Universität Ulm
Abteilung Innere Medizin I
Leiter Prof. Dr. G. Adler

Korrelation klinischer Parameter mit Genexpressionsprofil-Daten zur Extraktion prognostischer Expressions-Signaturen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Cordula Menjon
aus Bremen

Ulm 2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Gress

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Jan Torzewski

Tag der Promotion: 11.05.2007

Meinem Mann und meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis i

Abkürzungsverzeichnis iii

1 Einleitung 1

1.1 Epidemiologie, Äthiologie, Histologie, Therapie und Prognose 1
1.2 Stand der Forschung 2
1.3 Genexpressionsprofile 6
1.4 Zielsetzung der Arbeit 7

2 Material und Methoden 8

2.1 Studienaufbau 8
2.1.1 Art der Studie und Datenerhebung 8
2.1.2 Einverständnis der Patienten und der Ethikkommission 8
2.2 Herstellung des Mikroarrays und Auswahl der Gene 9
2.3 Gewinnung und Aufarbeitung des Tumorgewebes 10
2.3.1 Gewinnung von RNA aus dem Tumorgewebe 10
2.3.2 Herstellung von radioaktiv markierter cDNA 10
2.4 Hybridisierung von radioaktiv markierter cDNA mit dem Mikroarray 11
2.5 Bildliche und statistische Auswertung 12
2.5.1 Quantifizierung und Auswertung der Arrays 12
2.5.2 Bestimmung von Expressionsmustern mittels hierarchischen Clusteranalysen 14
2.5.3 Überlebenszeitanalysen 14
2.6 Erstellung eines Prognosefaktors mittels Cox Regressionsmodell (Proportional Hazard Model) 16
2.7 Einordnen der differentiell exprimierten Gene in funktionelle und übergeordnete Gruppen 18
2.7.1 GO-Miner 18
2.7.2 Venn-Master 19

3 Ergebnisse 20

3.1 Alter 20
3.2 Überleben 21
3.3 Auswertung der Genexpressionsprofile 22
3.3.1 Vergleich der Tumorstadien (T-Stadien) 22
3.3.2 Vergleich der N-Stadien 30
3.3.3 Vergleich der M-Stadien 32
3.3.4 Vergleich der Staging-Gruppen 32
3.3.5 Vergleich von M_0M_1 mit T_1T_4 35
3.3.6 Vergleich von M_0M_1 mit N_0N_1 35
3.4 Cox-Modell 36

4 Diskussion 38

4.1 Studienaufbau, Alter und Überleben 38
4.2 TNM-Stadien, Staging 39
4.3 Auswertungen der Gen-Arrays 40
4.3.1 Vergleich der T-Stadien 40
4.3.2 Vergleich der N-Stadien 45
4.3.3 Vergleich der M-Stadien 48
4.3.4 Vergleich der N- mit den M-Stadien und Vergleich von M_0M_1 mit T_1T_4 50
4.3.5 Vergleich der Staging-Gruppen untereinander und mit dem Kriterium der Fernmetastasierung 51
4.3.6 Cox-Modell 52

5 Zusammenfassung und Ausblick 53

6 Literaturverzeichnis 55

7 Tabellarischer Anhang 63

7.1 UICC 2002 für exokrine Pankreaskarzinome 63
7.2 Cox-Modell: Computerbefehle und Ergebnisse mit dem Programm “R” 64
7.3 Differentiell exprimierte Gene: Liste der Rohwerte 66

8 Danksagung 75

9 Lebenslauf 76

Abkürzungsverzeichnis

µ	Mikro
33p	radioaktiver Phosphor
5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AKT	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase = PKB
Bad	Bcl-2-antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-1	B-Zell-Leukämie-Gen 1, Synonym: Cyclin 1
Bcl-2	B-Zell-Leukämie-Gen 2
Bcl-xl	B-Zell-Leukämie-Gen"xenopus laevis"
BFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BRCA-2	Breastcancer-Gene 2
Ca^{2+}	Kalzium
CC	Cellcyklus
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Cell Division Control protein
CDK4	Cyclin Dependent Kinase gene number 4
CDKN2	Cyclin Dependent Kinase inhibitor gene number 2
cDNS, cDNA	„copy" Desoxyribonukleinsäure
CRABP-I	Cellular Retinoic Acid-Binding Protein I
dd	bidestilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC4	Mothers against DPP homolog 4
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EIF	Eucaryotic Initiation Factor
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangio-Pankreatikographie
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
et al.	et alteri (und andere)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblast Growth Factor
fkt.	funktionell
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyseraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GO	Gene Ontology
GPGR	G-6 Protein Gekoppelter Rezeptor
GTF	General Transcription Factor

GTP	Guanosin-Triphosphat
GTPase	Enzym, das GTP hydrolysiert
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HUGO-Name	Kürzel für ein Gen gemäß der Human Genome Organisation
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
ID	Identitätsnummer
IGF	Insuline-like Growth Factor
IL	Interleukin
IL-4-stat	Signal transducer and activator of transcription 6
IPMT	Intraductal Papillary Mucinous Tumor
ITGB2	Beta-2-Integrin
JNK1	C-junktionale, N-terminale Kinase 1
KAI1	Circadian clock protein 1
LAD	Leukocyte Adhesion Deficiency
mRNA	Messenger RNA
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MMP	Matrixmetalloprotease
M-Stadium	Metastasierungsstadium
NF-kB	Nuclear Factor Kappa B
NGF	Nerve Growth Factor
NK-92	Natural Killer Cell 92
N-Stadium	Lymphknotenstadium
NTR1	Neurotensin receptor type 1
OP	Operation
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PAK-1	p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1
PBEF	Pre-B-cell colony-enhancing Factor 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pe-Puffer	Elutionspuffer
PKC	Proteinkinase C
PLAU	Plasminogen Activator, Urokinase
PLK3	Cytokine-inducible Kinase
PP	Proteinphosphatase
PPP2R5B	Proteinphosphatase 2B
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PTPN1	Proteintyrosinphosphatase, Non-receptor type 1
PTPRC	Leukocyte common antigen
p-Wert	Probability: kritischer Wert beim Student-t-Test
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
SARP-1	Secreted Apoptosis Related Protein 1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Serpin 1	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor 1

SMAD4	Mothers Against DPP homolog 4
SSC	Sodium Citrat
S-Stadium	Staging-Stadium
TDP1	human Transcription factor Dp-1
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteases
Tis	Tumor in situ
TNC	Tenascin, Synonym: Hexabrachion
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM-Stadium	Tumor-,Lymphknoten-, Metastasierungsstadium
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
T-Stadium	Tumorstadium
T-Test	Student-t-Test
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
uPA	urokinase-Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Epidermal Growth Factor
Venn-Master	Programm zur Darstellung sich überschneidender Mengen, z.B. Gene die in verschiedene fkt. Gruppen gehören
χ^2	Chi-Quadrat
XS-Prot	Proteasen und XS-Gene: cDNA-Klone aus differentiellen Expressionsanalysen im Vergleich der Pankreatitis mit dem Pankreaskarzinom
ZFP	Zinkfingerprotein

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie, Äthiologie, Histologie, Therapie und Prognose

Das duktale Pankreaskarzinom steht in den westlichen Industrienationen an vierter Stelle der Krebstodesdiagnostik. Es ist nach dem Kolon- und dem Magenkarzinom der dritthäufigste Tumor des Verdauungstraktes (Herold 2005).
Der Tumor weist eine Inzidenz von sieben bis elf pro 100 000 Einwohner auf und tritt bei Männern im Mittel um das 67. Lebensjahr und bei Frauen im Mittel um das 75. Lebensjahr auf (Rieder 2002). Er macht etwa zwei Prozent aller Tumorerkrankungen aus und liegt beim Mann an achter, bei der Frau an zehnter Stelle in der Häufigkeit maligner Erkrankungen (Michaud et al. 2001).
Als sichere Risikofaktoren für die Tumorentstehung gelten das Zigarettenrauchen (Rieder 2002) und die genetische Disposition. Kontrovers diskutiert werden die chronische Pankreatitis, ein erhöhter Alkoholkonsum, erhöhtes Körpergewicht, Cholelithiasis, ein erhöhter Blutzuckerspiegel sowie der Diabetes mellitus (Michaud et al. 2001).

Histologisch handelt es sich in 80 bis 85 % der Pankreaskarzinome um ein duktales Adenokarzinom. Varianten des Adenokarzinoms wie das muzinöse, nicht zystische Karzinom, das Siegelringzellkarzinom, das adenosquamöse Karzinom und das undifferenzierte Karzinom machen weitere fünf bis zehn Prozent aller Pankreaskarzinome aus (Heinemann et al. 2001). Bei den Papillenkarzinomen, den distalen Choledochuskarzinomen sowie den Duodenalkarzinomen handelt es sich meistens ebenfalls um Adenokarzinome, diese haben jedoch eine bessere Prognose. Aus diesem Grund sind in dieser Arbeit die Inzidenzen, die histologischen Graduierungssysteme sowie die Stagingkategorien auf das duktale Adenokarzinom bezogen.
Verwendet wird die Klassifizierung der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) von 2002 (Tabellen 1 und 2 im Anhang).

Die infauste Prognose des Pankreaskarzinoms ergibt sich aus bisher nicht gelösten diagnostischen und therapeutischen Problemen. Durch das Fehlen charakteristischer Frühsymptome sowie geeigneter Screeninguntersuchungen liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung häufig ein bereits metastasiertes und damit, entsprechend den heutigen Möglichkeiten, nicht mehr heilbares Tumorstadium vor.
Die mediane Überlebenszeit unbehandelter Patienten liegt bei etwa sechs Monaten nach Diagnosestellung. Nach einer kurativen Resektion liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei etwa 15 %, bei Patienten mit niedrigen Tumorstadien (UICC 1: T_1, T_2, N_0, M_0) kann sie sogar bis zu 40 % betragen. Ungefähr ein Drittel der Pankreaskarzinompatienten werden kurativ operiert, es werden jedoch bei 80 % der Patienten intraoperativ bereits größere Tumore und Lymphknotenmetastasen entdeckt (Heinemann et al. 2001), (Lepenies 2000).
Da die Chemotherapie mit und ohne Bestrahlung nur minimalen Effekt auf das Überleben der Patienten in fortgeschrittenen Stadien zeigt, beträgt die 5-Jahresüberlebensrate der Pankreaskarzinompatienten insgesamt nur fünf Prozent (Yeo u. Cameron 1998).
Prognostische Faktoren sind das TNM-Stadium, das Staging, die Lokalisation, die Histologie sowie die Differenzierung des Tumors.

1.2 Stand der Forschung

Die in den letzten Jahren durchgeführte molekulargenetische Forschung hat wertvolle Erkenntnisse bezüglich der Entwicklung des Pankreaskarzinoms erbracht und zur Generierung eines Tumorgenesemodells geführt. Dieses geht von einer mehrschrittigen Tumorzelltransformation mit einer Ansammlung von kritischen Mutationen in verschiedenen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen aus.

K-ras ist ein Onkogen, dessen Rolle bereits seit langem bei der Pathogenese auf molekularer Ebene bekannt ist. 70 bis 100 % der Patienten mit einem Pankreaskarzinom weisen eine K-ras-Mutation auf (Kodon 12 des K-ras Onkogens). Ras-Proteine liegen an der Plasmamembran und spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von der Zelloberfläche in den Zellkern. Als Onkogen führt K-ras zu Veränderungen der Transkription im Genom der Tumorzelle (Meyer 2002).
P53, ein Tumorsuppressorgen, repräsentiert eines der am häufigsten veränderten Gene bei Malignomerkrankungen des Menschen. Bei Pankreaskarzinomen zeigen die Patienten in

95 % der Fälle einen Allelverlust des p53 auf dem Chromosom 17p13 und in 50 % der Fälle eine Mutation dieses Gens. Bei der Mutation verliert das Gen nicht nur seine Tumorsuppressor- und Gen-Repairing-Funktion, sondern kann nach Oligomerisierung mit dem Wildtyp-p53-Protein sogar onkogene Eigenschaften erwerben, indem es nicht mehr als Transkriptionsfaktor für verschiedene Gene fungiert, die den Zellzyklus regulieren (Westphal u. Kalthoff 2003).

Ein weiteres Tumorsuppressorgen, das **p16-Gen**, codiert für ein Protein, welches an den Cyclin-D-CdK-4-Komplex bindet, und so die Phosphorilierung von Wachstumsfaktoren und Regulationsproteinen hemmt. Es greift auf diese Weise in die Zellzykluskontrolle ein. P16 ist bei 71 % der Pankreaskarzinompatienten mutiert und hat seine Funktion zur Hemmung der Wachstumsfaktoren verloren (Hruban et al. 2000).

Das Tumorsuppressorgen **DPC4**, auch **SMAD 4** genannt, ist bei 50 bis 90 % der Pankreaskarzinome inaktiviert (Hruban et al. 2000), (Hahn et al. 1996), (Subramanian et al. 2004). Das DPC4-Genprodukt ist an der Signalübertragung von TGF-Beta-1 beteiligt, welches normalerweise eine Mitoseblockade und somit einen Zellvermehrungsstopp bewirkt. Durch die Inaktivierung von DPC4 unterbleibt der Mitosestopp, und eine unkontrollierte Zellvermehrung ist die Folge (Hruban et al. 2000).
BRCA-2, ein weiteres Tumorsuppressorgen, wurde bei sieben bis zehn Prozent der Pankreaskarzinompatienten als inaktiviert nachgewiesen (Hruban et al. 2000). Es ist ebenfalls in die Kontrolle des Zellzyklus und die DNA-Reparatur involviert.

Weniger gut erforscht als die Tumorzelltransformation ist bisher die Tumorprogression mit den Prozessen der Invasion und Metastasierung, bei denen u. a. Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle und Proteasen eine wichtige Rolle spielen. Bekannt ist allerdings, dass die Wachstumsfaktoren wie der EGF (Epidermal Growth Factor) mit seinem Rezeptor EGFR, der IGF (Insuline-like Growth Factor), der HGF (Hepatocyte Growth Factor) und der TGF-Alpha (Transforming Growth Factor Alpha) im fortgeschrittenen Pankreaskarzinom überexprimiert sind. Die vermehrte Expression sowohl der Rezeptoren als auch der Liganden führt zu einem verstärkten Wachstum des Tumors und somit zu kürzeren Überlebenszeiten der Patienten. Erste Versuche zur Behandlung von Pankreaskarzinomen mit anti-EGFR-Antikörpern (Erbitux IMC-C225) in Kombination mit Gemcytabine und Bestrahlung zeigten in präklinischen Modellen, dass Wachstumsfaktoren

und ihre Rezeptoren u.U. geeignete Zielmoleküle für spezifische neue Therapiemodalitäten darstellen könnten (Westphal u. Kalthoff 2003).

Für die Loslösung des Tumors vom primären Zellverband im Rahmen der Tumorinvasion in das umliegende Gewebe ist der Abbau der extrazellulären Matrix unumgänglich. Im normalen Zellverbund sind Aufbau, Abbau und Reorganisation der extrazellulären Matrix durch ein komplexes Netzwerk von Protease/Proteaseinhibitorsystemen eng reguliert. Im Tumor ist dieses Gleichgewicht häufig gestört, und zumindest lokal finden sich Serin-, Aspartyl-, Cystein-, Threonin- und/oder Metalloproteasen überexprimiert. Sie zerstören proteolytisch die umgebenden Matrixkomponenten sowie die Basalmembran und ermöglichen so den Einbruch des Tumors in die umgebenden Strukturen sowie in die systemische Zirkulation (Allgayer et al. 2001).

Besonders gut untersucht ist das Plasminogen-Activator-System vom Urokinase-Typ (uPa). Die Serinprotease uPa kann durch Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin die Matrixelemente zerstören und aktiviert direkt die Kollagenasen MMP 2 und 9. Dies führt zur Zerstörung der Basalmembran (Allgayer et al. 2001). UPa ist in Pankreaskarzinomen im Vergleich zu gesunden Pankreaszellen stärker exprimiert (Nielsen et al. 2005).

Weitere Beispiele sind die zu den lysosomalen Proteasen gehörenden Cathepsine. Die Aspartylprotease Cathepsin D baut die extrazellulären Matrixbestandteile (z.B. Proteoglykane) direkt ab, während die Cystinprotease Cathepsin B uPa aktiviert und somit ebenfalls zum Abbau der extrazellulären Matrix beiträgt (Allgayer et al. 2001). Das Cathepsin 02 ist laut Tan et al. in Tumorzellen gegenüber Nichttumorzellen überexprimiert (Tan et al. 2003).

Aus der Gruppe der MMP, die eine wichtige Rolle bei der Proteolyse der extrazellulären Matrix spielen, sind die MMP 1 (Kollagenase-1), MMP 8 (Kollagenase-2), MMP 13 (Kollagenase-3), MMP 3 (Stromelysin-1), MMP 10 (Stromelysin-2) und MMP 2 (Gelatinase-A) als überexprimiert im Pankreaskarzinom beschrieben worden (Rigg u. Lemoine 2001), (Sun et al. 2000).

Die Metalloproteasen werden inhibiert durch die TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteases) (Bachman et al. 1999). Die komplexe Bedeutung der extrazellulären Matrix für die Tumorprogression wird verdeutlicht durch die Tatsache, dass TIMPs z.T. ebenfalls im Tumor überexprimiert vorliegen und sogar mit einer schlechteren Prognose einhergehen können (Bramhall et al. 1996), (Gress et al. 1998).

Eine weitere wichtige Gruppe im Rahmen der Tumorinvasion sind die Zelladhäsionsmoleküle. Hier sind bisher die Cadherine, die Integrine sowie einige Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie wie z.B. die ICAM als differentiell reguliert beschrieben.

E-Cadherin ist ein Ca^{2+}-abhängiges Oberflächenglykoprotein, welches ausschließlich auf epithelialen Zellen exprimiert wird. Wird dieses Molekül dereguliert oder geht gar verloren, löst sich die Zelle aus dem Zellverband. In Tumorzellen konnte der Verlust von E-Cadherin mit einer erhöhten Neigung zur Bildung von Lymphknoten- und Fernmetastasen korreliert werden. Darüber hinaus wird ein Verlust von E-Cadherin häufig in Primärtumoren beobachtet (Allgayer et al. 2001).

Die Integrine, eine weitere Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle, sind transmembrane Rezeptorproteine, die für die Interaktion zwischen Zelle und Zelle sowie zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix verantwortlich sind. Sie binden extrazellulär an die ECM-Komponenten Fibronectin und Laminin und intrazellulär an Actin. Eine Bindung von Metalloproteasen (MMP) an den Integrinrezeptor führt zu einer Lockerung der fokalen Adhäsion der Integrine und somit zu Änderungen in den Integrin-abhängigen Signalwegen in die Zelle.

FGF (Fibroblast Growth Factor) und **VEGF** (Vascular Epidermal Growth Factor) spielen eine wesentliche Rolle bei der Angiogenese, welche für die Ernährung des Tumors essentiell ist. Beide Faktoren sind im Pankreaskarzinom stärker exprimiert als in gesundem Vergleichsgewebe (Westphal u. Kalthoff 2003). Auch diese Faktoren, sowie ihre Rezeptoren, werden z.Zt. als potentielle Ziele molekularer Therapien evaluiert.

1.3 Genexpressionsprofile

Ein Schwerpunkt unserer Arbeitsgruppe ist die strukturelle und funktionelle Charakterisierung differentiell exprimierter Gene beim Pankreaskarzinom. Im Vordergrund stehen dabei Expressionsprofilanalysen mit speziell zusammengestellten cDNA-Arrays, sog. Kandidatengen-Arrays, welche die simultane Untersuchung einer Vielzahl von potentiellen Kandidatengenen erlauben.

Repräsentative cDNA-Fragmente der zu untersuchenden Gene werden in regelmäßiger Anordung und hoher Dichte auf Nylonmembranen fixiert. Diese können anschließend mit radioaktiv markierter cDNA, welche z.B. aus verschiedenen mRNA-Proben hergestellt wird, hybridisiert werden. Die Signalintensitäten können anschließend für die einzelnen Gene auf dem Array gemessen und verglichen werden, sodass Rückschlüsse auf deren Expressionsstärke in zu vergleichenden Proben gezogen werden können.

Das Kernstück der in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Arrays besteht aus mehr als 450 Genen, die im Rahmen differentieller Genexpressionsstudien identifiziert werden konnten (Geng et al. 1998), (Gress et al. 1996), (Gress et al. 1997). Die Gene wurden durch Zellzyklus-Kontrollgene, Phosphatasen, seruminduzierbare Gene und Transkriptions-faktoren ergänzt, so dass eine Gesamtzahl von rund 2000 unterschiedlichen Genen zur Verfügung steht.

Aus den in cDNA-Array-Analysen gewonnenen umfangreichen Daten kann mit Hilfe unterschiedlicher statistischer und bioinformatischer Methoden eine Vielzahl von Informationen gewonnen werden. Im einfachsten Fall werden die Expressionsprofile von zu vergleichenden Proben (z.B. Tumorgewebe vs. gesundes Gewebe des gleichen Organs) mit einfachen statistischen Tests verglichen, um Gene zu identifizieren, deren Expression sich in beiden Gruppen signifikant unterscheidet. Die Bedeutung dieser einzelnen Gene und ihrer Genprodukte für die Tumorentstehung und –progression kann dann in individuellen Untersuchungen aufgeklärt und ihre Eignung für neue diagnostische oder therapeutische Ansätze überprüft werden.

Wesentlich komplexer ist die vergleichende Analyse ganzer Expressionsprofile, um anhand typischer Expressionsmuster oder Gen-Signaturen die Zuordnung einzelner Proben zu vordefinierten diagnostischen Klassen oder sogar die Definition neuer, zuvor nicht unterscheidbarer diagnostischer Subtypen („class discovery“) zu ermöglichen (Golub et al. 1999). Eine der ersten Methoden zur Untersuchung von Expressionsmustern ist die sog.

