, Van Deventer S J & Peppelenbosch M P (2001): *Sonic hedgehog regulates gastric gland morphogenesis in man and mouse*. **Gastroenterology**; 121 (2), 317-328.
- (134) VAN DER FLIER L. G. & Clevers H (2009): *Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium*. **Annu Rev Physiol**; 71, 241-260.
- (135) VAN DYKE T. & Jacks T (2002): *Cancer modeling in the modern era: progress and challenges*. **Cell**; 108 (2), 135-144.
- (136) VAN LINT J., Rykx A, Maeda Y, Vantus T, Sturany S, Malhotra V, Vandenhede J R & Seufferlein T (2002): *Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move*. **Trends Cell Biol**; 12 (4), 193-200.
- (137) VARMUS H. (2006): *The New Era in Cancer Research*. **Science**; 312 (5777), 1162-1165.
- (138) VASSILEVA G., Chen S C, Zeng M, Abbondanzo S, Jensen K, Gorman D, Baroudy B M, Jiang Y, Murgolo N & Lira S A (2003): *Expression of a novel murine type I IFN in the pancreatic islets induces diabetes in mice*. **J Immunol**; 170 (11), 5748-5755.
- (139) VIATTE L., Grone H J, Hentze M W & Galy B (2009): *In vivo role(s) of the iron regulatory proteins (IRP) 1 and 2 in aseptic local inflammation*. **J Mol Med**; 87 (9), 913-921.
- (140) VOGELSTEIN B. & Kinzler K W (2004): *Cancer genes and the pathways they control*. **Nat Med**; 10 (8), 789-799.
- (141) VOLPI E. V. & Bridger J M (2008): *FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique*. **Biotechniques**; 45 (4), 385-6, 388, 390.
- (142) WARD J. M. & vor-Henneman D E (2004): *Mouse models of human familial cancer syndromes*. **Toxicol Pathol**; 32 Suppl 1:90-8., 90-98.
- (143) WATSON S. A., Grabowska A M, El-Zaatari M & Takhar A (2006): *Gastrin - active participant or bystander in gastric carcinogenesis?* **Nat Rev Cancer**; 6 (12), 936-946.
- (144) WEINBERG R. A.: Growth Factors, Receptors, and Cancer; in: Weinberg R A (Hrsg.), *The Biology of Cancer*. **Garland Science**, New York 2007.
- (145) WEINBERG R. A.: The Nature of Cancer; in: Weinberg R A (Hrsg.), *The Biology of Cancer*. **Garland Science**, New York 2007.
- (146) WHITE M. K., Gordon J, Reiss K, Del V L, Croul S, Giordano A, Darbinyan A & Khalili K (2005): *Human polyomaviruses and brain tumors*. **Brain Res Brain Res Rev**; 50 (1), 69-85.
- (147) WHITE M. K. & Khalili K (2006): *Interaction of retinoblastoma protein family members with large T-antigen of primate polyomaviruses*. **Oncogene**; 25 (38), 5286-5293.
- (148) WIKENHEISER K. A., Clark J C, Linnoila R I, Stahlman M T & Whitsett J A (1992): *Simian virus 40 large T antigen directed by transcriptional elements of the human surfactant protein*
-

-
- C gene produces pulmonary adenocarcinomas in transgenic mice.* **Cancer Res**; 52 (19), 5342-5352.
- (149) WILCOXON F. (1945): *Individual Comparisons by Ranking Methods.* **Biometrics Bulletin**; 1 (6), 80-83.
- (150) WONG C. & Jin Z G (2005): *Protein kinase C-dependent protein kinase D activation modulates ERK signal pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growth factor.* **J Biol Chem**; 280 (39), 33262-33269.
- (151) WORLD HEALTH ORGANIZATION (Hrsg.): *ICD-10: international statistical classification of diseases and related health problems - tenth revision, 2. Auflage.* Geneva 2004.
- (152) WU J., Smith L T, Plass C & Huang T H (2006): *ChIP-chip comes of age for genome-wide functional analysis.* **Cancer Res**; 66 (14), 6899-6902.
- (153) YANG Y. H., Dudoit S, Luu P, Lin D M, Peng V, Ngai J & Speed T P (2002): *Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation.* **Nucleic Acids Res**; 30 (4), e15.
- (154) ZAKI M., Harrington L, McCuen R, Coy D H, Arimura A & Schubert M L (1996): *Somatostatin receptor subtype 2 mediates inhibition of gastrin and histamine secretion from human, dog, and rat antrum.* **Gastroenterology**; 111 (4), 919-924.
- (155) ZHONG S., Storch K F, Lipan O, Kao M C, Weitz C J & Wong W H (2004): *GoSurfer: a graphical interactive tool for comparative analysis of large gene sets in Gene Ontology space.* **Appl Bioinformatics**; 3 (4), 261-264.
-

Danksagung

Herrn **Prof. Dr. Dr. J. Heesemann** danke ich für die Möglichkeit, die Doktorarbeit im Rahmen des Promotionsstudienganges „Molekulare und Systembiologische Medizin“ durchführen zu können. Dieses Programm hat es mir vielfach ermöglicht, über den Tellerrand meines Themas hinauszublicken. Es trägt meiner Ansicht nach den Besonderheiten der Promotion in der Medizin ausgezeichnet Rechnung.

Bei Herrn **Prof. Dr. U. Pohl** bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin.

Herrn **Prof. Dr. Georg Enders** danke ich für die Überlassung des Themas und die kontinuierliche exzellente Betreuung bei meiner Doktorarbeit. Darüber hinaus bin ich ihm auch sehr dankbar für die zahlreichen Gespräche, in denen wir das Vorgehen und die Inhalte dieser Arbeit diskutiert haben und Vieles darüber hinaus. Das hat mein Verständnis von Forschung in der Medizin nachhaltig geprägt und wird mir in Zukunft Vorbild und Ansporn beim wissenschaftlichen Arbeiten sein.

Dankbar bin ich auch Herrn **Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann** für die Herstellung des CEA424/SV 40 large T-Antigen – Tiermodells und für alle Anregungen während der Anfertigung der Doktorarbeit.

Herrn **Dr. A. Buchner** danke ich für die Einführung in das Programm BRB-ArrayTools und wertvolle weitere Ratschläge zur Auswertung von Mikroarray-Daten.

Bärbel Lorenz danke ich herzlich, dass sie mich mit großer Geduld in das molekularbiologische Arbeiten eingewiesen hat und dass sie auch den weiteren Fortgang dieser Dissertation immer mit Rat und Tat unterstützte, nicht zuletzt auch durch wertvolle Vorarbeiten und Hinweise beim Primerdesign.

Auch allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, namentlich **Claudia Fahney** und meinen Mit-Doktoranden **Costanza Chiapponi**, **Marion San Nicoló** und **Daniel Markwardt** danke ich sehr für das äußerst angenehme und kollegiale Arbeitsklima.

Meiner **Familie**, besonders **meinen Eltern**, danke ich für die vorbehaltlose, nicht nur materielle Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung.

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich **Nici Sandner** für die moralische Unterstützung sowie für das mehrfache Korrekturlesen von Entwürfen zu dieser Arbeit und die zahlreichen konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Schließlich möchte ich mich bei allen meinen **Freunden** bedanken für die Geduld, die sie mit mir besonders in der jüngsten Vergangenheit bewiesen haben, wenn ich während der Fertigstellung der Dissertation oft lange Zeit nicht für gemeinsame Unternehmungen zu gewinnen war.