Clusteranalyse (Eisen et al. 1998). Clusteranalysen können „überwacht“ oder „unüberwacht“ durchgeführt werden (Tefferi et al. 2002). Im Rahmen der „class prediction“ werden überwachte Clusteranalysen durchgeführt, in denen der statistische Algorithmus darauf trainiert wird, spezifische Genexpressionsmuster aus einer zuvor bekannten Klasse von Genen oder Experimenten zu erkennen, um neue, unbekannte Proben in diese prädefinierten Klassen einzuordnen. Unüberwachte Clusteranalysen hingegen beinhalten gemäß der Zielsetzung der „class discovery“ das Gruppieren von Proben allein auf der Basis ähnlicher Expressionsmuster. Das am häufigsten genutzte unüberwachte Clusterverfahren in Genexpressionsanalysen ist die hierarchische Cluster-analyse, die mit Hilfe verschiedener Abstandsmaße die Ähnlichkeitsverhältnisse zwischen den einzelnen untersuchten Proben errechnet und in Form von Binär-Bäumen (Dendrogrammen) darstellt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der oben erwähnten Kandidatengen-Arrays Expressionsprofile von frühen und späten Stadien des Pankreaskarzinoms zu vergleichen. Dazu sollte eine größere Anzahl Primärgewebe von Pankreaskarzinomen verschiedener Stadien analysiert und Genexpressionsänderungen im Verlauf der Tumorprogression untersucht werden. Durch Vergleich der Expressionsprofile und der zur Verfügung stehenden klinischen Daten sollten Gene identifiziert werden, deren Expression spezifisch mit den Prozessen der lokalen Invasion, der Lymphknotenmetastasierung und der Fernmetastasierung assoziiert sind. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob anhand der Expressionsprofile eine Vorhersage des Tumorstadiums getroffen werden kann, um damit die Basis für eine wesentlich differenziertere Diagnostik des Pankreaskarzinoms zu schaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

2.1.1 Art der Studie und Datenerhebung

In der retrospektiven Beobachtungsstudie wurden 55 Patienten mit Pankreaskarzinom rekrutiert. Sie erhielten alle eine Whipple-Operation, wobei Material für eine DNA-Hybridisierung gewonnen werden konnte (Versuchsablauf siehe unten).
Sechs der Tumorpatienten erhielten adjuvant zu der Operation lokale Chemotherapie, 18 bekamen sie systemisch.
Aus den jeweiligen Operationsberichten konnten Daten über das Alter bei OP, das Geschlecht, das Tumorstadium, den Lymphknotenbefall, die Metastasierung, den Resektionsrand sowie über die Histologie (Schnellschnitt) entnommen werden.
Aus den Follow-up-Fragebögen, die die Patienten, Angehörigen oder der Hausarzt ausfüllten, konnten postoperative Therapie, Überleben nach OP, Todesursache und Zeitpunkt des Todes nach OP sowie das Auftreten von Rezidiven ermittelt werden.
Aus den Berichten der Pathologen waren histologische Aussagen zum Resektionsrand, histologische Klassifikation der Gewebeproben, die genaue TNM-Klassifikation sowie die Einteilung der Tumore in die UICC-Klassifikation 2002 möglich.

2.1.2 Einverständnis der Patienten und der Ethikkommission

Die Studie wurde mit dem schriftlichen Einverständnis der Patienten, der unabhängigen Ethikkommission der Ärztekammer aus Ulm sowie der unabhängigen Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes durchgeführt.

2.2 Herstellung des Mikroarrays und Auswahl der Gene

Es wurden insgesamt etwa 2100 Gene untersucht, von denen eine Beteiligung an der Onkogenese, der Metastasierung sowie der Tumorprogression in Pankreaskarzinomen vermutet wurde. Die Herstellung der Arrays erfolgte bereits in früheren Arbeiten der AG Gress.

Von den etwa 2100 Genen gehörten etwa 1700 zu bestimmten funktionellen Gruppen wie den Kinasen, Proteasen, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren. Ebenso waren Serum Response Genes, Extrazelluläre-Matrix-Gene und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vorhanden. Repräsentative cDNA-Abschnitte zu diesen Genen wurden vom RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin) bezogen. Jedes dieser Gene ist zusammen mit seiner Gen-ID, Image Clone ID und dem Namen der Human Genome Organisation (HUGO) aufgeführt (http://www.Discover.nci.nih.com).

Die cDNA-Abschnitte der restlichen 631 Gene stammten aus einer lokalen cDNA-Bibliothek der Arbeitsgruppe Gress.

Darunter fallen 426 Gene, die auf Grund ihrer differentiellen Expression in Pankreaskarzinomen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von der Arbeitsgruppe Gress bereits in vorherigen Projekten selektiert worden und zu einer Genbibliothek („XS-Bibliothek“) zusammengestellt worden waren (Gress et al. 1996).

Vorliegende Homologien zu Genen aus DNA-Datenbanken sind in den Genlisten (Tabellen 3-12 im Anhang) vermerkt. Die restlichen 205 cDNA-Abschnitte wurden durch PCR-Reaktionen unter Verwendung von RNA aus Pankreasgeweben (Pankreaskarzinom, Pankreatitis und gesundes Pankreas) und degenerierten Primern gegen Homebox- oder Zinkfingerdomänen gewonnen. Diese cDNA-Abschnitte repräsentieren putative Transkriptionsfaktoren, die für die Regulation in Pankreas-Geweben eine wichtige Rolle spielen. Vorliegende Homologien zu Genen aus DNA-Datenbanken sind in den Listen (Tabellen 3-12 im Anhang) vermerkt.

Jedes Gen wurde durch mindestens einen Abschnitt seiner cDNA-Sequenz auf den Arrays repräsentiert. Um zufälligen Fehlern vorzubeugen, wurde jedes Gen zweimal pro Array gespottet.

2.3 Gewinnung und Aufarbeitung des Tumorgewebes

Das bei der Whipple-OP gewonnene Material wurde folgendermaßen aufgearbeitet:

2.3.1 Gewinnung von RNA aus dem Tumorgewebe

Zur RNA-Extraktion wurden schockgefrorene Gewebeproben auf Trockeneis mit Mörser und Pistill zerkleinert und in RLT-Puffer (Qiagen GmbH Hilden) gelöst. Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte anschließend mit Hilfe des „RNeasy Midi Kits“ (Qiagen GmbH Hilden) nach Angaben des Herstellers:
1 Volumen Zelllysat wurde mit 1 Volumen 70 %iger Ethanollösung vermischt und auf eine Säule überführt. Anschließend wurde diese fünf Minuten bei 3000 bis 5000 g zentrifugiert und mit RW-Puffer und RPE-Puffer gewaschen. Nach Eluierung der RNA mit RNAsefreiem ddH_20 konnte deren Konzentration mittels Photometer festgestellt werden. Anschließend wurde die Qualität der RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.3.2 Herstellung von radioaktiv markierter cDNA

Die Tumor-RNA wurde mittels Strip-EZ^{TM} RT-Kit (Firma Ambion) folgendermaßen in ^{33}p-αATP markierte cDNA überführt:
25 µg RNA wurden mit 2 µl Oligo-dT-Primern für fünf Minuten bei 65°C denaturiert. Anschließend wurde die Lösung auf 42°C abgekühlt und 2 µl 10 x RT-Puffer, 2 µl 10 x dNTP Solution, 1 µl MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus) und 2 µl ^{33}p-αATP dazugegeben und zwei Stunden bei 37°C inkubiert.
Um noch vorhandene RNA zu eliminieren wurde anschließend eine RNAse-Verdau mit 1 µl RNAse 30 Minuten lang bei 37°C durchgeführt.
Anschließend wurde die cDNA mit dem Nucleotide Removal Kit aufgereinigt. Dazu wurde die cDNA mit 200 µl PN-Puffer eine Minute bei 6000 rpm zentrifugiert. Dann wurde die Lösung zweimal mit 500 µl Pe-Puffer gewaschen, ebenfalls eine Minute bei 6000 rpm zentrifugiert und eine weitere Minute bei 12 000 rpm getrocknet.
Anschließend wurde sie mit 50 µl EDTA bei 12 000 rpm eluiert.

2.4 Hybridisierung von radioaktiv markierter cDNA mit dem Mikroarray

Die cDNA-Membranen wurden 30 Minuten in 0,5 %iger SDS-Lösung bei 80°C gewaschen und anschließend eine Stunde bei 50°C mit einem ULTRArray Hyb Buffer der Firma Ambion prähybridisiert.

Zu der radioaktiv markierten Tumor-cDNA-Probe wurden 50 µl 20x SSC, 20 µl 1 % SDS, 70 µl mM Tris und 45 µl humane Cot-I-DNA (1mg/1ml) dazugegeben und fünf Minuten auf 95°C denaturiert und anschließend bei 56 °C für 40 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die beiden Proben zusammengegeben und bei 50°C 16 Stunden hybridisiert.

Die Filter wurden zweimal fünf Minuten bei Raumtemperatur in SSC mit 0,5 %iger SDS und zweimal 15 Minuten bei 68°C in 0,5 x SSC mit 0,5 % SDS gewaschen.

Die Filter wurden in Kunststofffolie gepackt und etwa fünf Tage auf einem Phosphorscreen exponiert.

Durch die Exposition auf dem Phosphorscreen (Amersham Biosciences, Freiburg) wurden die Signale aufgezeichnet, anschließend von einem Phosphorimager (STORM 860, Amersham Biosciences, Freiburg) ausgelesen und die visuellen Ergebnisse auf entsprechenden Medien (CD-Rom) abgespeichert.

2.5 Bildliche und statistische Auswertung

2.5.1 Quantifizierung und Auswertung der Arrays

Die im Phosphorimager ausgelesenen radioaktiven Signale wurden mit Hilfe der „**Array Vision“** Software (Imaging Research, St. Catharines, Canada) quantifiziert und ausgewertet (siehe Abbildung 1).

Um die einzelnen Bildpunkte zu erfassen, wurde eine Gitter-Maske (Grid) erstellt, die gleichzeitig der Erfassung der Hybridisierungssignale und der Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Genen diente. In Abbildung 1 ist ein Beispiel für die Auswertung eines Arrays mit einem „Grid“ gezeigt. Die „**Array Vision“** Software erfasst nur die Bildpunkte innerhalb der Kreise und quantifiziert deren Signalintensitäten. Aus diesem Grund erfolgte im ersten Schritt die grobe Anpassung des idealen Musters durch manuelle Verzerrung an das reale Muster auf der Membran. Der nachfolgenden Feinanpassung des Rasters schloss sich eine visuelle Kontrolle und gegebenenfalls eine manuelle Korrektur der Position einzelner Kreise des Gitters an. Verunreinigte Spots wurden durch Wegnahme der Kreise von der Auswertung ausgeschlossen.

Um den Vergleich mehrerer Experimente zu ermöglichen, wurde in der Auswertung mit den normalisierten Intensitätswerten der Signale gearbeitet, die sich aus der Differenz der Signalintensität und des Hintergrunds dividiert durch den Mittelwert aller Signale des Arrays ergaben. Da zu jedem Gen zwei Werte (Doppelspots) vorlagen, wurde deren Mittelwert ermittelt. Pro Filter wurden über 700 Gene gespottet. Die drei Filter ergaben insgesamt ca. 2100 gespottete Gene. Für die Auswertung wurden nur Hybridisierungen mit deutlichen Signalergebnissen verwendet.

Bei niedrigen Intensitäten sind technische Schwankungen und wirkliche Expressionsunterschiede schwer zu unterscheiden. Hier besteht die Gefahr, dass Gene in zwei Gruppen als unterschiedlich exprimiert interpretiert werden, obwohl lediglich ein minimaler Expressionsunterschied vorliegt. Um zufällige und unwesentliche Schwankungen in der Expression der Gene herauszufiltern, wurden zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene nur die Gene berücksichtigt, bei denen in mindestens einer der miteinander verglichenen Gruppen der Mittelwert mindestens 0,5 (d.h. die Hälfte der mittleren Signalintensität aller Gene auf dem Array) betrug. Weitere Kriterien zur Festlegung eines Gens als differentiell exprimiert waren ein mindestens zweifacher Unterschied zwischen

den beiden Mittelwerten des Gens in den zu vergleichenden Gruppen sowie ein p-Wert des T-Tests kleiner oder gleich 0,05.

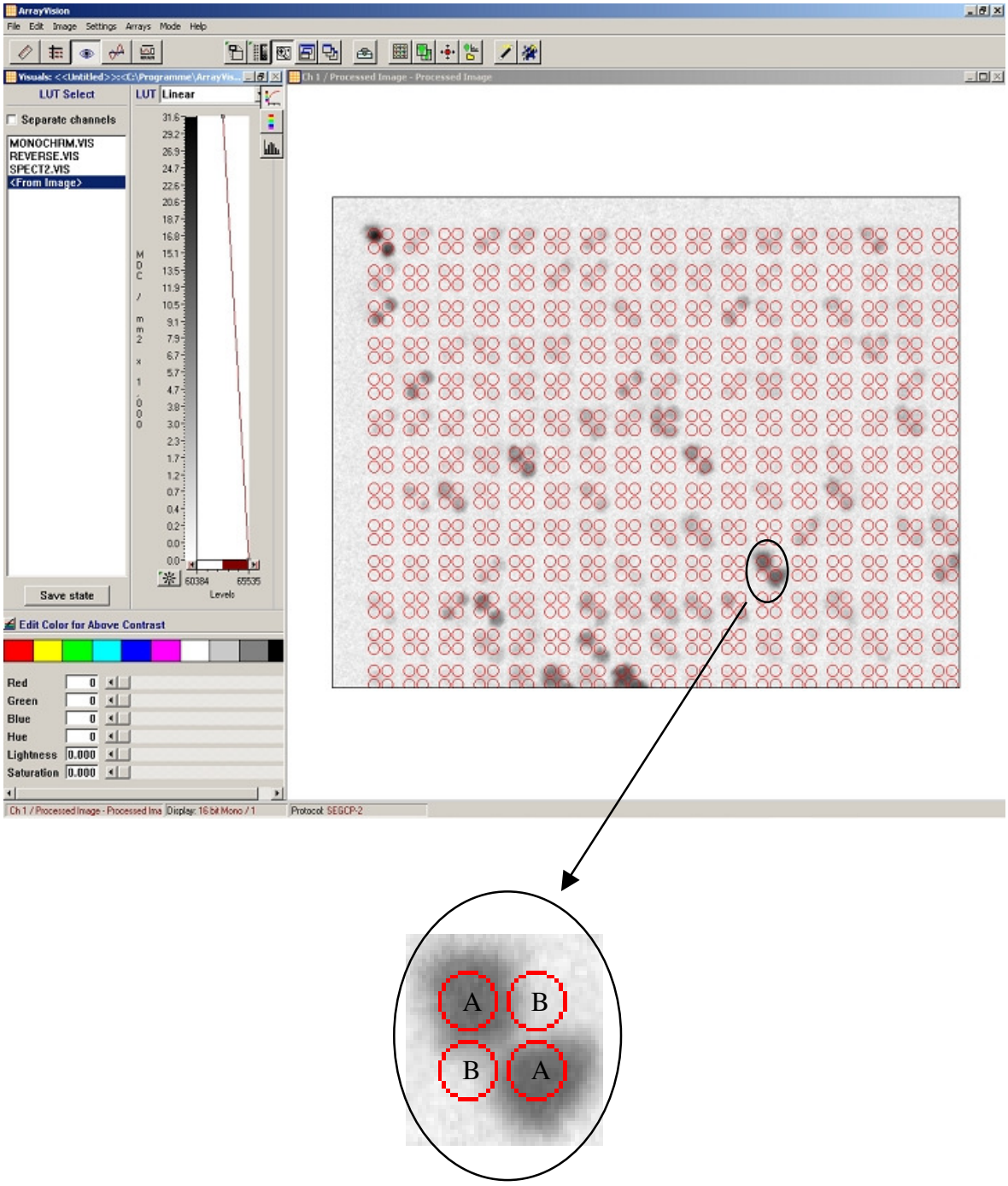

Abb. 1: Array Vision

Oben sind die Hybridisierungssignale eines Arrays dargestellt. Über die Spots wurde eine Gittermaske gelegt (rot), die manuell genau eingestellt werden musste.
Unten ist ein Ausschnitt mit Gen A (graue diagonal gegenüberliegende Spots) und Gen B (weiß) dargestellt. Jedes Gen ist doppelt gespottet.

2.5.2 Bestimmung von Expressionsmustern mittels hierarchischen Clusteranalysen

Um die Ähnlichkeit der Expressionsmuster innerhalb einer Gruppe zu untersuchen, wurden unüberwachte hierarchische Cluster-Analysen durchgeführt. Es wurden nur die Hybridisierungsdaten, die einen Mindestexpressionswert von $\geq 0{,}5$ aufwiesen, logarithmisch transformiert und die Ähnlichkeitsabstände mit „Complete Linkage Clustering“ ermittelt (Eisen et al. 1998). Die Ergebnisse des Clusterings wurden mit Hilfe der „Tree-View“-Software (Eisen et al. 1998) bildlich dargestellt (siehe Ergebnisteil).

2.5.3 Überlebenszeitanalysen

Zur Berechnung von Überlebenszeitkurven wurde die Kaplan-Meier-Methode verwendet (Harms 1988). Diese gibt an, wie viele der zu beobachtenden Patienten nach einer bestimmten Zeit noch am Leben sind. Die Wahrscheinlichkeit, am Ende eines bestimmten Monats noch zu leben, ergibt sich aus dem Produkt der Wahrscheinlichkeit, am Anfang diesen Monats zu leben und der Wahrscheinlichkeit, diesen Monat zu überleben.
Die Wahrscheinlichkeit, den Monat zu überleben, errechnet sich aus dem Quotienten aus der Anzahl der überlebenden Personen und der beobachteten Patienten.
Die Kaplan-Meier-Methode wurde sowohl auf alle Pankreaskarzinompatienten als auch für den Lymphknotenbefall (N_0 versus N_1) durchgeführt. Da es nur neun Patienten mit Fernmetastasen gab, wurde die Kaplan-Meier-Methode nicht für die Fernmetastasierung angewendet.

Um Aussagen darüber machen zu können, ob die Unterschiede in zwei Überlebenszeitkurven statistisch signifikant sind, wurde der Log-Rank-Test durchgeführt. Hierzu wurden alle Todesfälle in zeitlicher Reihenfolge aufgelistet. Außerdem wurde sowohl die Gesamtpersonenzahl und die Anzahl der Personen der einzelnen Gruppen aufgelistet, die noch unter Beobachtung standen. Danach wurden für die beiden Gruppen getrennt die erwarteten Todesfälle berechnet.
Der Gesamterwartungswert ergibt sich aus der Summe der Einzelerwartungswerte für jeden Monat. Der Einzelerwartungswert für einen Monat x in einer Gruppe ergibt sich aus

dem Produkt aus der Anzahl aller Todesfälle in dem Monat x mit den in dieser Gruppe unter Beobachtung stehenden Patienten dividiert durch die Anzahl aller unter Beobachtung stehender Patienten.

Formel: Erwartungswert N_0 zum Zeitpunkt Monat x = (Zahl der Todesfälle) * (in N_0 unter Beobachtung stehende Patienten) / (insgesamt unter Beobachtung stehende Patienten) (Harms 1988).

Der Log-Rank-Test muss die Frage beantworten, ob die beobachtete Differenz zwischen erwarteter Anzahl von Todesfällen und tatsächlicher Anzahl von Todesfällen mit der Nullhypothese vereinbar ist. Letztere besagt, dass ein zufälliger Zusammenhang besteht. Hierzu wird der χ^2-Wert berechnet:

χ^2-Wert : N_{0t}: tatsächliche Todeszahl der Gruppe N_0
N_{0e}: erwartete Anzahl von Todesfällen in N_0
N_{1t}: tatsächliche Todeszahl der Gruppe N_1
N_{1e}: erwartete Anzahl von Todesfällen in N_1

$$\chi^2 = \frac{(N_{0t} - N_{0e})^2}{N_{0e}} + \frac{(N_{1t} - N_{1e})^2}{N_{1e}}$$

In einer χ^2-Tabelle kann der kritische Wert für χ^2 entnommen werden.

Wenn der errechnete Wert gleich oder größer als der Tabellenwert ist, muss ein signifikanter Zusammenhang angenommen werden und die Hypothese, dass ein zufälliger Zusammenhang besteht, verworfen werden.

2.6 Erstellung eines Prognosefaktors mittels Cox Regressionsmodell (Proportional Hazard Model)

In der Analyse von Verlaufsdaten stößt man an die Grenze der multiplen Regression. Zum einen sind Verlaufsdaten im Allgemeinen nicht normalverteilt (meist exponentiell oder nach Weibull), zum anderen sind die Daten meist zensiert. Eine Zensur lag in dieser Arbeit vor, da die Studie vor dem Tod des letzten Patienten beendet wurde, fünf Probanden die Mitarbeit abgebrochen haben und bei einigen Patienten lediglich das Intervall bekannt war, in dem der Patient verstorben war. Zur Analyse solcher Daten wird i.d.R. die Cox Regression, ein semiparametrisches Verfahren zu Analyse von zensierten Verlaufsdaten, verwendet.
Hierbei geht man von einem proportionalen Hazard-Modell aus. Es wird der Einfluß von Prädiktorvariablen auf eine Zielvariable untersucht. Dabei wird die einzelne Gewichtung der Prädiktorvariablen über einen Koeffizienten dargestellt.
Für die Erstellung der Prädiktorvariablen wurden die signifikant differentiell exprimierten Gene des höchsten Tumorstadiums, der Lymphknotenmetastasierung und der Fernmetastasierung herangezogen. Ihre normalisierten und logarithmierten Expressionswerte flossen in die Prädiktorvariable ein.

Das Cox Regressionsmodell verwendet folgende Formel (Proportional Hazardfunktion):

$$h(t,x)=l(t).\exp(xb)$$

l(t)=Baseline Hazardfunktion
xb=Regressionsbeschreibung der Prädiktorvariablen x
x=Prädiktorvariable
t=Zeit

Durch einfaches Umstellen und Logarithmieren erhält man ein lineares Modell, welches sich leicht schätzen lässt:

$$Log[h(t,x)/l(t)]=xb$$

Die Überlebensfunktion lautet:

$$S(t) = [L(t)]^{Log[h(t,x)/h(t)]}$$

Aus den Formeln erkennt man, dass die Cox Regression von einem proportionalen Hazard ausgeht, das heißt, der Wert ändert sich nicht über die Zeit. Deshalb spricht man statt der Cox Regression auch vom Proportional Hazard Model (Cox 1972).

Im Rechenprogramm „R“, erhältlich unter http:// www.r-project.org, lautet die Formel:

Coxph(surv(time,status)~X)

Time:	Zeit zwischen OP und letzter Umfrage
Status:	Tod (Status 1) oder lebendig (Status 0)
X:	die errechnete Summe aller Expressionswerte.

Falls mehrere Parameter getrennt betrachtet werden sollen, können die Werte von T, N und M auch getrennt in das Cox-Modell einfließen:
Formel: Coxph(surv(time,status)~X+Y+Z)

Time:	Zeit zwischen OP und Umfrage
Status:	Tod (Status 1) oder lebendig (Status 0)
X:	Summe aller Expressionswerte für T
Y:	Summe aller Expressionswerte für N
Z:	Summe aller Expressionswerte für M

Das Programm errechnet dann die Wahrscheinlichkeit für den Eintritt eines Ereignisses, hier der Tod, abhängig von der Variablen X bzw. von den Variablen X, Y und Z. Außerdem berechnet es die Standardabweichung und den T-Test. Genaue Computer-befehle und Ergebnislisten befinden sich im Anhang (siehe 6.2).

2.7 Einordnen der differentiell exprimierten Gene in funktionelle und übergeordnete Gruppen

2.7.1 GO-Miner

Für die Suche nach übergeordneten funktionellen Gruppen innerhalb von Listen differentiell exprimierter Gene wurden die funktionellen Annotationen der Gene Ontology (GO–Datenbank), erhältlich unter http://www.geneontology.org/, genutzt. Die GO-Datenbank stellt mit Hilfe eines standardisierten Vokabulars Informationen zur zellulären Lokalisation, molekularen Funktion und Beteiligung an biologischen Prozessen für alle bekannten humanen Genprodukte zusammen. Die gesamte Ontologie ist in Form eines hierarchisch geordneten „Stammbaums“ mit sequentiell detaillierter werdenden Verzweigungen organisiert (Abb. 2).

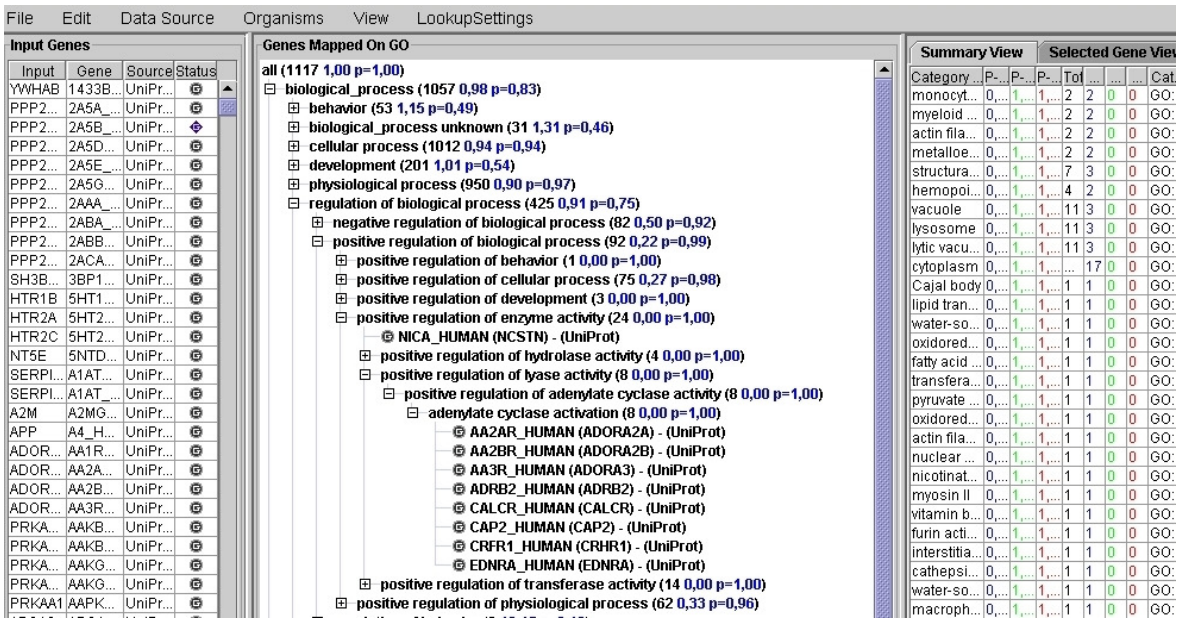

Abb. 2: GO-Miner

Auf dem Screenshot sind links sämtliche Gene tabellarisch aufgeführt. Der „Status“ gibt an, ob das Gen über- oder unterexprimiert ist. In der Mitte ist der „Genbaum“ dargestellt. Die verschiedenen funktionellen Gengruppen zweigen sich in Untergruppen auf. Rechts sind die Expressionswerte mit den dazugehörigen p-Werten aufgelistet.

Das Programm GO-Miner (erhältlich auf der Internetseite http://discover.nci.nih.gov/gominer/htgm.jsp) analysiert für Listen differentiell exprimierter Gene die Verknüpfungen mit entsprechenden funktionellen Kategorien (GO-Terms) innerhalb der Datenbank und berechnet, ob einzelne dieser Kategorien im Vergleich zur Gesamtheit der Gene auf den Arrays unter den differentiell exprimierten Genen signifikant überrepräsentiert sind.

2.7.2 Venn-Master

Da den meisten Genen mehrere GO-Terms aus unterschiedlichen hierarchischen Ebenen zugeordnet sind, werden in der GO-Miner-Analyse häufig mehrere GO-Terms als signifikant überrepräsentiert detektiert, die jeweils mit den gleichen Sets differentiell exprimierter Gene assoziiert sind. Da diese Redundanzen die Interpretation der Ergebnisse erschweren, wurde die Visualisierung der GO-Miner-Analysen mit Hilfe des Programms Venn-Master (erhältlich auf der Seite http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/mitarbeiter/HKestler/vennm/doc.html) realisiert. Venn-Master stellt Mengen wie z.B. Genkategorien in Form von Zehnecken dar, die sich überlappen können. Gene, die in zwei Kategorien enthalten sind, befinden sich auf den Überlappungen zweier Zehnecke. Zusätzlich zur übersichtlicheren Präsentation von GO-Miner-Ergebnissen können aus dieser Darstellung funktionell relevante Assoziationen zwischen Kategorien, die in der GO-Hierarchie nicht verknüpft erscheinen, abgeleitet werden.

3 Ergebnisse

In die Studie wurden insgesamt 55 Patienten aufgenommen.

Sieben Patienten litten an einem Papillenadenokarzinom, zwei an einem Zystadenokarzinom und 46 an einem duktalen Adenokarzinom. Es wurde ein Verhältnis von männlich zu weiblich von 34:21 festgestellt.

3.1 Alter

Das Durchschnittsalter der Karzinompatienten betrug bei OP 63,07 Jahre. Die Altersverteilung ist in der folgenden Abbildung zu sehen. Es ist eine deutliche Akkumulation in den Jahren 52 bis 73 sichtbar.

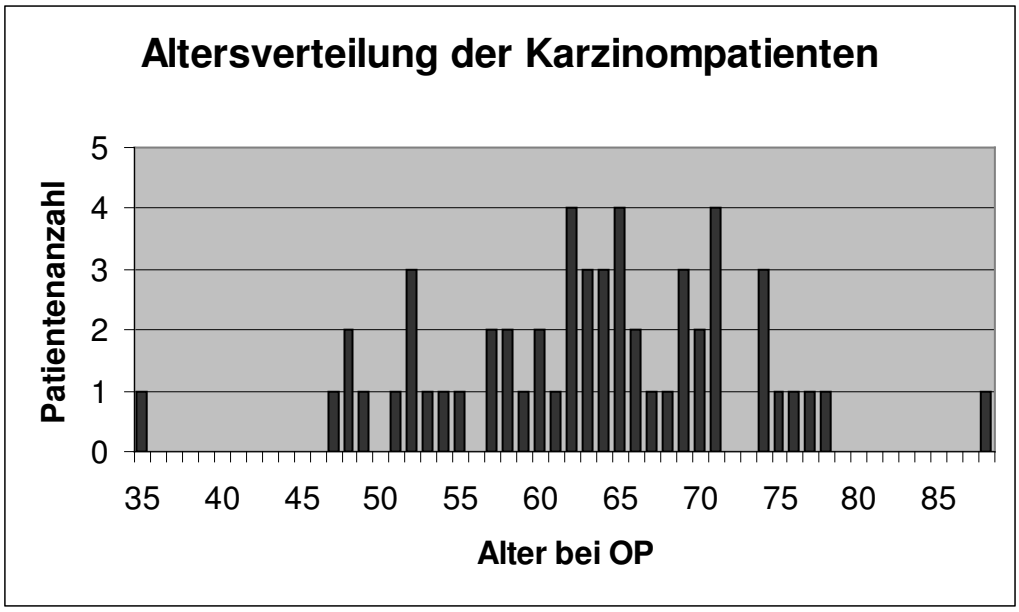

Abb. 3: Alter bei OP

Dargestellt sind horizontal die Lebensjahre und vertikal die Anzahl der Patienten.

3.2 Überleben

Von den 55 Patienten starb ein Patient in den zwei postoperativen Tagen, acht weitere überlebten die ersten sechs Monate nicht. In den Monaten sechs bis 12 verstarben zehn weitere Patienten, in den Monaten 12 bis 24 verstarben zusätzlich sechs Patienten.
Von den noch lebenden Patienten überlebten zum Zeitpunkt der letzten Umfrage 41 Patienten die ersten sechs postoperativen Monate, 31 Patienten die Monate sechs bis 12 und 25 Patienten überlebten die Monate 12 bis 24. 25 Patienten lebten bis zum Studienende (34 Monate).
Bei fünf Patienten wurden die Angaben verweigert bzw. die Mitarbeit abgebrochen.
Anschließend wurde das Überleben nach Kaplan-Meier (siehe 2.5.3) für jeden Monat berechnet und graphisch dargestellt.

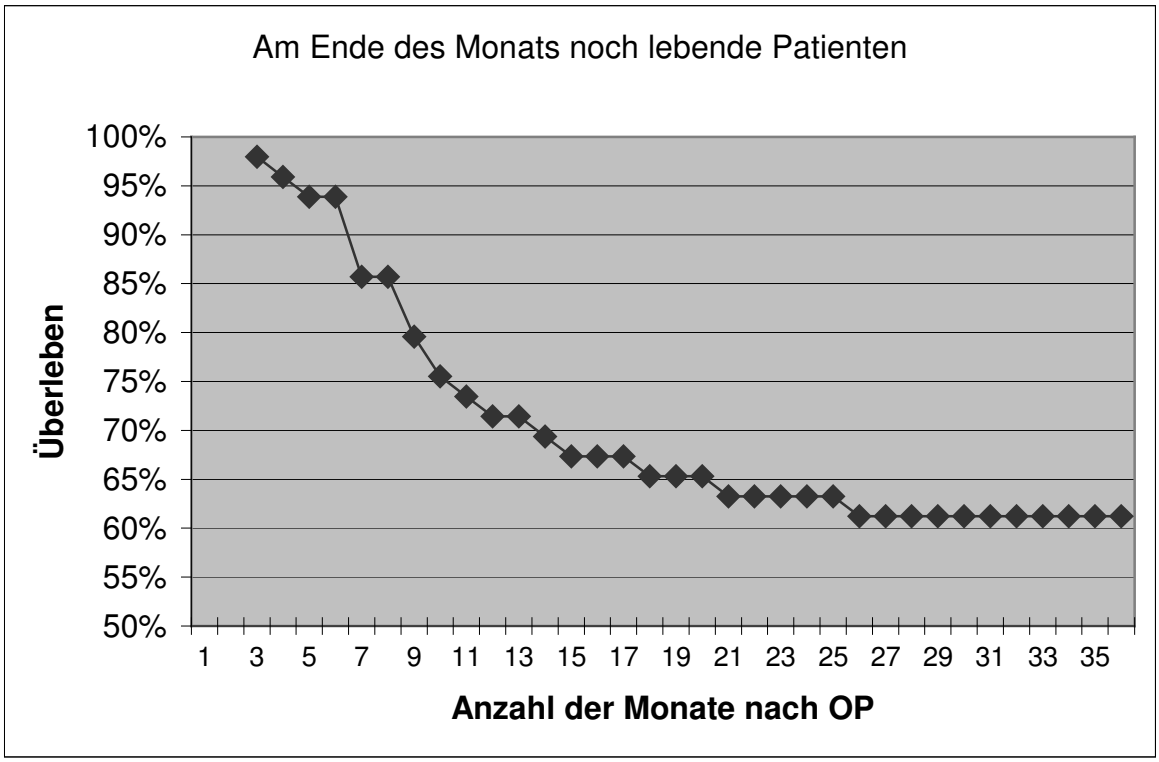

Abb. 4: Überleben nach Kaplan-Meier

Hier ist die Überlebenswahrscheinlichkeit für jeden Monat nach OP dargestellt. Die y-Achse gibt die Wahrscheinlichkeit an, am Ende des auf der x-Achse angegebenen Monats noch zu leben.

3.3 Auswertung der Genexpressionsprofile

Um zu untersuchen, inwieweit sich die einzelnen Kriterien wie die Tumorprogression, die Lymphknoten- und Fernmetastasierung auf transkriptioneller Ebene widerspiegeln, wurden Expressionsprofilanalysen durchgeführt. Dies erfolgte durch einen von der Arbeitsgruppe Gress in früheren Arbeiten selbst hergestellten cDNA-Array. Dieser wurde mit der aus dem Tumorgewebe gewonnenen und radioaktiv markierten cDNA hybridisiert. Die Hybridisierungssignale wurden mittels „Phosphorimager“ erfasst und mit Hilfe des Softwareprogramms „Array-Vision“ quantifiziert und ausgewertet. Es wurden nur die Gene als statistisch signifikant differentiell exprimiert erfasst, die folgende Kriterien erfüllten: mindestens einer der normalisierten Mittelwerte betrug mindestens 0,5; die Mittelwerte unterschieden sich mindestens um den Faktor 2 und der T-Test erreichte einen Wert von maximal 0,05. Die Expressionsprofile wurden nun innerhalb bestimmter Kriterien untersucht.

3.3.1 Vergleich der Tumorstadien (T-Stadien)

Um zu untersuchen, wie sich die Expressionsprofile zwischen den verschiedenen Tumorstadien verhielten, wurden vier Gruppen gebildet. Von den 55 Patienten wiesen fünf das Stadium T_1 auf, sechs das Stadium T_2, 34 das Stadium T_3 und zehn das Stadium T_4 (Einteilungskriterien siehe Anhang Tabelle 1).

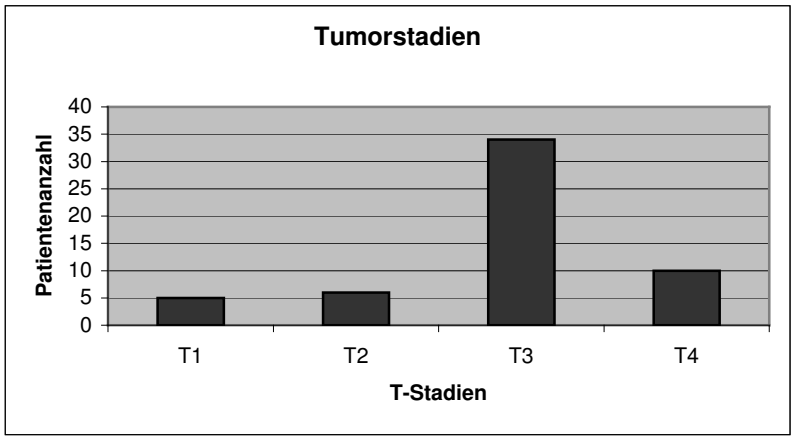

Abb. 5: Tumorstadien
Dargestellt sind die Anzahl der Personen pro Tumorstadium.

Insgesamt konnten 130 Gene als differentiell exprimiert bezüglich des Tumorstadiums selektiert werden. Für den Vergleich von T_1 mit T_2 konnten sechs signifikant unterschiedlich exprimierte Gene, für den Vergleich von T_2 mit T_3 43, für den Vergleich von T_3 mit T_4 14 und bei dem Vergleich von T_1 mit T_4 67 unterschiedlich exprimierte Gene ermittelt werden.

Stark vertreten war die Gruppe der Gene, die eine Rolle im Metabolismus spielen. Hierzu gehörten einige Kinasen, Phosphatasen sowie mitochondriale Gene. Ebenso stark repräsentiert war die Gruppe der Gene, die für die Zellproliferation und das „Zellsurvival" codieren. In diese Gruppe gehörten die CDC-Gene, die Zykline, die Transkriptionsfaktoren sowie einige weitere Kinasen.

Des Weiteren waren Gene, die für Strukturproteine und das Zytoskelett codieren, vertreten. Hier sind das Alpha-Tubulin, Actin und Actinin sowie das Vimentin zu nennen.

Ebenso waren Proteine der extrazellulären Matrix, wie die Cathepsine W und L, das Myosin 2, das Beta-Integrin, das Furin und das Hexabrachion sowie Zelladhäsions-moleküle wie Claudin-7 und mehrere Prostaglandine und ihre Rezeptoren differentiell exprimiert.

Die verschiedenen Gengruppen zeigten ein sehr homogenes Muster ihrer Expression im Verlauf der einzelnen Tumorstadien. So wiesen die Gene, die für den Metabolismus, die extrazelluläre Matrix und das Zytoskelett codierten, eine vermehrte Expression in jedem Tumorstadium im Vergleich mit dem tiefer liegenden Stadium auf. Lediglich die für die Proliferation codierenden Gene zeigten zum Teil ein inhomogenes Verhalten. Besonders im Vergleich von T_3 mit T_4 wiesen einige Transkriptionsfaktoren eine Herunterregulierung im höheren Stadium auf.

Um über die Betrachtung einzelner Gene hinaus zu ermitteln, welche funktionellen Kategorien im Vergleich zur Gesamtheit der Gene auf den Arrays unter den differentiell exprimierten Genen signifikant überrepräsentiert waren, wurden mit Hilfe des GO-Miner-Programms die in der Gene Ontology-(GO)-Datenbank hinterlegten Verknüpfungen mit spezifischen GO-Terms analysiert und statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden anschließend mit Hilfe des Venn-Master-Programms visualisiert, um Überschneidungen einzelner Kategorien durch gemeinsam enthaltene Gene darstellen zu können. Die Analysen ergaben, dass die detektierbaren funktionellen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Tumorstadien vor allem Zelloberflächen-, ECM- und Zell-Zell-Kommunikations-assoziierte Kategorien betrafen (Abb. 6).

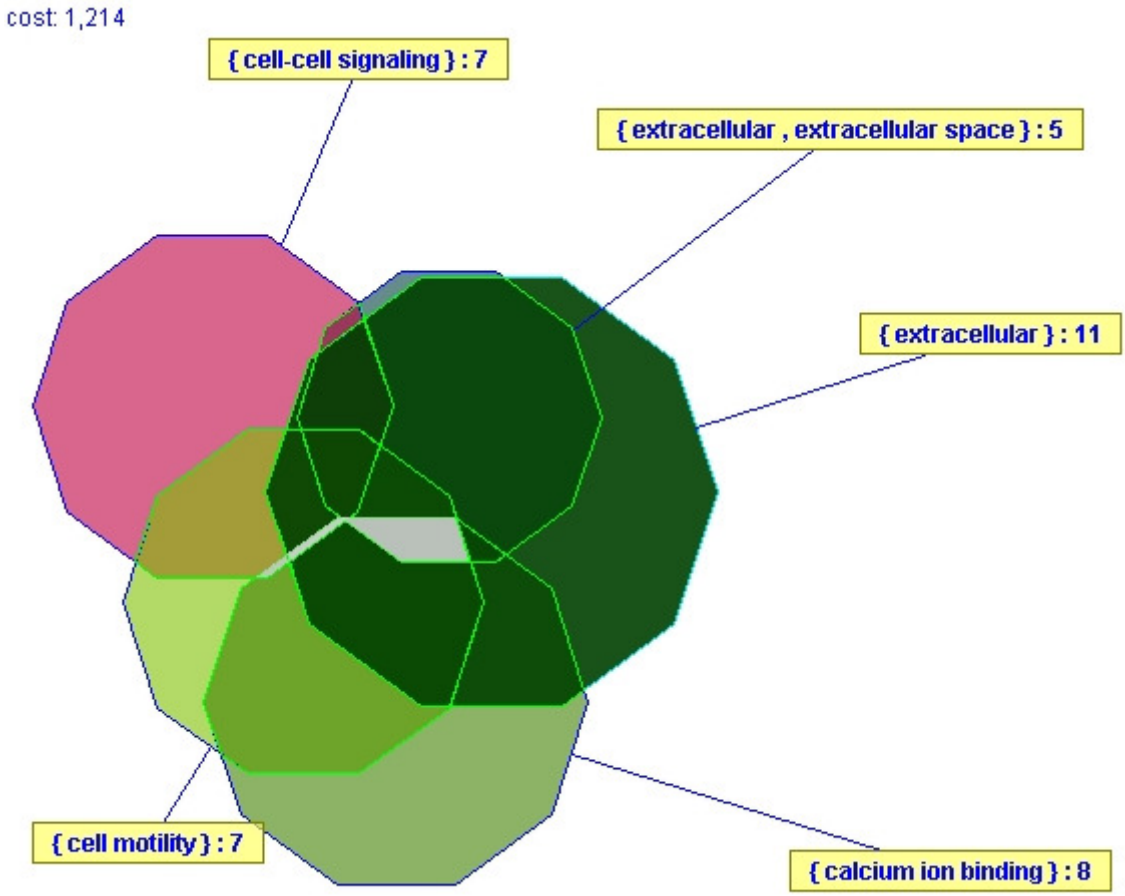

Abb. 6: Venn Master-Visualisierung der GO-Miner-Analysen

Dargestellt sind die überrepräsentierten differentiell exprimierten Gene in funktionellen Kategorien (GO-Terms). Die Markierungen zeigen den Namen der jeweiligen Kategorie in der GO-Datenbank sowie die Anzahl der enthaltenen differentiell exprimierten Gene. Überlappende Flächen zeigen an, dass Gene zu mehreren der dargestellten Kategorien gehören.

Um Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede der Expressionsmuster innerhalb eines Tumorstadiums und zwischen einzelnen Tumorstadien zu untersuchen, wurden unüberwachte hierarchische Cluster-Analysen durchgeführt. Dabei wurden die Gene, die zuvor als differentiell reguliert detektiert worden waren (s.o.), logarithmisch transformiert und die Ähnlichkeitsabstände ermittelt (Eisen et al. 1998). Anschließend wurden die Ergebnisse mit Hilfe des „TreeView"-Programms (Eisen et al. 1998) in Form von Dendrogramm-Bäumen visualisiert.

Im Vergleich der Stadien T_1 (n=5) und T_2 (n=6) waren wie erwähnt nur sechs Gene signifikant differentiell reguliert. Trotzdem ergab die Clusteranalyse eine weitgehende Trennung der beiden Stadien auf der Basis der Expression dieser Gene (Abb. 7).

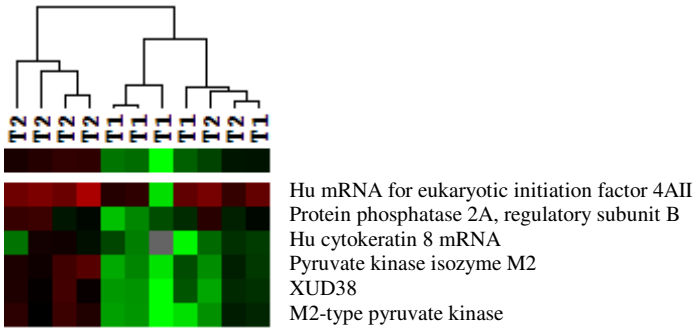

Abb. 7: Ergebnisse der Clusteranalysen der differentiell exprimierten Gene von T_1 und T_2

Hier sind die durch „TreeView" dargestellten Ergebnisse der Clusteranalysen der differentiell exprimierten Gene der Tumorstadien T_1 und T_2 gezeigt. Die einzelnen Probanden sind vertikal, die differentiell exprimierten Gene horizontal aufgetragen. Grün bedeutet schwache, rot starke und schwarz durchschnittliche Expression des jeweiligen Gens.

In der Analyse der Stadien T_2 und T_3 zeigt sich zum einen, dass trotz der stark unterschiedlichen Anzahl von Fällen die Patienten der Gruppe T_2 fast komplett in einer gemeinsamen Verzweigung zusammengefasst werden. Zum anderen zeigt sich, dass die T_3-Tumore in zwei Hauptgruppen zerfallen, die sich in der Expression eines großen Blocks von Genen im unteren Teil des Clusters stark unterscheiden (Abb. 8).

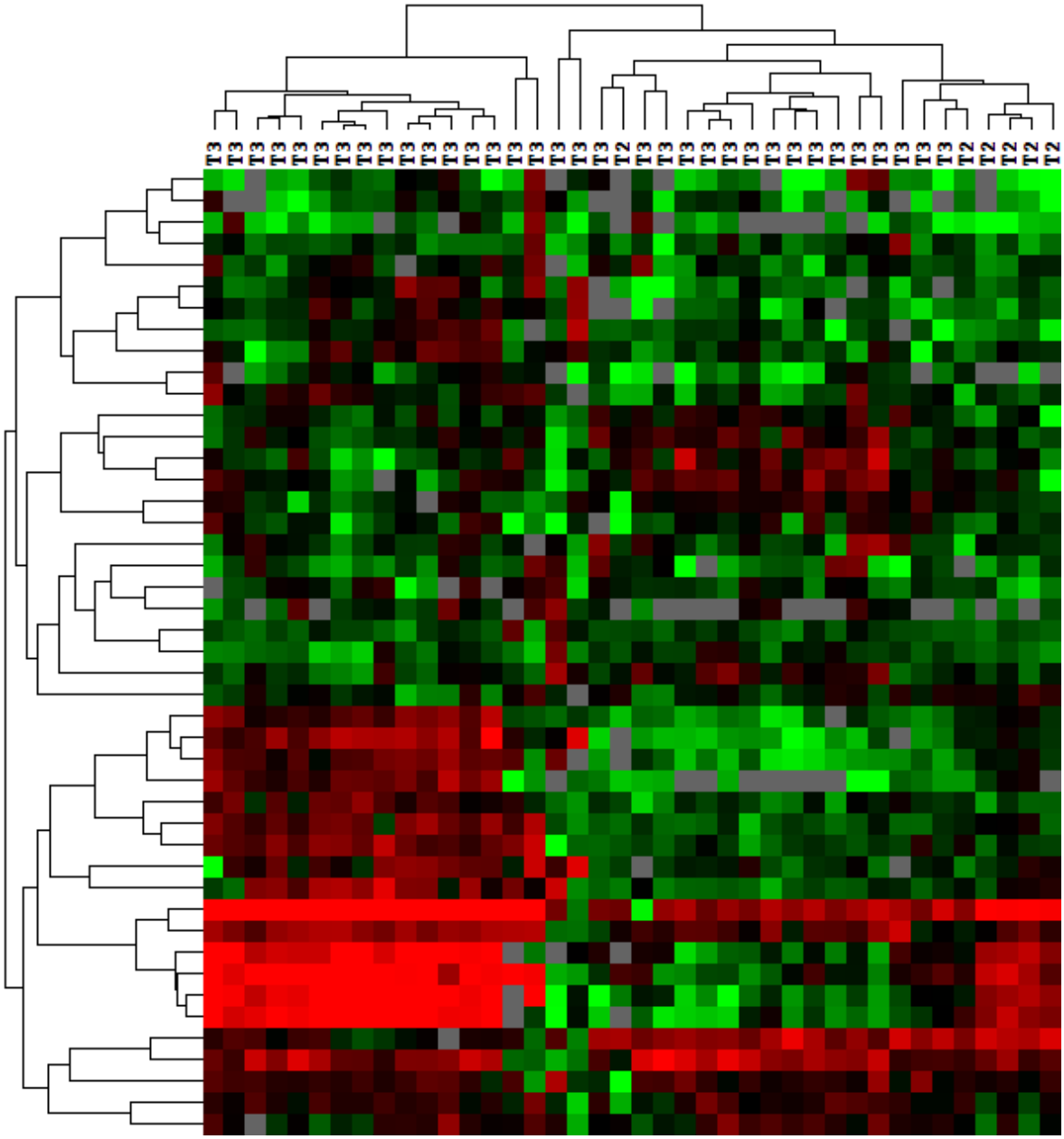

Abb. 8: Ergebnisse der Clusteranalysen der differentiell exprimierten Gene von T_2 und T_3

Hier sind die durch „TreeView“ dargestellten Ergebnisse der Clusteranalysen der differentiell exprimierten Gene der Tumorstadien T_2 und T_3 gezeigt. In dem Diagramm sind die einzelnen Probanden vertikal, die differentiell exprimierten Gene horizontal vertreten. Grün bedeutet schwache, rot starke und schwarz durchschnittliche Expression des jeweiligen Gens.

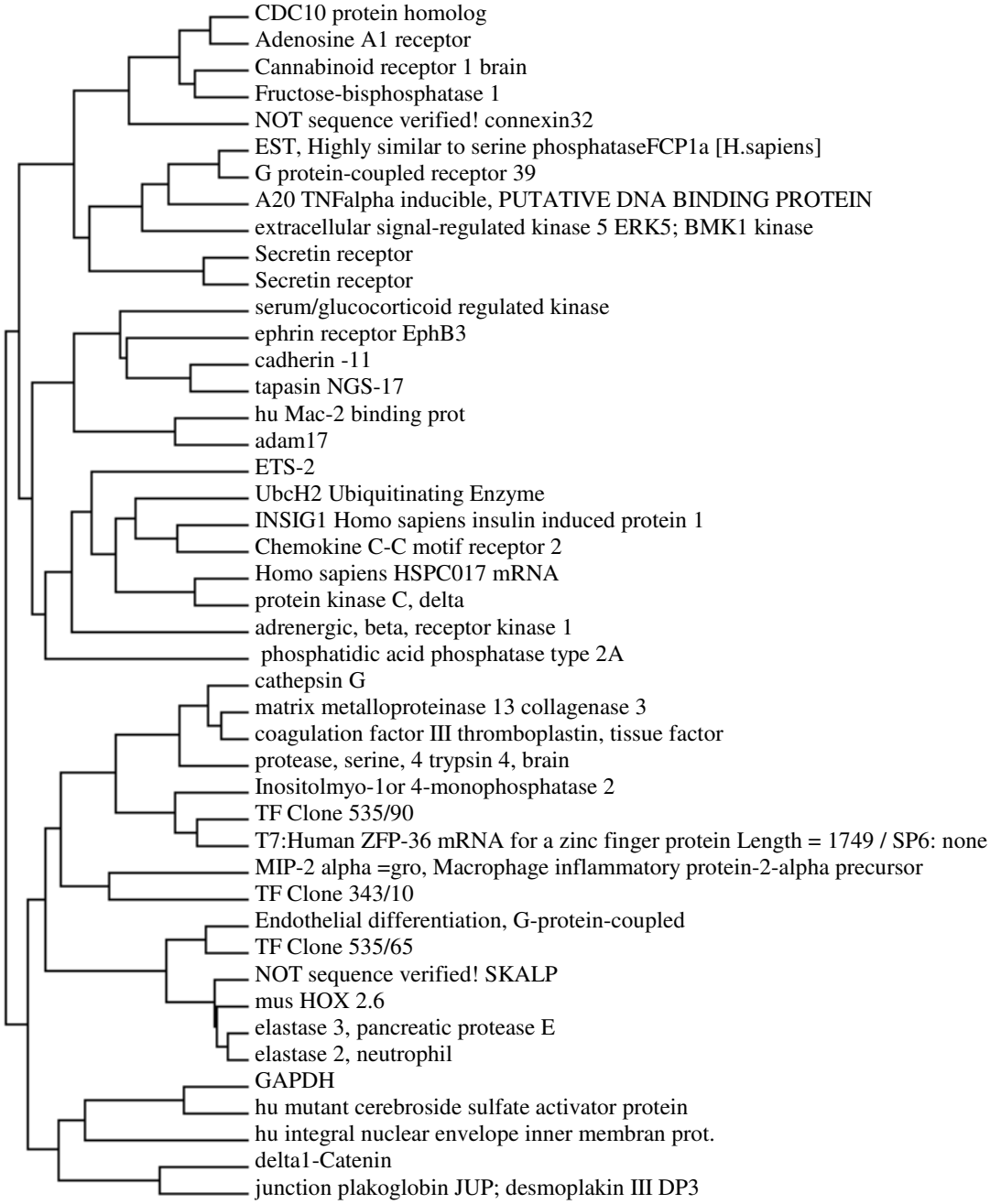

Abb. 9: Genbaum

Abgebildet ist der linke Baum des Diagrammes Abb. 8, in den die Gennamen eingefügt wurden.

Die Tumore der Stadien T_3 und T_4 ließen sich in der Cluster-Analyse nicht eindeutig voneinander trennen (Abb. 10). Die relativ geringen spezifischen Expressionsunterschiede lassen sich auch an der vergleichsweise geringen Zahl von signifikant differentiell exprimierten Genen nachvollziehen.

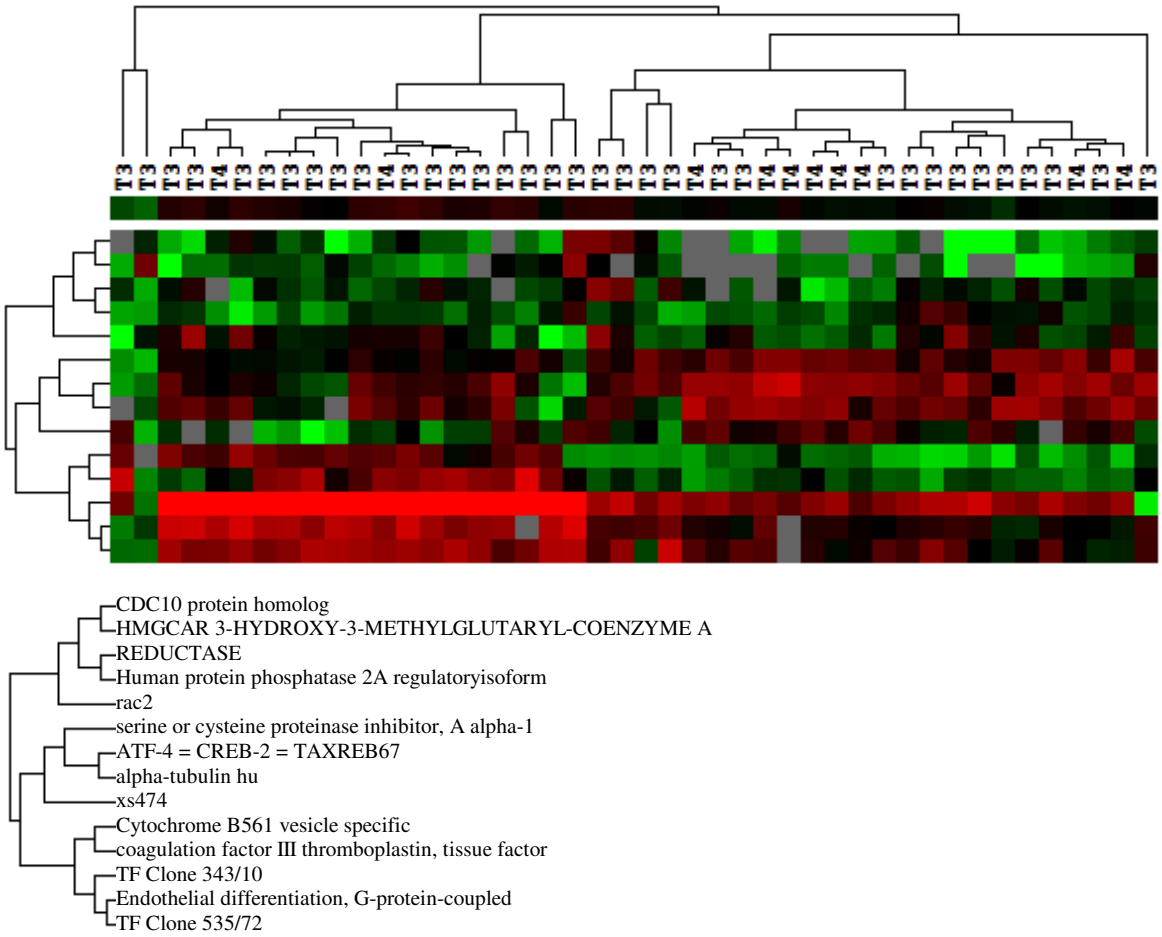

Abb. 10: Ergebnisse der Clusteranalysen der differentiell exprimierten Gene von T_3 und T_4

Hier sind die durch „TreeView“ dargestellten Ergebnisse der Clusteranalysen der differentiell exprimierten Gene der Tumorstadien T_3 und T_4 gezeigt. In dem Diagramm sind die einzelnen Probanden vertikal, die differentiell exprimierten Gene horizontal vertreten. Grün bedeutet schwache, rot starke und schwarz durchschnittliche Expression des jeweiligen Gens. Der untere Baum entspricht dem obigen linksseitigen Baum und zeigt die zugehörigen Gennamen an.

Wie erwartet zeigte sich für den Vergleich des frühesten Tumorstadiums (T_1) mit dem spätesten Tumorstadium (T_4) die größte Anzahl an signifikant differentiell exprimierten Genen (n=67, siehe Abb.11). Entsprechend war auch die Trennung der Tumorproben durch die Clusteranalyse nahezu vollständig. In dem in zwei Hauptäste gegliederten Cluster-Baum fielen lediglich drei von zehn T_4-Tumoren auf die Seite der T_1-Tumore, während die T_1-Tumore vollständig in einem Hauptzweig zusammengefasst waren (Abb. 11).

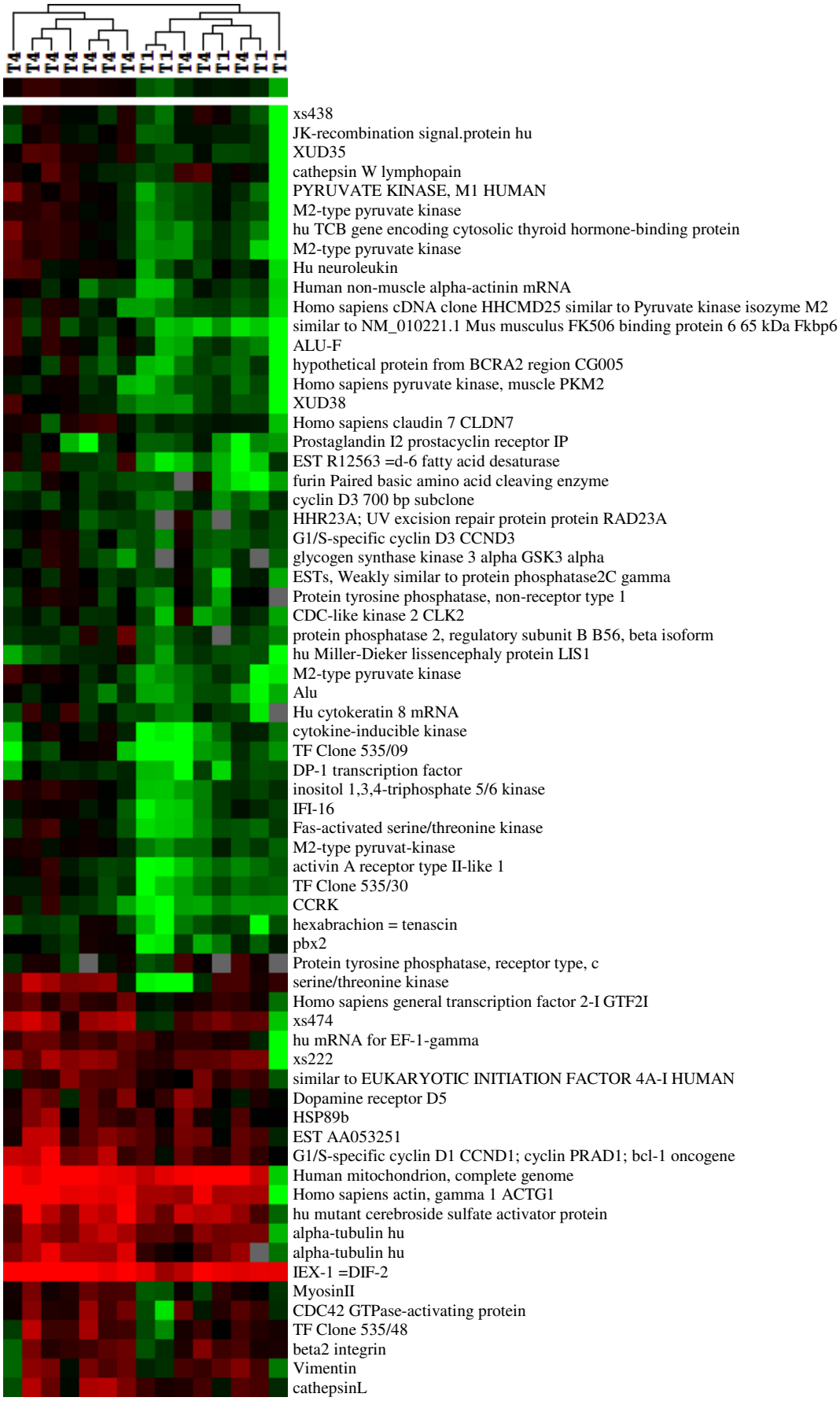

Abb. 11: Clusteranalysen der differentiell exprimierten Gene der Stadien T_1 und T_4

3.3.2 Vergleich der N-Stadien

Um potentielle Gene, die für die Lymphknotenmetastasierung relevant sein könnten, zu untersuchen, wurden die differentiell exprimierten Gene dieser beiden Gruppen miteinander verglichen.
Dabei wiesen 24 Patienten das Stadium N_0 und 31 Patienten das Stadium N_1 auf.

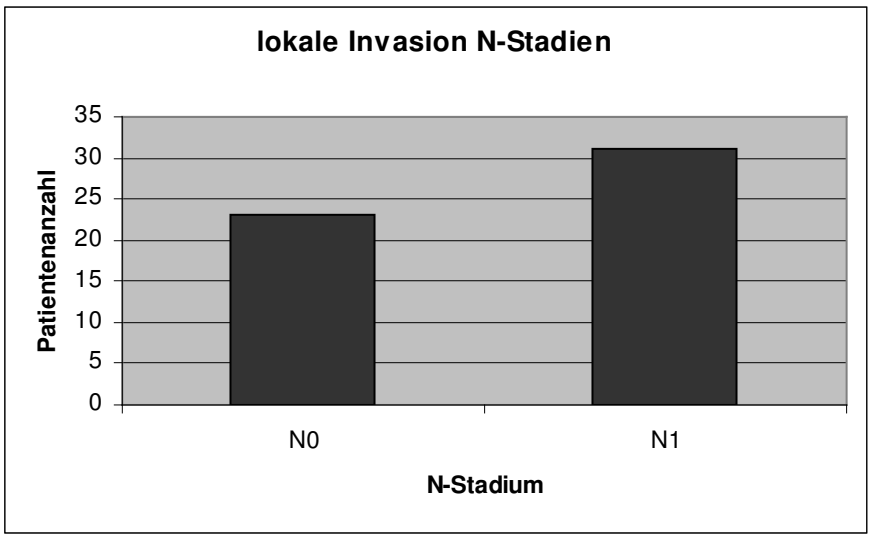

Abb. 12: Lymphknotenmetastasierung

Dargestellt ist hier die Anzahl der Patienten mit (N_1) und ohne (N_0) Lymphknotenbefall

Es fanden sich bei N_1 gegenüber N_0 23 überexprimierte und drei unterexprimierte Gene (Tabelle 7 im Anhang).
Bei den differentiell exprimierten Genen, die für die extrazelluläre Matrix codierten, waren bis auf das Metallothionein 1B und 1L alle Gene bei N_1 gegenüber N_0 verstärkt exprimiert. Die TIMP 3, die MMP 10, das E-Cadherin, der Urokinase-type Plasminogen Activator, das Cathepsin l sowie das Beta-2-Integrin wiesen jeweils einen etwa dreifach so hohen Expressionswert bei N_1 auf. Von den Entzündungsmediatoren sowie den für die Proliferation codierenden Genen waren alle Vertreter bei N_1 überexprimiert. Betrachtete man die Gene, die für den Metabolismus codieren, waren bis auf die Protein Phosphatase 1B alle Vertreter bei N_1 verstärkt exprimiert.
Da mit dem Befall der Lymphknoten bereits eine Metastasierung stattgefunden hat, für die eine schlechtere Überlebenszeit angegeben wird (Lepenies 2000), (Heinemann et al. 2001),

wurden die Überlebenszeitkurven der Patienten aus den Gruppen mit und ohne Lymphknotenbefall berechnet. Überraschenderweise lag die Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve von N_0 jedoch nur geringfügig über der von N_1 (Abb. 13).

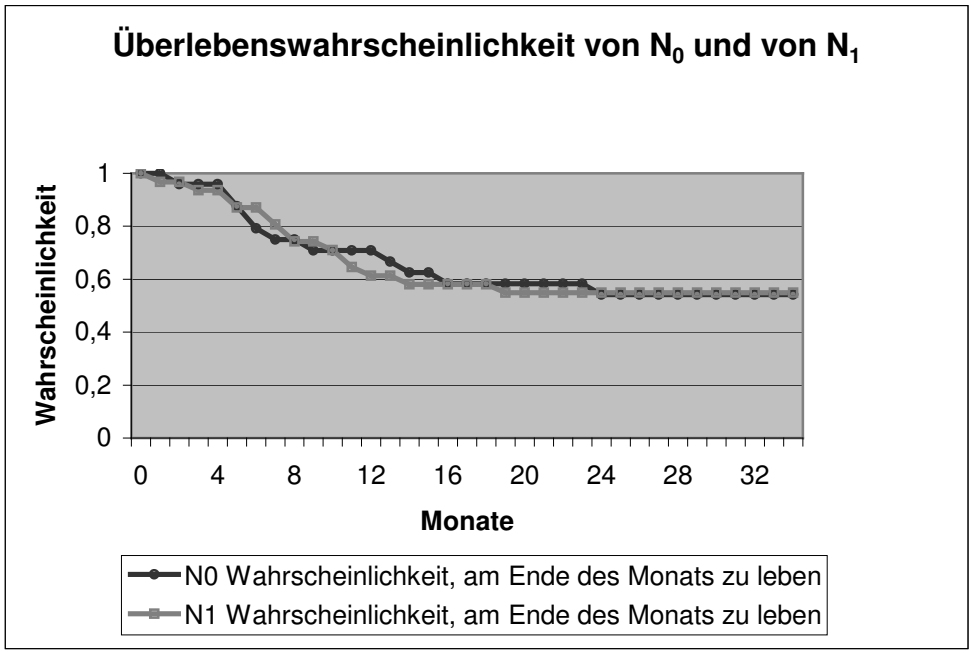

Abb. 13: Lymphknotenbefall

Dargestellt ist hier die Wahrscheinlichkeit für die Gruppen N_0 (schwarz) und N_1 (grau), einen bestimmten Monat zu überleben.

Um Aussagen darüber machen zu können, ob die Unterschiede in zwei Überlebenszeitkurven statistisch signifikant sind, wurde der Log-Rank-Test durchgeführt (siehe Material und Methoden 2.5.3). Für die N_0-Gruppe wurde ein theoretischer Wert von 11,42 für die erwarteten Todesfälle errechnet, de facto waren es genau elf Todesfälle.

Für die N_1-Gruppe wurden 13,57 erwartete Todesfälle errechnet, tatsächlich waren es 14.

Es wurde ein χ^2-Wert von 0,029 berechnet.

Bei zwei Freiheitsgraden und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 beträgt der kritische Wert von χ^2 laut Tabelle 0,1 (siehe gängige Lehrbücher der Statistik). Wenn der errechnete Wert von χ^2 gleich oder größer als der kritische Tabellenwert gewesen wäre, hätte man eine Unabhängigkeit der beiden Überlebenskurven postulieren müssen. Da der errechnete Wert von 0,029 den Tabellenwert 0,1 jedoch nicht übersteigt, kann man nicht von zwei unabhängigen Kurven ausgehen, sondern muss feststellen, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Kurven besteht.

3.3.3 Vergleich der M-Stadien

Um potentielle Gene, die bei der Fernmetastasierung eine Rolle spielen könnten, zu identifizieren, wurden die Expressionswerte der Gene in der Gruppe M_0 (keine Fernmetastasen) mit den Genen der Gruppe M_1 (Fernmetastasen vorhanden) verglichen.
Der Gruppe M_0 konnten 40 Patienten zugeordnet werden, der Gruppe M_1 neun Patienten. Zu sechs Patienten gab es keine Angaben bezüglich des M-Stadiums.
Auch hier wurden die Mittelwerte der einzelnen Gene für jede Gruppe sowie die T-Tests der Mittelwerte von M_0 und M_1 errechnet und nur die Gene als differentiell exprimiert berücksichtigt, deren Mittelwerte sich mindestens um das Doppelte unterschieden und von denen ein Mittelwert mindestens den Wert 0, 5 betrug. Der p-Wert war $\leq 0{,}05$.
Ein Log-Rank-Test wurde hier unterlassen, da nur neun Patienten Fernmetastasen aufwiesen und das Ergebnis nicht repräsentativ wäre.
In diesem Vergleich fanden sich 44 differentiell exprimierte Gene. So waren bei M_1 gegenüber M_0 13 Gene überexprimiert und 31 Gene unterexprimiert (Tabelle 8 im Anhang).
Bezüglich der Extrazelluläre-Matrix-Gene fanden sich bei M_1 gegenüber M_0 fünf unterexprimierte Gene. Diese waren die MMP 13, die MMP 10, das Thrombospondin 1 und 4 sowie das Beta-2-Integrin.
Bei den Genen, die für Entzündungsmediatoren codieren, zeigten sich bei M_1 zwei von vieren verstärkt exprimiert. Unterexprimiert war u.a. das IL-8.
Die meisten Gene, die für die Proliferation codieren sowie das Lipocortin 2 und das Alpha-Tubulin zeigten sich ebenfalls herunterreguliert.

3.3.4 Vergleich der Staging-Gruppen

Nachdem die Kriterien lokale Tumorausdehnung (T-Stadium), Lymphknoten-metastasierung (N-Stadium) und Fernmetastasierung (M-Stadium) getrennt betrachtet wurden, wurden diese Kriterien innerhalb der vier Staginggruppen zusammengefasst (UICC-Tabelle 2 im Anhang). Von den 55 Patienten fielen acht Patienten in die Gruppe S_1, 32 in die Gruppe S_2, sieben in S_3 und acht Patienten in S_4. Eine weitere Einteilung in „a“ und „b“ wurde der Übersicht wegen unterlassen.

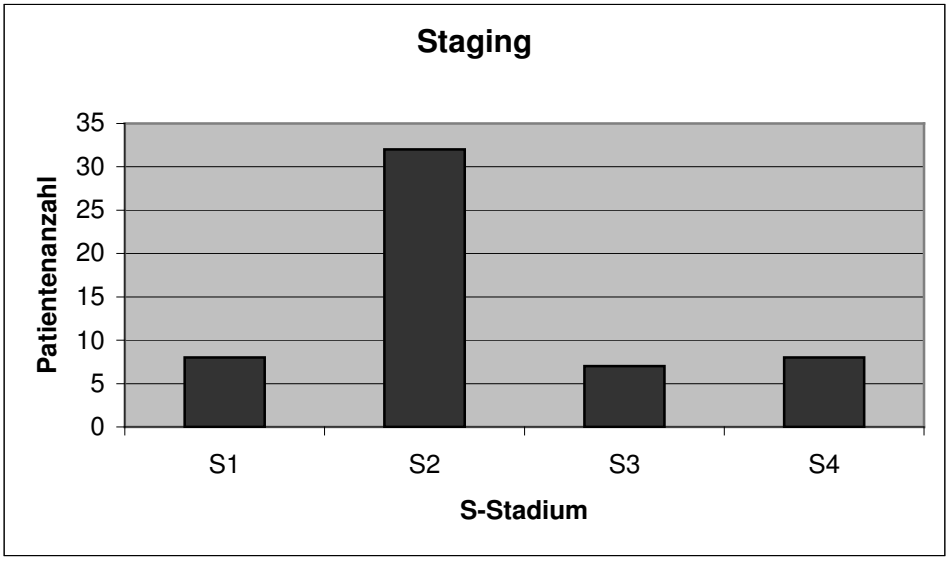

Abb. 14: Staging
Gezeigt wird hier die Anzahl der Patienten in den einzelnen Gruppen

Analog zu den obigen Untersuchungen wurden auch hier die Mittelwerte von den Expressionswerten der einzelnen Gene in den verschiedenen Gruppen berechnet. Es wurden nur die Gene als differentiell exprimiert selektiert, deren p-Werte des T-Tests den Wert 0,05 nicht überstiegen. Außerdem mussten sich auch hier die Mittelwerte um mindestens das Doppelte unterscheiden und ein Mittelwert mindestens den Wert 0,5 betragen.
Es konnten im Vergleich der Gruppe S_1 mit der Gruppe S_2 24 Gene, der Gruppe S_2 mit S_3 sechs Gene, im Vergleich von S_3 mit S_4 13 Gene und im Vergleich von S_1 mit S_4 elf Gene als differentiell exprimiert ermittelt werden.

Das Staging-Stadium S_1 beinhaltet die Tumorstadien T_1 und T_2. Lymphknoten und Fernmetastasen dürfen noch nicht vorliegen, während S_2 das Vorliegen des Stadiums T_3 ohne Lymphknotenbefall oder das Vorliegen der Stadien T_1 bis T_3 mit Lymphknotenbefall repräsentiert. Im Stadium T_3 liegt eine Tumorausbreitung jenseits des Pankreas, ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior vor.
Um Gene zu finden, die entweder die Ausbreitung jenseits des Pankreas oder den Lymphknotenbefall fördern, wurden die Genexpressivität dieser beiden Staginggruppen miteinander verglichen.
Dabei war zu bemerken, dass sämtliche differentiell exprimierte Gene im Stadium S_2 stärker exprimiert waren als im Stadium S_1 (siehe Tabelle 9 im Anhang).

Besonders zahlreich waren die Gene, die für den Metabolismus codieren, wie z.B. Kinasen und Phosphatasen, vertreten.
Des Weiteren waren zwei Gene, die für Entzündungsmediatoren codieren, überexprimiert sowie Gene der extrazellulären Matrix wie die MMP 10, das Beta-2-Integrin sowie das Thrombospondin-4.

Das Stadium S_2 beinhaltet, wie bereits oben erwähnt das Stadium T_3 ohne Lymphknotenbefall oder die Stadien T_1 bis T_3 mit Lymphknotenbefall. S_3 hingegen repräsentiert die Infiltration des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior mit oder ohne Lymphknotenbefall.
Um zu untersuchen, welche Gene bei diesem bedeutsamen Schritt der Tumorausbreitung eine Rolle spielen, wurden die Expressionsmuster der Gene dieser beiden Gruppen miteinander verglichen.
Hierbei war zu sehen, dass es lediglich sechs Gene gab, die sich in den beiden Gruppen unterschiedlich verhielten (siehe Tabelle 10 im Anhang). Diese waren im Stadium S_3 herunterreguliert. Als den Metabolismus fördernde Proteine waren hier die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Koenzym-A-Reduktase sowie die humane Proteinphosphatase 2A vertreten.

Während die bisherigen Stagingstadien keine Fernmetastasierung beinhalteten, ist dies im Stadium S_4 der Fall. Aus diesem Grund wurde das Expressionsverhalten zwischen S_3 und S_4 untersucht. Es fanden sich bei S_4 gegenüber S_3 zehn überexprimierte und drei unterexprimierte Gene (siehe Tabelle 11 im Anhang).
Die am meisten vertretenen Gene waren die für den Metabolismus codierenden, die bis auf eine Phosphatase alle im Stadium S_4 verstärkt exprimiert waren.
Des Weiteren waren Alpha-Tubulin 2 und die MMP 15 bei S_4 hochreguliert.

Um das Verhalten potentieller für die Metastasierung wesentlicher Gene zu untersuchen, wurde das Expressionsprofil der Gruppe S_1 mit dem der Gruppe S_4 verglichen.
Hier fanden sich sämtliche für den Metabolismus codierende Gene im Stadium S_4 verstärkt exprimiert (siehe Tabelle 12 im Anhang). Von den für die Proliferation wesentlichen Genen war die MAP-Kinase und das Cyclin D3 verstärkt exprimiert, während das Cyclin D2 im Stadium S_4 vermindert exprimiert wurde. Des Weiteren war das Calmodulin 3 bei S_4 verstärkt exprimiert.

3.3.5 Vergleich von M_0M_1 mit T_1T_4

Nach den Vergleichen der Gruppen innerhalb desselben Kriteriums wurden kriteriums-übergreifende Vergleiche erstellt.
Um zu untersuchen, ob Ähnlichkeiten zwischen dem Expressionsverhalten bestimmter Gene bei fortgeschrittenen Tumorstadien und Fernmetastasierung vorliegen, wurden die Expressionsprofile der beiden Kategorien Tumorstadien und Fernmetastasierung miteinander verglichen. Es war festzustellen, dass das Beta-2-Integrin im Stadium M_1 im Vergleich zu M_0 an Expression abnahm, im Vergleich von T_1 mit T_4 im höheren Stadium jedoch zunahm.
Die Pyruvate kinase isozyme M2 sowie das Alpha-Tubulin nahmen sowohl im Vergleich von M_0 mit M_1 als auch im Vergleich von T_1 mit T_4 im höheren Stadium an Expression zu.

3.3.6 Vergleich von M_0M_1 mit N_0N_1

Es wurde vermutet, dass Zusammenhänge zwischen den Genen, die für die Lymphknotenmetastasierung eine Rolle spielen, und den Genen, die bei der Fernmetastasierung von Bedeutung sind, bestehen. Aus diesem Grund wurden die beim Vergleich der Gruppen M_0 mit M_1 differentiell exprimierten Gene und die bei dem Vergleich der Gruppen N_0 mit N_1 differentiell exprimierten Gene miteinander verglichen.
Von den beim Kriterium der Fernmetastasierung 44 differentiell exprimierten Genen gab es drei Überschneidungen mit den 26 beim Kriterium der Lymphknotenmetastasierung differentiell exprimierten Genen. Diese waren von den Extrazelluläre-Matrix-Genen die MMP 10 sowie das Beta-2-Integrin, und von den für den Metabolismus codierenden Genen der ProteintyrosinephosphataseReceptor Typ M. Auffällig war hier, dass der Proteintyrosinephosphatase Receptor Typ M, die MMP 10 sowie das Beta-2-Integrin vom Stadium M_0 zu M_1 an Aktivität abnahmen, von N_0 zu N_1 jedoch zunahmen.

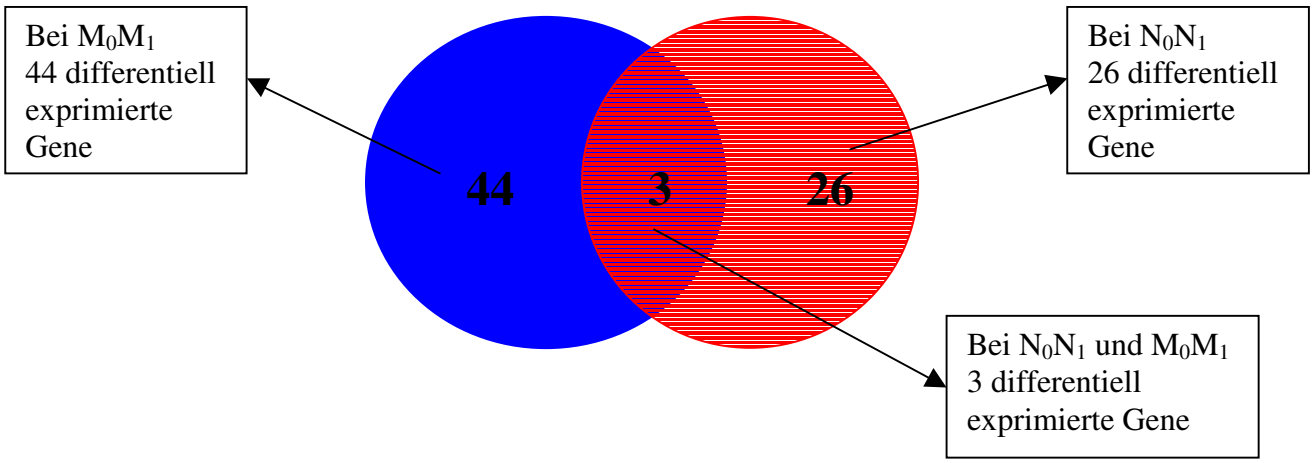

Abb. 15: Vergleich von N mit M

Der rechte Kreis zeigt die Gene, die bei der Lymphknotenmetastasierung differentiell exprimiert sind, der linke die differentiell exprimierten Gene der Fernmetastasierung. In der Mitte sind die Gene angegeben, die sowohl bei M als auch bei N differentiell exprimiert sind.

3.4 Cox-Modell

Um zu untersuchen, wie sich die Wahrscheinlichkeit zu sterben in Abhängigkeit von den Expressionswerten verhält, wurde eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt.

Da diese Studie vor dem Tod des letzten Patienten endete und somit eine Zensierung vorlag, wurde das Regressionsmodell von Cox angewendet. Mit diesem Modell konnte die Wahrscheinlichkeit für das Eintreffen des Todes in Abhängigkeit einer bzw. dreier Prädiktorvariablen berechnet werden.

Dazu wurden die Rohwerte der signifikanten differentiell exprimierten Gene aus den Vergleichen von T_1 mit T_4, M_0 mit M_1 und N_0 mit N_1 in eine einzige Prädiktorvariable gefasst.

Anhand der im Material- und Methoden-Teil beschriebenen Formeln wurden folgende Werte berechnet:

- der Wert der Prädiktorvariablen X betrug 0,00168

- die Wahrscheinlichkeit, bei Erhöhung der Variablen X um 1,0 zu sterben, betrug 113 %. Allerdings betrug der p-Wert 0,288, sodass dieses Ergebnis nicht als statistisch signifikant gewertet werden konnte.
Anschließend wurden die Rohwerte zur Basis 2 logarithmiert und erneut als Prädiktorvariable in das Modell eingegeben. Sie betrug für X_{log} 0,0048. Die Wahrscheinlichkeit, bei Erhöhung der Variablen um 1,0 zu sterben, betrug 3,81 (381 %). Der p-Wert lag bei 0,064. Mit einer 6,4 %igen Irrtumswahrscheinlichkeit steigt das Risiko zu sterben um das 3,8fache, wenn die Prädiktorvariable um den Wert 1,0 steigt.

Anschließend wurden die Werte aus den Vergleichen der Tumorstadien (T_1 mit T_4), der Fernmetastasierung (M_0 mit M_1) sowie der Lymphknotenmetastasierung (N_0 mit N_1) in drei Prädiktorvariablen getrennt bearbeitet. Beim Einsetzen der Rohwerte in das Cox-Modell ergaben sich folgende Werte für die Variablen:

Prädiktorvariable für T-Stadien:	X	0,00339	p-Wert: 0,290
Prädiktorvariable für N-Stadien:	Y	0,00585	p-Wert: 0,044
Prädiktorvariable für M-Stadien:	Z	-0,00681	p-Wert: 0,350

Auch hier kann man beim Betrachten der hohen p-Werte lediglich von bedingt signifikanten Zusammenhängen ausgehen.
Anschließend wurden die Prädiktorvariablen mit den zur Basis 2 logarithmierten Werten berechnet. Hier betrugen die Werte der Variablen:

Prädiktorvariable für T-Stadien:	X	0,00490	p-Wert: 0,34
Prädiktorvariable für N-Stadien:	Y	0,01886	p-Wert: 0,36
Prädiktorvariable für M-Stadien:	Z	-0,00743	p-Wert: 0,54

Auch hier kann kein statistisch signifikanter Zusammenhang angenommen werden.

4 Diskussion

Das duktale Pankreaskarzinom weist die schlechteste Prognose aller soliden Tumore auf. Es macht sich weder durch frühe Symptome bemerkbar, noch ist es für eine Früherkennung zugänglich. Trotz intensiver Forschung nach den Mechanismen der Tumorentstehung und dessen Weiterentwicklung sind die Ergebnisse unbefriedigend und führten bisher zu keiner Lebenszeitverlängerung der Patienten.
Aus diesem Grund ist es unumgänglich, den Patienten eine möglichst schnelle Früherkennung des Tumors und nach erfolgter Diagnosestellung eine effektive, qualitativ hochwertige Therapie anzubieten.
Die Identifizierung von Genen, die eine wesentliche Rolle in der Genese und Metastasierung beim Pankreaskarzinom spielen, erfolgte mit Hilfe der cDNA-Array-Technologie. Diese Technik erlaubt eine zuverlässige Identifizierung differentiell exprimierter Gene von verschiedenen Karzinomen im Vergleich zu gesundem Gewebe mit guter Validität und Reliabilität.
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kriterien Tumorstadium und Metastasierung sowie das Überleben jeweils für sie typische Expressionsprofile aufwiesen.

4.1 Studienaufbau, Alter und Überleben

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 63,07 Jahre und lag etwas unter dem in der Literatur angegebenen durchschnittlichen Alter von 67 Jahren bei Männern und 75 Jahren bei Frauen (Rieder 2002).
Ihre Überlebenskurve sah unerwartet günstig aus. Etwa 60 % der Patienten haben die ersten 35 Monate nach der Operation überlebt, während laut Yeo und Cameron die 5-Jahresüberlebensrate nach einer kurativen Resektion bei 15 % liege, bei Patienten mit niedrigen Tumorstadien (UICC 1: T_1 und T_2, N_0, M_0) bei bis zu 40 %. Des Weiteren muss beachtet werden, dass 34 von den 55 Patienten das Stadium T_3 und zehn Patienten das Stadium T_4 aufwiesen, sodass trotz einer Überrepräsentierung der höheren Tumorstadien mit 60 % eine sehr hohe Überlebensrate nach 35 Monaten gegeben war.

Ungefähr ein Drittel der Pankreaskarzinompatienten werden laut Yeo und Cameron kurativ operiert, doch lägen bei 80 % der Patienten bei OP bereits größere Tumore und Lymphknotenmetastasen vor (Yeo u. Cameron 1998). In dieser Arbeit wiesen 44 von 55 Patienten die Stadien T_3 und T_4 und 31 von 55 Patienten Lymphknotenmetastasen auf. Vier der Patienten mit Lymphknotenmetastasen zeigten zusätzliche Fernmetastasen, ein Patient zeigte Fernmetastasen ohne Lymphknotenbeteiligung. Da die Chemotherapie mit und ohne Bestrahlung nur minimalen Effekt auf das Überleben der Patienten in fortgeschrittenen Stadien zeige, betrage die 5-Jahresüberlebensrate der Pankreaskarzinompatienten insgesamt nur fünf Prozent (Yeo u. Cameron 1998). Weil sich die Verfolgung der Daten in dieser Arbeit auf einen Zeitraum von zwei Jahren beschränkt, können keine exakten Aussagen zu der 5-Jahresüberlebensrate gemacht werden.

Insgesamt lässt sich die unerwartet hohe Überlebensrate wahrscheinlich durch die Selektion des Patientengutes erklären, da das Untersuchungsmaterial ausnahmslos von Patienten stammte, die in kurativer Absicht operiert wurden. Es erscheint plausibel, dass dieses Kollektiv im Durchschnitt eine bessere Prognose besitzt als die Gesamtheit der Pankreaskarzinompatienten.

4.2 TNM-Stadien, Staging

Beim Zuordnen der Patienten zu den jeweiligen Tumorstadien waren wie bereits oben erwähnt die höheren Stadien T_3 und T_4 mit 34 und zehn Patienten stärker vertreten als die niedrigen Stadien T_1 mit fünf und T_2 mit sechs Patienten. Dies führte jedoch nicht zu einer schlechteren Überlebensrate.

Bei der Lymphknoteninfiltration (N) waren die beiden Gruppen gleichmäßiger vertreten: 24 wiesen das Stadium N_0 und 31 Patienten das Stadium N_1 auf.

Die Kaplan-Meier-Kurve für die N_0-Patienten lag nur geringfügig über der der N_1-Patienten. Dies war ein überraschendes Ergebnis, da von einer erheblich größeren Diskrepanz der Überlebenskurven ausgegangen worden war.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde der χ^2-Test durchgeführt. Bei zwei Freiheitsgraden und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 beträgt der kritische Wert von χ^2 laut Tabelle 0,1 (siehe gängige Lehrbücher der Statistik). Wenn der errechnete Wert von χ^2 gleich oder größer als der kritische Wert gewesen wäre, hätte man eine Unabhängigkeit der beiden Überlebenskurven postulieren müssen. Da der errechnete Wert

von 0,029 den Tabellenwert 0,1 jedoch nicht übersteigt, kann man nicht von zwei unabhängigen Kurven ausgehen, sondern muss feststellen, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Kurven besteht.

Bezüglich der Fernmetastasen konnten keine Überlebenskurven erstellt werden, da lediglich fünf der 55 Patienten Fernmetastasen aufwiesen. Auch hier spiegelt sich die nicht repräsentative Auswahl des Patientengutes wider, da der größere Teil der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Fernmetastasen aufwies, diese jedoch ein Ausschlusskriterium für die kurative Operation darstellen.

4.3 Auswertungen der Gen-Arrays

4.3.1 Vergleich der T-Stadien

Anhand der Genexpressionsprofile konnte gezeigt werden, dass bestimmten Kriterien wie Tumorstadium und Metastasierung für dieses Merkmal typische Expressionsmuster zugeordnet werden konnten.
So zeigten sich bei dem Kriterium Tumorstadium in den höheren Stadien eine verstärkte Expression der Gene, die für den Metabolismus und die Proliferation codieren.
Dies waren insbesondere die Pyruvatkinase und diverse Protein-Phosphatasen, die einen verstärkten Metabolismus repräsentierten. Die Proliferation fördernden Gene, welche in höheren Tumorstadien heraufreguliert waren, waren das Cyclin D1 und D3, diverse Transkriptionsfaktoren sowie Kinasen, die regulierend in den Zellzyklus eingreifen.
Von den Extrazelluläre-Matrix-Genen waren das Furin, das Cathepsin L und W, das Hexabrachion, das Beta-2-Integrin sowie das Myosin 2 in den höheren Tumorstadien verstärkt exprimiert. Des Weiteren zeigten die MMP 13 und die TIMP 2 eine verstärkte Expression in höheren Tumorstadien.
Aber auch für das Zytoskelett codierende Gene wie das Alpha-Tubulin und das Vimentin zeigten in höheren Tumorstadien eine verstärkte Expression.

Gene der extrazellulären Matrix und Zelladhäsionsmoleküle

Unter den Genen, die für Proteine der extrazellulären Matrix oder für Moleküle, die mit dieser interagieren, codieren, waren die Proteasen Cathepsin G, W und L verstärkt exprimiert.
Für Cathepsin B und L ist bekannt, dass sie als prognostisch relevante Faktoren beim Pankreaskarzinom fungieren, da ihre verstärkte Expression signifikant mit dem Tumorgrading und einer verkürzten postoperativen Lebenszeit korrelieren (Niedergethmann et al. 2000). Speziell das Cathepsin B geht mit einer Invasion des Tumors in den perineuralen Raum einher, was eine lokale Tumorinvasion bedeutet und mit einer frühen lymphatischen Invasion korreliert. Es gilt als Prädiktor für eine frühzeitige Rezidivierung (Niedergethmann et al. 2004), (Tan et al. 2003), (Allgayer et al. 2001).
Über das Verhalten von Cathepsin W und G in Pankreaskarzinomen ist bisher wenig bekannt; allerdings wurde über eine verstärkte Expression von Cathepsin W in T-Lymphozyten bei chronischer Gastritis berichtet (Kuester et al. 2005), so dass über eine Rolle dieser Gene in der tumorbegleitenden Entzündung spekuliert werden kann.

Weitere Gene, die eine verstärkte Expression in höheren Tumorstadien zeigten, waren das Myosin 2, das Hexabrachion und das Furin.
Myosin 2 spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulierung von Cadherinen. Es aktiviert die Rho-Rho-Kinase, welche die Fähigkeit der Zelle, Cadherine zu akkumulieren, kontrolliert. Ohne die Akkumulation von Cadherinen ist eine Zell-Zelladhäsion und somit eine Tumorausbreitung stark eingeschränkt. Myosin 2 wird seinerseits durch Cadherine reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass Blebbistatin, ein Myosin 2- Antikörper, durch die Hemmung von Myosin 2 die Fähigkeit der Zelle, E-Cadherine zu konzentrieren, beeinträchtigte und somit zu einer Verminderung der Zell-Zelladhäsion führte (Shewan et al. 2005). Duxbury beschrieb speziell für das Pankreaskarzinom eine Hemmung der Zellmigration, Zellinvasion und Zelladhäsion durch den Myosin 2- Antikörper Blebbistatin (Duxbury et al. 2004).

Tenascin C (Synonym: Hexabrachion) ist ein Protein der extrazellulären Matrix, welches mit der Neovaskularisation von Tumoren assoziiert ist (Ishiwata et al. 2005). Außerdem gehört es zu den Substratadhäsionsmolekülen (SAMS) und unterdrückt die Zellmigration. Eine Mutation könnte zu einer Funktionsstörung und somit zu einer vermehrten

Zellmigration und Invasion des Tumors führen. Laut Ishiwata et al. wurde eine verstärkte Aktivität von Tenascin in nicht kleinzelligen Lungentumoren gefunden. Diese war deutlich, jedoch nicht statistisch signifikant erhöht. Des Weiteren fand er eine positive Korrelation zwischen erhöhtem Tenascin und erhöhtem VEGF, erhöhtem Serum-Osteopontin und verstärkter Mikrovaskularisation (Ishiwata et al. 2005). Cai konnte beim Lungenkarzinom bei einer Abnahme des TNC eine Tumorregression beobachten (Cai et al. 2002). Auch andere Autoren beschrieben eine Überexpression von TNC in Karzinomen (Kilic et al. 2002), (Herold-Mende et al. 2002). Es existieren allerdings bisher keine Aussagen über Hexabrachion (TNC) beim Pankreaskarzinom.

Furin, eine Pro-Proteinkonvertase, ist in vielen Tumorarten verstärkt exprimiert. Sie aktiviert diverse MMPs, Wachstumsfaktoren sowie TGF-Beta und führt somit zu verstärkter Invasion. Es konnte gezeigt werden, dass Furininhibitoren wie Alpha 1 PDX zu einer verminderten Furinexpression und somit zu einer deutlich geringeren Tumorausbreitung geführt haben (Bassi et al. 2001).

Ein weiteres in höheren Tumorstadien überexprimiertes Gen war das Claudin-7. Von Claudinen ist bekannt, dass sie als Hauptkomponenten der Tight junctions Schlüsselmoleküle bei der Zelladhäsion, bei der Zellpolarität sowie beim Transport von Stoffen in die Zelle sind (Gyorffy et al. 2005).
Johnson et al. beschrieben eine verstärkte Expression von Claudin-7 als frühes Ereignis in der Tumorgenese von Adenokarzinomen des Magens (Johnson et al. 2005), während eine verminderte Expression von Claudin-7 mit Metastasierung und Tumorinvasion in Adenokarzinomzellen des Ösophagus korrelierte (Usami et al. 2006). In dieser Arbeit war das Claudin-7 weder unter dem Aspekt der Lymphknoten-, noch der Fernmetastasierung differentiell exprimiert. Soini beschrieb den Nutzen von Claudinen als Marker zur Unterscheidung zwischen epithelialen Tumoren von Lymphomen (Soini 2005).

Gene, die für einen verstärkten Metabolismus codieren

Die für den Metabolismus codierenden Gene repräsentierten die Mehrheit aller differentiell exprimierten Gene. Sie wiesen in den höheren Tumorstadien eine vermehrte Expression auf. Dies ist auf Grund des erhöhten Stoffwechsels und Energieverbrauchs sich permanent teilender und invasiver Zellen verständlich.

Hier sind insbesondere die PKC Delta und der Ephrinrezeptor B3 zu nennen.
Die PKC ist ein Signalprotein. Sie wird durch Diacylglycerin, einem Endprodukt der Phosphoinositkaskade, aktiviert und phosphoriliert in Anwesenheit von Ca^{2+}-Ionen Serin- und Threonin-Reste von Proteinen, sodass deren Funktion verändert wird (Kreutzig 2000). Bezüglich der PKC stellten Evans et al. einen Vergleich der verschiedenen Subtypen der PKC in normalem Gewebe, in Pankreatitisgewebe sowie in mit Pankreaskarzinom befallenem Gewebe auf. Sie konnten zeigen, dass die PKC Delta in Pankreatitisgewebe und in dem die Tumorzellen umgebenden Stroma verstärkt exprimiert wurde (Evans et al. 2003).
Als ein weiteres für den Metabolismus codierendes Gen war der Ephrinrezeptor B3 verstärkt exprimiert.
Ephrine spielen eine wesentliche Rolle bei der embryonalen Entwicklung und Differenzierung von Nerven und dem vaskulären System (Liu et al. 2002). Um die Blutversorgung und Ernährung des Tumors zu sichern, werden neue Gefäße gebildet. Eine Hochregulierung des Ephrinrezeptors A2 bei transformierten Zellen sowie in der Blutgefäßentstehung bei Tumoren wurde 2002 von Koolpe et al. beschrieben (Koolpe et al. 2002). Liu et al. beschrieben eine differentielle Expression von Ephrin B2, B3 und B4 und ein damit verbundenes verstärktes Wachstum in Kolonkarzinomen (Liu et al. 2002).

Proliferations-assoziierte Gene

Das Cell Division Cycle Protein 10 zeigte ein etwas inhomogenes Verhalten im Verlauf der einzelnen Tumorstadien. Es nahm im Vergleich von T_2 nach T_3 an Expressivität zu, im Vergleich von T_3 mit T_4 jedoch wieder ab. Im Vergleich der Stadien von T_1 mit T_4 trat das CDC 10 like Protein nicht signifikant hervor. Tan et al. berichteten von einer Abnahme von CDC 10 like Protein in Pankreaskarzinomen (Tan et al. 2003). Expressions-schwankungen in den Vergleichen der einzelnen Tumorstadien sind nicht immer auszuschließen. Wegen des uneinheitlichen Verhaltens kann es jedoch nicht als wesentliches Ergebnis deklariert werden.
Als weitere für den Zellzyklus codierende Gene zeigten das Cyclin D1 und D3 eine verstärkte Expression in den höheren Tumorstadien.
Zykline nehmen potentiell eine Schlüsselstellung in der Tumorzellproliferation ein, da sie eine wichtige Rolle bei der Kontrolle und der Regulierung des Zellzyklus spielen. Die mRNA von Cyclin D1 und Cyclin D3 fanden sich bei Ebert et al. sowohl in gesunden als

auch in Pankreaskarzinomzellen exprimiert (Ebert et al. 2001). In letzteren fanden Matsubayashi et al. eine Unterexpression von Cyclin D2 und eine Überexpression von Cyclin D1 und D3 (Matsubayashi et al. 2003).
Cycline werden durch Wachstumsfaktoren in Pankreaskarzinomzellen induziert (Ebert et al. 2001), wie z.B. das Cyclin D3 durch Amphiregulin, welches zur EGF-Familie gehört. Die aberrante Aktivierung des EGF-Rezeptors durch Amphiregulin führt zur Induktion von Cyclin D3 und somit zu einer Progression des Zellzyklus, was zu verstärktem Wachstum der transformierten Zellen führt.

Zytoskelett

Von den für das Zytoskelett und die Stabilität der Zelle codierenden Genen zeigte das Alpha-Tubulin eine verstärkte Expression in den höheren Tumorstadien. Das intrazellulär gelegene dynamische Polymer dient der Stabilität und Aufrechterhaltung der Zellform. Es ist naheliegend, dass schnell und expansiv wachsende Zellen vermehrt Alpha-Tubulin produzieren. Auch Tan et al. beschrieben eine Überexpression von Alpha-Tubulin in Pankreaskarzinomen (Tan et al. 2003).
Ein weiteres in den höheren Tumorstadien verstärkt exprimiertes Gen war das Zytoskelettprotein Vimentin, das Ellenrieder et al. als Marker mesenchymaler Trans-differenzierung epithelialer Zellen beschrieben (Ellenrieder et al. 2001). Sommers et al. konnten zeigen, dass in hormonunabhängigen Mammakarzinomen mehr Vimentin produziert wurde als in gesunden Zellen. Mit dieser Vimentin-Mehrproduktion ging eine Progression der Tumorstadien einher (Sommers et al. 1989). Auch Neureiter et al. und Tan et al. beschrieben eine Überexpression von Vimentin und Zytokeratin 8 und 18 in Pankreaskarzinomzellen (Neureiter et al. 2005), (Tan et al. 2003). Das Zytokeratin 8 zeigte in dieser Arbeit in höheren Tumorstadien ebenfalls eine vermehrte Expression, was die oben genannten Fakten bestätigt.

Weitere Gene

Weitere differentiell exprimierte Gene waren der Eucaryotic Initiation Factor (EIF) und das Serpine 1A.
Der eucaryotic initiation factor zeigte eine verstärkte Expression in den höheren Tumorstadien. Er spielt eine wesentliche Rolle im Stresshaushalt einer Zelle. Werden auf

eine Zelle Stresssignale ausgeübt, aktivieren diese NF-κB, welches die Gentranskription innerhalb der Zelle koordiniert, damit diese auf den Stress adäquat reagieren kann. Bei dem Aktivierungsprozess von NF-κB wirkt EIF mit (Jiang et al. 2003). Die erhöhte EIF-Produktion in fortgeschrittenen Tumoren könnte somit auf eine konstitutiv erhöhte Stressresistenz der Tumorzellen hindeuten.

4.3.2 Vergleich der N-Stadien

Nach der Untersuchung der für die lokale Tumorausbreitung wesentlichen Gene erfolgte die Erhebung der Gene, die für die Lymphknotenmetastasierung eine erhebliche Rolle spielten. Auch hier machten die für die extrazelluläre Matrix codierenden Gene mit acht Vertretern die Mehrheit aus. Neben ihnen waren vier Entzündungsproteine in dem Stadium mit Lymphknotenmetastasierung verstärkt exprimiert sowie fünf für die Proliferation codierenden Gene. Von den den Metabolismus verstärkenden Proteinen waren die Protein Tyrosin Phosphatase M und die tartratresistente saure Phosphatase 5 verstärkt exprimiert.

Gene der extrazellulären Matrix

Unter den für die extrazelluläre Matrix codierenden Gene waren die TIMP 3, die MMP 10, das E-Cadherin, die Urokinase, das Cathepsin L und das Beta-2-Integrin im Stadium der Lymphknotenmetastasierung verstärkt exprimiert.
Sehr gut erforscht ist bereits der Zusammenhang zwischen TIMPs und MMPs. Hierbei ist bisher ein gegensätzliches Verhalten bezüglich der TIMPs beschrieben worden. Bachman et al. konnten zeigen, dass Tumore mit einer Überexpression von MMPs und einer Unterexpression von TIMPs einhergehen (Bachman et al. 1999). Da die TIMPs die proteolytische Aktivität der MMPs hemmen, führt ein Mangel an TIMPs zu einem Übergewicht der MMPs und somit zu verstärkter Tumorinvasion und Metastasierung (Bachman et al. 1999).
Rigg und Lemoine ergänzten, dass Pankreaskarzinomzellen, die mit TIMP 1 und 2 transfiziert wurden, weniger Tumorinvasion und Metastasierung zeigten als Zellen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden (Rigg u. Lemoine 2001).

Im Gegensatz dazu beschrieben Bramhall et al. und Gress et al., dass TIMPs in Tumoren häufig überexprimiert und z.T. mit schlechter Prognose assoziiert seien (Bramhall et al. 1996), (Gress et al. 1998).
Diese Arbeit bestätigt letztere Theorie, da die Pankreaskarzinomzellen, die aus höheren Tumorstadien (T_4) stammten, eine stärker exprimierte TIMP 2 aufwiesen als die Zellen, die aus niedrigen Stadien (T_1) stammten.
Beim Kriterium der Lymphknotenmetastasierung zeigte die Gruppe mit befallenen Lymphknoten eine verstärkte Expression der TIMP 3. Yokoyama et al. fanden über-exprimierte TIMP 3 in Magenkarzinomen, die mit einer Unterexpression von MMP 2 und somit einer verminderten Tumorinvasion einhergingen (Yokoyama et al. 2004).
Beim Kriterium der Lymphknotenmetastasierung zeigte sich die MMP 10 in der lymphknotenpositiven Gruppe verstärkt exprimiert, während die MMP 13 nur in den höheren Tumorstadien (T_4) vermehrt exprimiert wurde.
Charoenrat et al. publizierten bereits 1996, dass sowohl die MMP 10 als auch die MMP 13 neben anderen MMPs in Plattenepithelkarzinomzellen des Halses im Vergleich zu gesunden Zellen an Expressivität zugenommen haben (Charoenrat et al. 2001).
Dies lässt vermuten, dass eine verstärkte Expression an MMP 13 und TIMP 2 mit einer verstärkten lokalen Invasion, die Überexpression von MMP 10 und TIMP 3 jedoch mit einer Lymphknotenmetastasierung einhergeht.

Ein weiteres ECM-Gen, das sich im Stadium N_1 im Vergleich zu N_0 verstärkt exprimiert zeigte, war das Cathepsin L. Wie bereits oben erwähnt, ist für Cathepsin B und L bekannt, dass sie als prognostisch relevante Faktoren beim Pankreaskarzinom fungieren, da ihre verstärkte Expression signifikant mit dem Tumorgrading und einer verkürzten postoperativen Lebenszeit korrelieren (Niedergethmann et al. 2000). Spezielle Zusammen-hänge zwischen Cathepsin L und der Lymphknotenmetastasierung wurden bisher nicht publiziert.

Ein zusätzliches, im Stadium der Lymphknotenmetastasierung verstärkt exprimiertes Gen war das Beta-2-Integrin. Die Integrine sind sowohl für den Zell-Zellkontakt als auch für den Kontakt der Zelle mit der ECM zuständig, was als Voraussetzung für eine Metastasierung in die Lymphknoten gilt. Des Weiteren werden sie in humanen Lymphozyten bei oxydativem Stress stimuliert (Lin et al. 2006).

Proliferations-assoziierte Gene

Cyclin D1 als proliferations-assoziiertes Gen zeigte im Stadium N_1 eine erhöhte Genexpressivität im Vergleich zum Stadium N_0. Wie bereits oben unter den fortgeschrittenen Tumorstadien erwähnt (T_4 versus T_1), spielen die Cycline eine wesentliche Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus. Ein spezifischer Zusammenhang mit den Vorgängen der Lymphknoten-Metastasierung erscheint eher unwahrscheinlich; wahrscheinlicher ist, dass die erhöhte Expression das insgesamt fortgeschrittenere Tumorstadium widerspiegelt.

Zwei weitere in der Gruppe mit Lymphknotenmetastasierung unterexprimierte Gene waren das Metallothionein 1B und 1L. Die Metallothioneine (MT) gehören zur Familie der metallbindenden intrazellulären Proteine, die mit der Zellproliferation verbunden sind (Jin et al. 2002). Für das MT 1B ist bekannt, dass es im Pankreaskarzinom überexprimiert ist. Für das MT 1L konnte dies bisher noch nicht gezeigt werden (Xie et al. 2005).

Entzündungszellen

Ein weiteres Gen, das sich im Stadium der Lymphknoteninvasion (N_1) stärker exprimiert zeigte, war der Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4, Fusin). Kulbe et al. konnten zeigen, dass CXCR4 bei der Zellstimulation, der Zellbewegung, der Adhäsion, Invasion, Proliferation und malignen Progression eine wesentliche Rolle spielt (Kulbe et al. 2004). Vor diesem Hintergrund legen die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse nahe, dass CXCR4 eines der Schlüsselgene bei der Lymphknoteninvasion sein könnte.
Neben dem CXCR4 war das TGF-Beta verstärkt in dem Stadium der Lymphknoten-metastasierung exprimiert. TGF-Beta führt im Zusammenspiel mit K-ras-Mutationen zu einer „epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung“ von Pankreaskarzinomzellen (Ellenrieder et al. 2001), die durch eine Heraufregulierung mesenchymaler Marker und eine Herunterregulierung epithelialer Marker charakterisiert ist. Einhergehend mit diesen phänotypischen Veränderungen zeigt sich eine verstärkte Tumorzellmigration, Invasion und Zell-‚Scattering’ (Ellenrieder et al. 2001), so dass auch für TGF-Beta eine wesentliche Rolle bei der Lymphknotenmetastasierung angenommen werden kann.

4.3.3 Vergleich der M-Stadien

Durch die Auswertung der Expressionsprofile der Gruppe mit Fernmetastasen im Vergleich zur Gruppe ohne Fernmetastasen konnten 31 Gene, die verstärkt, und 13 Gene, die vermindert exprimiert waren, festgehalten werden. Auch hier waren die Gene, die für eine vermehrte Proliferation oder für einen verstärkten Metabolismus codierten, in großer Anzahl vertreten. ECM-Gene und Entzündungsmediatoren waren nur vereinzelt vertreten.

Gene der extrazellulären Matrix

Von den ECM-Proteinen zeigten sich fünf zwischen den Gruppen mit und ohne Fernmetastasen unterschiedlich exprimiert. Das Beta-2-Integrin, das Thrombospondin 1 und 4 (TSP-1 und 4) sowie die MMP 10 und MMP 13 wiesen alle im Stadium mit Fernmetastasen eine verminderte Expression auf.

Das Thrombospondin 1 (TSP-1) ist ein Matrixmolekül, welches eine Rolle in der Tumorinvasion, Angiogenese und Metastasierung des Pankreaskarzinoms spielt. Qian et al. zeigten, dass das TSP-1 in den die Pankreaskarzinomzellen umgebenden Stromazellen um den Faktor 2-3-mal stärker exprimiert wurde als in den Pankreaskarzinomzellen selbst. Dies führte zu einer Überaktivierung von MMP 9 (Qian et al. 2001).
Eine Überexpression von MMP 9 konnte in den von uns untersuchten Tumoren nicht bestätigt werden. Die MMP 10 und MMP 13 jedoch zeigten in dem Stadium mit Fernmetastasen eine verminderte Expression. Dies steht primär im Widerspruch zu den Ergebnissen von Charoenrat et al., die eine Überexpression von Matrixmetalloproteasen in Tumorzellen beschrieben (Charoenrat et al. 2001). Sun et al. dagegen beschrieben, dass MMP 13 von p53 in Tumor- und Entzündungszellen supprimierend beeinflusst würde (Sun et al. 2000). Eine vermehrte Expression des Suppressors p53 würde somit zu einer verminderten Expression von MMP 13 führen. Bezüglich der Fernmetastasierung konnte jedoch keine differentielle Expression von p53 gefunden werden.

Proliferations-assoziierte Gene

Unter den für die Proliferation codierenden Genen wiesen das Cyclin D2 und das CDC 10 Protein eine verminderte Expression im M_1-Stadium auf. Ebenso verhielten sich zwei von

drei Transkriptionsfaktoren und die Extracellular signal-regulated Kinase 5 (ERK 5; Synonym: MAP-Kinase 7). Von der ERK 5, wie auch von den zur selben Familie gehörigen ERK 1 und 2 ist bekannt, dass sie Cyclin D1 aktivieren, was zu einer vermehrten Zellproliferation führt (Mulloy et al. 2003). Im Vergleich der beiden Tumorstadien T_2 und T_3 war die ERK 5 im höheren Stadium verstärkt exprimiert. Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung von Cyclin D1 via ERK 5 einen frühen Schritt in der neoplastischen Transformation repräsentiert und für die Fernmetastasierung jedoch eine eher untergeordnete Rolle spielt.

Entzündungszellen

Unter den Entzündungszellen waren das Interleukin 8 (IL8) und das Macrophage Inflammatory Protein 2 alpha (MIP 2 alpha) vermindert exprimiert. Diese beiden Proteine gehören zur selben Familie der Chemokine (Okamoto et al. 1992) und leiten wesentliche Schritte im Entzündungsprozess ein. Sie werden z.B. von Makrophagen produziert, um neutrophile Granulozyten zur Migration zu aktivieren (Puthothu et al. 2006). Über ihre Rolle in Pankreaskarzinomzellen ist bisher wenig bekannt; eine eindeutige Rolle im Prozess der Fernmetastasierung kann diesen Genen bzw. ihren Genprodukten nicht zugewiesen werden.

Zytoskelett

Von den für das Zytoskelett codierenden Genen waren das Alpha-Tubulin und das Lipocortin 2 in den Stadien mit Fernmetastasierung vermehrt exprimiert.
Alpha-Tubulin ist für die Stabilität der Zelle verantwortlich. Durch seine Funktion als Zytoskelettprotein verhilft es der Zelle zur Aufrechterhaltung seiner Form und somit zur Einpassung in die Umgebung. Welche funktionelle Rolle die Modulation des Zytoskeletts bei der Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen spielt, ist weitgehend ungeklärt; jedoch wiesen Tan et al. ebenfalls eine erhöhte Genexpressivität von Alpha-Tubulin bei Pankreaskarzinomen nach (Tan et al. 2003).
Ein weiteres überexprimiertes Gen war das Lipocortin 2 (Annexin 2). Es gehört zu den vielen multifunktionalen Adapterproteinen, die die Tätigkeit des Aktin modulieren. Das Aktinzytoskelett unterstützt diverse Zellprozesse wie Endozytose, gezieltes Wachstum, Adhäsion und Migration (Falsey et al. 2006). Dabei ist Annexin 2 an den Macropinosomen

des F-Aktinin-Schwanzes vermehrt vorhanden und bindet über Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns-4,5P(2)), ein Phospholipid an die Phospholipase C Delta 1 (Rescher et al. 2004). Da Aktinin für die Motilität der Zelle verantwortlich ist, legt die verstärkte Expression von Lipocortin 2 eine Rolle dieses Proteins als Mediator der Zellmigration in metastasierten Tumorstadien nahe.

4.3.4 Vergleich der N- mit den M-Stadien und Vergleich von M_0M_1 mit T_1T_4

Nachdem die Expressionsprofile zu den jeweiligen Kriterien Tumorstadium, Lymphknotenmetastasierung und Fernmetastasierung untersucht worden sind, erfolgten nun kriteriumsübergreifende Vergleiche.

Es konnte gezeigt werden, dass sich drei Gene bezüglich der Lymphknotenmetastasierung entgegengesetzt verhielten als bei der Fernmetastasierung. Während die MMP 10, die Proteintyrosinphosphatase M und das Beta-2-Integrin im Stadium N_1 im Vergleich zu N_0 an Expressivität zunahmen, nahmen sie in M_1 im Vergleich zu M_0 an Expressivität ab.

Bodey et al. beschrieben eine deutliche Überexpression von MMP 3 und MMP 10 in Lungenadenokarzinomen, vor allem in der Nähe von Blutgefäßen. Die MMP 3 und MMP 10 seien in Pankreaskarzinomen vor allem für das expansive Tumorwachstum verantwortlich, während die MMP 2 und MMP 13 bei der in-situ-Tumorprogression, der Tumorinvasion sowie der Angiogenese eine wesentliche Rolle spielten (Bodey et al. 2001). Da die MMP 10 im Stadium der Lymphknotenmetastasierung vermehrt exprimiert, im Stadium der Fernmetastasierung jedoch vermindert exprimiert war, liegt die Vermutung nahe, dass ihre Rolle bezüglich der lokalen Tumorausdehnung entscheidender ist als bei der Fernmetastasierung. Die MMP 13 wies im Stadium T_3 eine höhere Expression auf als in T_4, während sie im Stadium der Fernmetastasierung weniger stark exprimiert war als im Stadium ohne Fernmetastasierung. Auch hier liegt die Vermutung nahe, dass ihre Rolle in der lokalen Tumorausdehnung wichtiger ist als bezüglich der Fernmetastasierung.

Ein weiteres Gen, das bei der Lymphknotenmetastasierung verstärkt, bei der Fernmetastasierung jedoch vermindert exprimiert wurde, war die Protein-tyrosinphosphatase M (PTP M). Von dieser ist bekannt, dass sie neben dem Cadherin/Cateninkomplex auf der Zelloberfläche lokalisiert ist und mit diesem interagiert. Schnekenburger et al. konnten eine differentielle Expression der PTPs in Azinuszellen

zeigen sowie demonstrieren, dass deren Inhibition zur Loslösung der Pankreas-zelladhäsionen führen kann. Somit spielen sie eine wesentliche Rolle in der Entwicklung und Morphogenese der Invasion maligner Tumore (Schnekenburger et al. 1999).
Ein anderes Gen, das eine verstärkte Expression im Rahmen der Lymphknotenmetastasierung und eine verminderte Expression im Rahmen der Fernmetastasierung zeigte, war das Beta-2-Integrin. Dieses Protein wurde bereits unter dem Vergleich der Tumorstadien erwähnt, da es in den höheren T-Stadien vermehrt exprimiert war. Die Integrine spielen sowohl für den Zell-Zellkontakt als auch für den Kontakt der Zelle mit der ECM eine wichtige Rolle (Lin et al. 2006). Die detaillierte funktionelle Charakterisierung dieses und der anderen in diesem Kapitel erwähnten Gene kann potentiell entscheidend dazu beitragen, die mechanistischen Unterschiede zwischen der lokalen und Lymphknotenmetastasierung einerseits, und der Fernmetastasierung andererseits näher aufzuklären.

4.3.5 Vergleich der Staging-Gruppen untereinander und mit dem Kriterium der Fernmetastasierung

Um die Untersuchungen zu den Kriterien der Tumorausdehnung und der Metastasierung zu unterstützen, wurden die differentiell exprimierten Gene zwischen den einzelnen Staginggruppen ermittelt. Hier spiegelten sich die oben genannten Ergebnisse wider und konnten als Bestätigung der bisherigen Untersuchungen gesehen werden. Während die Entzündungsmediatoren eine eher untergeordnete Rolle spielten, waren die ECM-Gene, die für den Metabolismus codierenden Gene sowie die proliferationsfördernden Gene in den höheren Staginggruppen vermehrt exprimiert.
Zu erwähnen bleibt noch ein Vertreter der Disintegrin And Metalloproteinase Domain ADAM 15, der sich in höheren Stadien (S_4) verstärkt exprimiert zeigte.
Die ADAMs beinhalten eine Familie der mit der Membran verankerten Zelloberflächenproteine, die eine wesentliche Rolle bezüglich der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion spielen. Sie fördern die Tumorzelladhäsion und sind aus diesem Grund in weiter fortgeschrittenen Tumorstadien verstärkt vertreten (Iba et al. 1999).

Anschließend wurden die differentiell exprimierten Gene aus dem Vergleich von S_1 mit S_4 mit den differentiell exprimierten Genen des Vergleiches von M_0 mit M_1 untersucht.

Hierbei fiel auf, dass das bereits oben diskutierte Alpha-Tubulin sowohl in S_4 im Vergleich von S_4 zu S_3, als auch in M_1 im Vergleich zu M_0 in seiner Genexpression erhöht war. Die Stabilität des Zellgerüstes spielt daher augenscheinlich sowohl bei der lokalen Tumorausdehnung als auch bei der Fernmetastasierung eine wesentliche Rolle.

4.3.6 Cox-Modell

Um zu untersuchen, ob bestimmte Expressionssignaturen signifikant mit der Überlebenszeit korrelieren, wurde das Cox-Regressionsmodell herangezogen. Dies ist ein semiparametrisches Verfahren zur Analyse von zensierten Verlaufsdaten.
Die Genexpressionswerte der Kriterien Tumorstadium, Lymphknotenmetastasierung und Fernmetastasierung flossen in die Prädiktorvariablen, deren Einfluss auf die Zielvariable (Tod= 1) untersucht wurde. Dabei wird die einzelne Gewichtung der Prädiktorvariablen über einen Koeffizienten dargestellt.

Die Untersuchung, bei der alle Expressionswerte als Rohwerte bezüglich des Tumorstadiums, der Lymphknotenmetastasierung und der Fernmetastasierung gemeinsam in eine einzige Prädiktorvariable flossen, war nicht als statistisch signifikantes Ergebnis zu werten, da der p-Wert 0,29 betrug.

Bei Berechnung der zur Basis 2 logarithmierten Expressionswerte bezüglich der T-, N- und M-Stadien, die in eine gemeinsame Variable flossen, lag der p-Wert bei 0,064. Dies kann als bedingt statistisch signifikantes Ergebnis gewertet werden. Mit einer 6,4 %igen Irrtumswahrscheinlichkeit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit zu sterben um 3,81 (381 %), wenn sich die Prädiktorvariable X um den Wert 1 erhöht. (Ihr Wert war X= 0,0048, der Standardfehler betrug se= 0,00259).

Um zu untersuchen, ob die Expressionswerte der T-, N- und M-Stadien als statistisch signifikanter Prädiktor für das Überleben gelten, wurden sie in drei Prädiktorvariablen gefasst. Hier lagen die p-Werte des t-Testes bei 0,1.
Bei den logarithmierten Expressionswerten betrug der p-Wert sogar etwa 0,3. Somit können diese Werte nicht als statistisch signifikant angesehen werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das duktale Pankreaskarzinom wird in den meisten Fällen erst im fortgeschrittenen und somit prognostisch ungünstigen Stadium diagnostiziert, und geht somit mit einer schlechten Überlebenszeit einher. Daher ist es unumgänglich, neue Verfahren zur frühzeitigen und sicheren Diagnostik, z.B. im Rahmen einer Screeninguntersuchung, zu ermöglichen.

Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe von Kandidaten-Gen-Arrays Expressionsprofile von frühen und späten Stadien des Pankreaskarzinoms zu vergleichen. Es wurden die Genexpressionsveränderungen sowohl im Verlauf der Tumorprogression (steigende T-Stadien) als auch bezüglich der Lymphknoten- und Fernmetastasierung bestimmt.

Außerdem wurde der Einfluß dieser Genexpressionsveränderungen auf die Überlebenszeit analysiert. Darüber hinaus wurde untersucht, ob anhand der Expressionsprofile eine Vorhersage des Tumorstadiums getroffen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von in Vorarbeiten hergestellten spezialisierten cDNA-Arrays Expressionsprofile von insgesamt 55 Gewebeproben duktaler Adenokarzinome des Pankreas erstellt. Es wurden Informationen über globale Genexpressionsänderungen im Verlauf der Tumorprogression gewonnen. Anhand des Vergleichs von Tumorstadium, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung wurden typische Expressionsunterschiede identifiziert, anhand derer fortgeschrittene Pankreaskarzinome von früheren Tumorstadien unterschieden werden können.

Bezüglich der steigenden Tumorstadien waren vor allem die Zelloberflächen-, extrazelluläre Matrix- und Zell-Zell-Kommunikations-assoziierten Kategorien betroffen.

Im Stadium der Tumorausbreitung jenseits des Pankreas (T_3) zeigten sich im Vergleich zu den niedrigen Tumorstadien vor allem Gene, die für die extrazelluläre Matrix, für die Zellproliferation und für den Metabolismus codieren verstärkt exprimiert.

Bezüglich der Lymphknotenmetastasierung wiesen besonders Gene, die für die extrazelluläre Matrix und für den Metabolismus codieren, sowie Entzündungsmediatoren eine verstärkte Expression auf.

Im Gegensatz dazu wiesen auffällig viele Gene, die für die extrazelluläre Matrix, für die Proliferation und für Entzündungsmediatoren codierten, im Falle einer Fernmetastasierung (Stadium M_1) unterexprimierte Werte auf.

Die Expressionswerte differentiell exprimierter Gene nach den Kriterien lokale Tumorinvasion, Lymphknotenmetastasierung und Fernmetastasierung konnten quantitativ nach Normalisierung und Logarithmierung als Prädiktorvariable in das Regressionsmodell von Cox eingeführt und ihr Einfluss auf die Überlebenszeit analysiert werden. Dabei wurde ein bedingt statistisch signifikanter Einfluss dieser Variablen auf die Überlebenszeit nachgewiesen.

Mit Hilfe von unüberwachten Clusterverfahren wurden Ähnlichkeitsverhältnisse innerhalb der Kriterien Tumorausbreitung, Lymphknoten-, und Fernmetastasierung in Form von Binär-Bäumen dargestellt.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann postuliert werden, dass eine Überexpression von bestimmten Zelloberflächengenen, für die Zell-Zellkommunikation codierenden Genen sowie Genen der extrazellulären Matrix wesentlich zur lokalen Tumorausbreitung und Lymphknoteninvasion von Pankreaskarzinomen beiträgt.

Außerdem kann gesagt werden, dass die Expression von Entzündungsmediatoren, von extrazelluläre Matrix Genen und für die Proliferation codierender Gene bezüglich der Lymphknotenmetastasierung und Fernmetastasierung gegensätzlich ist.

Zusammen mit den bereits verfügbaren prognostischen Informationen aus „konventionellen“ diagnostischen Ansätzen könnten diese Daten eine wichtige Basis für zukünftige neuartige diagnostische Verfahren sein. Diese könnten anhand molekularer Analysen von aus Probebiopsien entnommenem Material Aussagen über wahrscheinliche Tumorstadien, den Lymphknoten- und Metastasenstatus sowie die Überlebenszeit ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

1. Akiyama SK, Olden K, Yamada KM: Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev 14: 173-189 (1995)

2. Allgayer H, Heiss MM, Höfler H: Neue Prognosefaktoren bei gastrointestinalen Karzinomen. In: Tumorzentrum München (Hrsg.): Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge gastrointestinaler Tumore, Zuckschwerdtverlag, München, S.26-27 (2001)

3. Arnaout MA, Dana N, Gupta SK, Tenen DG, Fathallah DM: Point mutations impairing cell surface expression of the common beta subunit (CD18) in a patient with leukocyte adhesion molecule (Leu-CAM) deficiency. J Clin Invest 85: 977-981 (1990)

4. Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, Baylin SB, Graff JR: Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. Cancer Res 59: 798-802 (1999)

5. Bassi DE, Lopez DC, Mahloogi H, Zucker S, Thomas G, Klein-Szanto AJ: Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 98: 10326-10331 (2001)

6. Bauer TW, Liu W, Fan F, Camp ER, Yang A, Somcio RJ, Bucana CD, Callahan J, Parry GC, Evans DB, Boyd DD, Mazar AP, Ellis LM: Targeting of urokinase plasminogen activator receptor in human pancreatic carcinoma cells inhibits c-Met- and insulin-like growth factor-I receptor-mediated migration and invasion and orthotopic tumor growth in mice. Cancer Res 65: 7775-7781 (2005)

7. Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE: Immunocytochemical detection of the expression of members of the matrix metalloproteinase family in adenocarcinomas of the pancreas. In Vivo 15: 71-76 (2001)

8. Bramhall SR, Stamp GW, Dunn J, Lemoine NR, Neoptolemos JP: Expression of collagenase (MMP2), stromelysin (MMP3) and tissue inhibitor of the metalloproteinases (TIMP1) in pancreatic and ampullary disease. Br J Cancer 73: 972-978 (1996)

9. Buchholz M, Biebl A, Neebetae A, Wagner M, Iwamura T, Leder G, Adler G, Gress TM: SERPINE2 (protease nexin I) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo. Cancer Res 63: 4945-4951 (2003)

10. Cai M, Onoda K, Takao M, Kyoko IY, Shimpo H, Yoshida T, Yada I: Degradation of tenascin-C and activity of matrix metalloproteinase-2 are associated with tumor recurrence in early stage non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 8: 1152-1156 (2002)

11. Chang NT, Chang WS, Lin SC, Wu CW, Wu FY: Tissue-specific cancer-related serpin gene cluster at human chromosome band 3q26. Genes Chromosomes Cancer 29: 240-255 (2000)

12. Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA: Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 127: 813-820 (2001)

13. Cox DR: Regression Models and Life-Tabels. Journal of the Royal Statistical Society 34: 187-220 (1972)

14. Duxbury MS, Ashley SW, Whang EE: Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness by blebbistatin: a novel myosin II inhibitor. Biochem Biophys Res Commun 313: 992-997 (2004)

15. Ebert MP, Hernberg S, Fei G, Sokolowski A, Schulz HU, Lippert H, Malfertheiner P: Induction and expression of cyclin D3 in human pancreatic cancer. J Cancer Res Clin Oncol 127: 449-454 (2001)

16. Ebrahimi B, Tucker SL, Li D, Abbruzzese JL, Kurzrock R: Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis. Cancer 101: 2727-2736 (2004)

17. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci USA 95: 14863-14868 (1998)

18. Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G, Gress TM: Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. Cancer Res 61: 4222-4228 (2001)

19. Evans JD, Cornford PA, Dodson A, Greenhalf W, Foster CS, Neoptolemos JP: Detailed tissue expression of bcl-2, bax, bak and bcl-x in the normal human pancreas and in chronic pancreatitis, ampullary and pancreatic ductal adenocarcinomas. Pancreatology 1: 254-262 (2001)

20. Evans JD, Cornford PA, Dodson A, Neoptolemos JP, Foster CS: Expression patterns of protein kinase C isoenzymes are characteristically modulated in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. Am J Clin Pathol 119: 392-402 (2003)

21. Falsey RR, Marron MT, Gunaherath GM, Shirahatti N, Mahadevan D, Gunatilaka AA, Whitesell L: Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II. Nat Chem Biol 2: 33-38 (2006)

22. French JJ, Cresswell J, Wong WK, Seymour K, Charnley RM, Kirby JA: T cell adhesion and cytolysis of pancreatic cancer cells: a role for E-cadherin in immunotherapy? Br J Cancer 87: 1034-1041 (2002)

23. Fujiuchi N, Aglipay JA, Ohtsuka T, Maehara N, Sahin F, Su GH, Lee SW, Ouchi T: Requirement of IFI16 for the maximal activation of p53 induced by ionizing radiation. J Biol Chem 279: 20339-20344 (2004)

24. Geng M, Wallrapp C, Muller-Pillasch F, Frohme M, Hoheisel JD, Gress TM: Isolation of differentially expressed genes by combining representational difference analysis (RDA) and cDNA library arrays. Biotechniques 25: 434-438 (1998)

25. Gillette JM, Chan DC, Nielsen-Preiss SM: Annexin 2 expression is reduced in human osteosarcoma metastases. J Cell Biochem 92: 820-832 (2004)

26. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 286: 531-537 (1999)

27. Gress TM, Muller-Pillasch F, Geng M, Zimmerhackl F, Zehetner G, Friess H, Buchler M, Adler G, Lehrach H: A pancreatic cancer-specific expression profile. Oncogene 13: 1819-1830 (1996)

28. Gress TM, Wallrapp C, Frohme M, Muller-Pillasch F, Lacher U, Friess H, Buchler M, Adler G, Hoheisel JD: Identification of genes with specific expression in pancreatic cancer by cDNA representational difference analysis. Genes Chromosomes Cancer 19: 97-103 (1997)

29. Gress TM, Menke A, Bachem M, Muller-Pillasch F, Ellenrieder V, Weidenbach H, Wagner M, Adler G: Role of extracellular matrix in pancreatic diseases. Digestion 59: 625-637 (1998)

30. Gyorffy H, Holczbauer A, Nagy P, Szabo Z, Kupcsulik P, Paska C, Papp J, Schaff Z, Kiss A: Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. Virchows Arch 447: 961-968 (2005)

31. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE: DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. Science 271: 350-353 (1996)

32. Harms V: Biomathematik, Statistik und Dokumentation: eine leichtverständliche Einführung nach den Gegenstandskatalogen für den 1. und 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Harms, Kiel, S.185-187 (1988)

33. Hayasaka K, Nanao K, Tahara M, Sato W, Takada G, Miura M, Uyemura K: Isolation and sequence determination of cDNA encoding the major structural protein of human peripheral myelin. Biochem Biophys Res Commun 180: 515-518 (1991)

34. Hayes MJ, Merrifield CJ, Shao D, Ayala-Sanmartin J, Schorey CD, Levine TP, Proust J, Curran J, Bailly M, Moss SE: Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway. J Biol Chem 279: 14157-14164 (2004)

35. Heinemann V, Allescher HD, Busch M, Heiss MM, Helmberger T, Krämling HJ, Lersch C, Roder JD, Schoenberg MH, Schwalhorn A, Waldner H, Wiebecke B, Zimmermann F: Karzinome des exokrinen Pankreas. In: Tumorzentrum München (Hrsg.): Manual gastrointestinale Tumore, Zuckschwerdtverlag, München, S.181-194 (2001)

36. Herold G: Pankreaskarzinom. In: Herold G (Hrsg.): Innere Medizin. Heroldverlag, Köln, S.431-432 (2005)

37. Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH: Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. Int J Cancer 98: 362-369 (2002)

38. Hirano T, Shino Y, Saito T, Komoda F, Okutomi Y, Takeda A, Ishihara T, Yamaguchi T, Saisho H, Shirasawa H: Dominant negative MEKK1 inhibits survival of pancreatic cancer cells. Oncogene 21: 5923-5928 (2002)

39. Hofmann W, Ottmann OG, Hoelzer D: Globale Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays: Diagnostik und Klassifikation von Tumorerkrankungen. Deutsches Ärzteblatt 5: 271-274 (2003)

40. Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, Yamada Y, Chiba H, Hirohashi S: Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. J Cell Biol 140: 1383-1393 (1998)

41. Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE: Genetic progression in the pancreatic ducts. Am J Pathol 156: 1821-1825 (2000)

42. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, MacLeod PM, Hayashi A, Monaghan KG, Maung R, Seruca R, Jackson CE, Caldas C: Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. N Engl J Med 344: 1904-1909 (2001)

43. Iba K, Albrechtsen R, Gilpin BJ, Loechel F, Wewer UM: Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. Am J Pathol 154: 1489-1501 (1999)

44. Ishiwata T, Takahashi K, Shimanuki Y, Ohashi R, Cui R, Takahashi F, Shimizu K, Miura K, Fukuchi Y: Serum tenascin-C as a potential predictive marker of angiogenesis in non-small cell lung cancer. Anticancer Res 25: 489-495 (2005)

45. Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Scheuner D, Kaufman RJ, Cavener DR, Wek RC: Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. Mol Cell Biol 23: 5651-5663 (2003)

46. Jin R, Chow VT, Tan PH, Dheen ST, Duan W, Bay BH: Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. Carcinogenesis 23: 81-86 (2002)

47. Johnson AH, Frierson HF, Zaika A, Powell SM, Roche J, Crowe S, Moskaluk CA, El Rifai W: Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis. Am J Pathol 167: 577-584 (2005)

48. Jones LE, Humphreys MJ, Campbell F, Neoptolemos JP, Boyd MT: Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. Clin Cancer Res 10: 2832-2845 (2004)

49. Kawakami K, Kawakami M, Husain SR, Puri RK: Effect of interleukin (IL)-4 cytotoxin on breast tumor growth after in vivo gene transfer of IL-4 receptor alpha chain. Clin Cancer Res 9: 1826-1836 (2003)

50. Kilic T, Bayri Y, Ozduman K, Acar M, Diren S, Kurtkaya O, Ekinci G, Bugra K, Sav A, Ozek MM, Pamir MN: Tenascin in meningioma: expression is correlated with anaplasia, vascular endothelial growth factor expression, and peritumoral edema but not with tumor border shape. Neurosurgery 51: 183-192 (2002)

51. Koolpe M, Dail M, Pasquale EB: An ephrin mimetic peptide that selectively targets the EphA2 receptor. J Biol Chem 277: 46974-46979 (2002)

52. Kreutzig T: G-Protein-gekoppelter Rezeptor. In: Kreutzig T (Hrsg.): Biochemie Kurzlehrbuch, Urban und Fischer, München Jena, S. 296 (2000)

53. Kuester D, Vieth M, Peitz U, Kahl S, Stolte M, Roessner A, Weber E, Malfertheiner P, Wex T: Upregulation of cathepsin W-expressing T cells is specific for autoimmune atrophic gastritis compared to other types of chronic gastritis. World J Gastroenterol 11: 5951-5957 (2005)

54. Kulbe H, Levinson NR, Balkwill F, Wilson JL: The chemokine network in cancer - much more than directing cell movement. Int J Dev Biol 48: 489-496 (2004)

55. Ladiwala U, Li H, Antel JP, Nalbantoglu J: p53 induction by tumor necrosis factor-alpha and involvement of p53 in cell death of human oligodendrocytes. J Neurochem 73: 605-611 (1999)

56. Lal G, Liu L, Hogg D, Lassam NJ, Redston MS, Gallinger S: Patients with both pancreatic adenocarcinoma and melanoma may harbor germline CDKN2A mutations. Genes Chromosomes Cancer 27: 358-361 (2000)

57. Lepenies J: Pankreaskarzinom. In: Bühling KJ, Lepenies J, Witt K (Hrsg.): Intensivkurs allgemeine und spezielle Pathologie, Urban und Fischer, München Jena, S. 296-297 (2000)

58. Li B, Ouyang B, Pan H, Reissmann PT, Slamon DJ, Arceci R, Lu L, Dai W: Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas. J Biol Chem 271: 19402-19408 (1996)

59. Lin LC, Wang YH, Hou YC, Chang S, Liou KT, Chou YC, Wang WY, Shen YC: The inhibitory effect of phenylpropanoid glycosides and iridoid glucosides on free radical production and beta2 integrin expression in human leucocytes. J Pharm Pharmacol 58: 129-135 (2006)

60. Liu W, Ahmad SA, Jung YD, Reinmuth N, Fan F, Bucana CD, Ellis LM: Coexpression of ephrin-Bs and their receptors in colon carcinoma. Cancer 94: 934-939 (2002)

61. Lu Q, Dobbs LJ, Gregory CW, Lanford GW, Revelo MP, Shappell S, Chen YH: Increased expression of delta-catenin/neural plakophilin-related armadillo protein is associated with the down-regulation and redistribution of E-cadherin and p120ctn in human prostate cancer. Hum Pathol 36: 1037-1048 (2005)

62. Matsubayashi H, Sato N, Fukushima N, Yeo CJ, Walter KM, Brune K, Sahin F, Hruban RH, Goggins M: Methylation of cyclin D2 is observed frequently in pancreatic cancer but is also an age-related phenomenon in gastrointestinal tissues. Clin Cancer Res 9: 1446-1452 (2003)

63. Meyer R: Pankreaskarzinom: Kombination von Diagnoseverfahren verbessert das Staging. Deutsches Ärzteblatt 3: 88-89 (2002)

64. Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS: Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. Journal of American Medical Association 286: 921-929 (2001)

65. Mulloy R, Salinas S, Philips A, Hipskind RA: Activation of cyclin D1 expression by the ERK5 cascade. Oncogene 22: 5387-5398 (2003)

66. Neureiter D, Zopf S, Dimmler A, Stintzing S, Hahn EG, Kirchner T, Herold C, Ocker M: Different capabilities of morphological pattern formation and its association with the expression of differentiation markers in a xenograft model of human pancreatic cancer cell lines. Pancreatology 5: 387-397 (2005)

67. Niedergethmann M, Hildenbrand R, Wolf G, Verbeke CS, Richter A, Post S: Angiogenesis and cathepsin expression are prognostic factors in pancreatic adenocarcinoma after curative resection. Int J Pancreatol 28: 31-39 (2000)

68. Niedergethmann M, Wostbrock B, Sturm JW, Willeke F, Post S, Hildenbrand R: Prognostic impact of cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in pancreatic adenocarcinoma. Pancreas 29: 204-211 (2004)

69. Nielsen A, Scarlett CJ, Samra JS, Gill A, Li Y, Allen BJ, Smith RC: Significant overexpression of urokinase-type plasminogen activator in pancreatic adenocarcinoma using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. J Gastroenterol Hepatol 20: 256-263 (2005)

70. Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F: Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. Curr Biol 10: 1009-1012 (2000)

71. Okamoto S, Nomura H, Matsushima K: Function, molecular structure and gene expression of IL-8. Nippon Rinsho 50: 1816-1820 (1992)

72. Olver S, Groves P, Buttigieg K, Morris ES, Janas ML, Kelso A, Kienzle N: Tumor-derived interleukin-4 reduces tumor clearance and deviates the cytokine and granzyme profile of tumor-induced CD8+ T Cells. Cancer Res 66: 571-580 (2006)

73. Plesneva SA, Shpakov AO, Kuznetsova LA, Pertseva MN: The role of protein kinase C in insulin signal transduction via adenylyl cyclase signaling mechanism. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova 87: 1106-1117 (2001)

74. Puthothu B, Krueger M, Heinze J, Forster J, Heinzmann A: (Publikation in Vorbereitung)

75. Qian X, Rothman VL, Nicosia RF, Tuszynski GP: Expression of thrombospondin-1 in human pancreatic adenocarcinomas: role in matrix metalloproteinase-9 production. Pathol Oncol Res 7: 251-259 (2001)

76. Rescher U, Ruhe D, Ludwig C, Zobiack N, Gerke V: Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. J Cell Sci 117: 3473-3480 (2004)

77. Rieder H: Das familiäre Pankreaskarzinom:klinische Manifestation, genetische Grundlagen und Möglichkeiten der Früherkennung. Deutsches Ärzteblatt 99: 2489-2495 (2002)

78. Rigg AS, Lemoine NR: Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect in vivo. Cancer Gene Ther 8: 869-878 (2001)

79. Schek N, Hall BL, Finn OJ: Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res 48: 6354-6359 (1988)

80. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K: Anatomie. Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 577-578 (1997)

81. Schmidt K: Analysis of the structure and function of protein phosphatase 2A. Philosophische Dissertation, Universität Basel (2004)

82. Schnekenburger J, Mayerle J, Simon P, Domschke W, Lerch MM: Protein tyrosine dephosphorylation and the maintenance of cell adhesions in the pancreas. Ann N Y Acad Sci 880: 157-165 (1999)

83. Shewan AM, Maddugoda M, Kraemer A, Stehbens SJ, Verma S, Kovacs EM, Yap AS: Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. Mol Biol Cell 16: 4531-4542 (2005)

84. Shin SJ, Kim KO, Kim MK, Lee KH, Hyun MS, Kim KJ, Choi JH, Song HS: Expression of E-cadherin and uPA and their association with the prognosis of pancreatic cancer. Jpn J Clin Oncol 35: 342-348 (2005)

85. Simpkins SB, Bocker T, Swisher EM, Mutch DG, Gersell DJ, Kovatich AJ, Palazzo JP, Fishel R, Goodfellow PJ: MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. Hum Mol Genet 8: 661-666 (1999)

86. Soini Y: Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. Histopathology 46: 551-560 (2005)

87. Sommers CL, Walker-Jones D, Heckford SE, Worland P, Valverius E, Clark R, McCormick F, Stampfer M, Abularach S, Gelmann EP: Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells. Cancer Res 49: 4258-4263 (1989)

88. Stetler-Stevenson WG: Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev 9: 289-303 (1990)

89. Strome SE, Kawakami K, Alejandro D, Voss S, Kasperbauer JL, Salomao D, Chen L, Maki RA, Puri RK: Interleukin 4 receptor-directed cytotoxin therapy for human head and neck squamous cell carcinoma in animal models. Clin Cancer Res 8: 281-286 (2002)

90. Subramanian G, Schwarz RE, Higgins L, McEnroe G, Chakravarty S, Dugar S, Reiss M: Targeting endogenous transforming growth factor beta receptor signaling in SMAD4-deficient human pancreatic carcinoma cells inhibits their invasive phenotype1. Cancer Res 64: 5200-5211 (2004)

91. Sun Y, Cheung JM, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Wenger L, Altman RD, Howell DS, Cheung HS: Wild type and mutant p53 differentially regulate the gene expression of human collagenase-3 (hMMP-13). J Biol Chem 275: 11327-11332 (2000)

92. Takeshi U, Sadar MD, Suzuki H, Akakura K, Sakamoto S, Shimbo M, Suyama T, Imamoto T, Komiya A, Yukio N, Ichikawa T: Interleukin-4 in patients with prostate cancer. Anticancer Res 25: 4595-4598 (2005)

93. Tan ZJ, Hu XG, Cao GS, Tang Y: Analysis of gene expression profile of pancreatic carcinoma using cDNA microarray. World J Gastroenterol 9: 818-823 (2003)

94. Tchilian EZ, Wallace DL, Wells RS, Flower DR, Morgan G, Beverley PC: A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. J Immunol 166: 1308-1313 (2001)

95. Tefferi A, Bolander ME, Ansell SM, Wieben ED, Spelsberg TC: Primer on medical genomics. Part III: Microarray experiments and data analysis. Mayo Clin Proc 77: 927-940 (2002)

96. Turashvili G, Bouchal J, Burkadze G, Kolalr Z: Differentiation of tumours of ductal and lobular origin: II. Proteomics of invasive ductal and lobular breast carcinomas. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 149: 63-68 (2005)

97. Uno K, Shimada S, Tsuruta J, Matsuzaki H, Tashima S, Ogawa M: Nuclear localization of brain-type glycogen phosphorylase in some gastrointestinal carcinoma. Histochem J 30: 553-559 (1998)

98. Usami Y, Chiba H, Nakayama F, Ueda J, Matsuda Y, Sawada N, Komori T, Ito A, Yokozaki H: Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. Hum Pathol 37: 569-577 (2006)

99. Westphal S, Kalthoff H: Apoptosis: targets in pancreatic cancer. Mol Cancer 2: 6 (2003)

100. Wex T, Wex H, Hartig R, Wilhelmsen S, Malfertheiner P: Functional involvement of cathepsin W in the cytotoxic activity of NK-92 cells. Federation of European Biochemical Societies Letter 552: 115-119 (2003)

101. Xie Y, Zhao YP, Chen G, Yuan CH, Li LJ: Metallothionein and its isoform genes expression in the human pancreatic cancer cell strains and their function. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 27: 619-623 (2005)

102. Yakobson E, Eisenberg S, Isacson R, Halle D, Levy-Lahad E, Catane R, Safro M, Sobolev V, Huot T, Peters G, Ruiz A, Malvehy J, Puig S, Chompret A, Avril MF, Shafir R, Peretz H, Bressac-de Paillerets B: A single Mediterranean, possibly Jewish, origin for the Val59Gly CDKN2A mutation in four melanoma-prone families. Eur J Hum Genet 11: 288-296 (2003)

103. Yasui K, Okamoto H, Arii S, Inazawa J: Association of over-expressed TFDP1 with progression of hepatocellular carcinomas. J Hum Genet 48: 609-613 (2003)

104. Yeo CJ, Cameron JL: Prognostic factors in ductal pancreatic cancer. Langenbecks Arch Surg 383: 129-133 (1998)

105. Yokoyama T, Nakamura H, Otani Y, Kubota T, Fujimoto N, Seiki M, Kitajima M, Okada Y: Differences between scirrhous and non-scirrhous human gastric carcinomas from the aspect of proMMP-2 activation regulated by TIMP-3. Clin Exp Metastasis 21: 223-233 (2004)

7 Tabellarischer Anhang

7.1 UICC 2002 für exokrine Pankreaskarzinome

Tabelle 1: T, N, M-Stadien:

Aufgeführt sind die jeweiligen Kriterien zum zugehörigen T, N, und M-Stadium:

T_x	Primärtumor nicht beurteilbar
T_0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T_1	Tumor begrenzt auf Pankreas, < 2cm in größter Ausdehnung
T_2	Tumor begrenzt auf Pankreas, >2 cm in größter Ausdehnung
T_3	Tumorausbreitung jenseits des Pankreas, ohne Infiltration des Truncus coeliacus oder der Arteria mesenterica superior
T_4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus oder Arteria mesenterica superior
N_x	Regionäre Lympknoten können nicht beurteilt werden
N_0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N_1	Regionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden
M_x	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M_0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M_1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 2: S-Stadien (staging)

Aufgeführt sind die jeweiligen Kriterien zum zugehörigen S-Stadium:

S-Stadium 0	Tis	N_0	M_0
S-Stadium 1a	T_1	N_0	M_0
S-Stadium 1b	T_2	N_0	M_0
S-Stadium 2a	T_3	N_0	M_0
S-Stadium 2b	T_1, T_2, T_3	N_1	M_0
S-Stadium 3	T_4	jedes N	M_0
S-Stadium 4	jedes T	jedes N	M_1

7.2 Cox-Modell: Computerbefehle und Ergebnisse mit dem Programm “R”

Rohwerte, eine Variable

Angegeben sind die Computerbefehle, eingegeben in das Rechensprogramm „R“, bezüglich der Rohwerte (ein Variable).

```
 > TABLE <- matrix(scan("../Rohwerte.txt", 0), nrow=3, byrow=TRUE)
Read 150 items
> #print(TABLE)
> time=TABLE[1, ]
> status=TABLE[3, ]
> X=TABLE[2, ]
> library(survival)
> coxph(Surv(time,status)~X)
Call: coxph(formula = Surv(time, status) ~ X)
   coef exp(coef) se(coef)    z    p
X 0.00168      1.00  0.00158 1.07 0.29
Likelihood ratio test=1.13  on 1 df, p=0.288  n= 50
```

logarithmierte Werte, eine Variable

Angegeben sind die Computerbefehle, eingegeben in das Rechensprogramm „R“, bezüglich der logarithmierten Werte (eine Variable).

```
> TABLE <- matrix(scan("../p-zeit-log2.tot.txt", 0), nrow=3, byrow=TRUE)
Read 150 items
> > time = TABLE[1,]
> status=TABLE[3,]
> X=TABLE[2,]
> > library(survival)
Loading required package: splines
> > coxph(Surv(time,status)~X)
Call: coxph(formula = Surv(time, status) ~ X)
   coef exp(coef) se(coef)    z     p
```

X 0.0048 1.00 0.00259 1.85 0.064

Likelihood ratio test=3.81 on 1 df, p=0.0508 n= 50

Rohwerte, drei Variable

Angegeben sind die Computerbefehle, eingegeben in das Rechensprogramm „R“, bezüglich der Rohwerte (drei Variable).

```
> time= TABLEAU [4, ]
> status=TABLEAU [5, ]
> X=TABLEAU[1, ]
>  Y=TABLEAU[2, ]
>  Z=TABLEAU[3, ]
>  library(survival)
> coxph(Surv(time,status)~X+Y+Z)
Call: coxph(formula = Surv(time, status) ~ X + Y + Z)
     coef exp(coef) se(coef)     z     p
X  0.00339     1.003  0.00323  1.05 0.290
Y  0.00585     1.006  0.00291  2.01 0.044
Z -0.00681     0.993  0.00725 -0.94 0.350
Likelihood ratio test=6.49  on 3 df, p=0.09  n= 50
```

logarithmierte Werte, drei Variable

Angegeben sind die Computerbefehle, eingegeben in das Rechensprogramm „R“, bezüglich der logarithmierten Werte (drei Variable).

```
> time= TABLEAU [4, ]
> status=TABLEAU [5, ]
> X=TABLEAU[1, ]
> Y=TABLEAU[2, ]
> Z=TABLEAU[3, ]
> library(survival)
Loading required package: splines
> coxph(Surv(time,status)~X+Y+Z)
Call: coxph(formula = Surv(time, status) ~ X + Y + Z)
```

	coef	exp(coef)	se(coef)	z	p
X	0.00490	1.005	0.00517	0.947	0.34
Y	0.01886	1.019	0.02079	0.907	0.36
Z	-0.00743	0.993	0.01220	-0.609	0.54

Likelihood ratio test=5 on 3 df, p=0.172 n= 50

7.3 Differentiell exprimierte Gene: Liste der Rohwerte

In den folgenden Tabellen sind die differentiell exprimierten Gene mit deren Funktionen, Mittelwerten und den dazu gehörigen T-Testwerten angegeben.

Tabelle 3: Vergleich von T_1 mit T_2

In der folgenden Tabelle sind die differentiell exprimierten Gene mit deren Funktionen, Mittelwerten und den dazu gehörigen T-Testwerten angegeben.

Gene Description	Funktion	Mittelwert T_1	Mittelwert T_2	T-TestT_1T_2
human M2-type pyruvate kinase	Metabolismus	0,1987	1,20041667	0,01593605
Protein phosphatase 2A, regulatory subunit B	Metabolismus	0,4342	1,34241667	0,01662616
EST01587 Homo sapiens cDNA clone HHCMD25 similar to Pyruvate kinase isozyme M2 (95%)	Metabolismus	0,2527	1,44666667	0,03418968
XUD38	Sonstige	0,2442	1,112	0,03492309
Hu mRNA for eukaryotic initiation factor 4AII (98%)	Sonstige	2,0338	4,5005	0,04634654
Hu cytokeratin 8 mRNA (98%)	Zytoskelett	0,2326	0,73575	0,04675982

Tabelle 4: Vergleich von T_2 mit T_3

In der folgenden Tabelle sind die differentiell exprimierten Gene mit deren Funktionen, Mittelwerten und den dazu gehörigen T-Testwerten angegeben.

Gene Description	Funktion	MittelwertT_2	MittelwertT_3	T-TestT_2T_3
matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	ECM	0,622	5,57060294	0,00669569
a disintegrin and metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)	ECM	0,37420508	0,88561765	0,01684748
cathepsin G	ECM	0,70691667	2,22955882	0,01887282

cadherin -11	ECM	0,70616667	2,50507353	0,04315551
delta1-Catenin	ECM	0,88691667	1,90586765	0,02099322
MIP-2 alpha (=gro, Macrophage inflammatory protein-2-alpha precursor)	Entzündung	0,81708333	3,18139706	0,02661847
Inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	Metabolismus	0,34191667	1,58366176	0,00069986
protease, serine, 4 (trypsin 4, brain)	Metabolismus	0,51466667	2,23054412	0,01354926
INSIG1 (Homo sapiens insulin induced protein 1)	Metabolismus	0,32425	0,77664706	0,01405843
adrenergic, beta, receptor kinase 1	Metabolismus	0,6455	1,61336765	0,02131322
phosphatidic acid phosphatase type 2A	Metabolismus	1,65466667	0,80819118	0,02134249
protein kinase C, delta	Metabolismus	0,24225	0,65780882	0,02147019
EST, Highly similar to serine phosphataseFCP1a [H.sapiens]	Metabolismus	0,3095	1,26426471	0,02279815
ephrin receptor EphB3	Metabolismus	0,743	1,591	0,02750797
Fructose-bisphosphatase 1	Metabolismus	0,24041667	0,76970128	0,04050927
TF Clone 535/65	Proliferation	2,33625	6,54986765	0,00196386
T7:Human ZFP-36 mRNA for a zinc finger protein Length = 1749 / SP6: none	Proliferation	0,58108333	3,18686765	0,0024272
TF Clone 535/90	Proliferation	0,75666667	2,61125	0,00443538
tapasin (NGS-17)	Proliferation	0,73666667	2,02895588	0,00642517
Endothelial differentiation, G-protein-coupled	Proliferation	34,6866667	98,0913971	0,00696884
Chemokine (C-C motif) receptor 2	Proliferation	0,11891667	0,94933824	0,00712798
mus HOX 2.6	Proliferation	10,3694167	33,5098824	0,00891389
TF Clone 343/10	Proliferation	0,92616667	4,09213235	0,00999957
serum/glucocorticoid regulated kinase	Proliferation	0,45566667	1,06847059	0,01335187
extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5); BMK1 kinase	Proliferation	0,544	1,18613235	0,01449292
CDC10 protein homolog	Proliferation	0,0315	0,73033824	0,01472214
GAPDH	Proliferation	15,4323333	5,79577941	0,01737839
Secretin receptor	Sonstige	0,328	1,35123529	0,00221658
coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	Sonstige	0,60725	2,06080882	0,00425301
hu mutant cerebroside sulfate activator protein	Sonstige	3,80358333	10,6143676	0,00509041
elastase 2, neutrophil	Sonstige	6,89575	43,5483235	0,00544566
elastase 3, pancreatic (protease E)	Sonstige	6,73908333	30,4133189	0,00592983
Adenosine A1 receptor	Sonstige	0,06525	0,51986765	0,00617051
G protein-coupled receptor 39	Sonstige	0,21541667	0,97802941	0,01100823
hu integral nuclear envelope inner membran prot.	Sonstige	1,29658333	2,65516176	0,01661278
hu Mac-2 binding prot	Sonstige	0,53375	1,11439706	0,01895643
junction plakoglobin (JUP); desmoplakin III (DP3)	Sonstige	0,87925	1,88688235	0,01897356
Secretin receptor	Sonstige	0,11891667	0,54192647	0,01897466
UbcH2 (Ubiquitinating Enzyme)	Sonstige	0,29066667	0,96895588	0,02497923
ETS-2	Sonstige	0,49758333	1,487	0,02652832
A20 (TNFalpha inducible, PUTATIVE DNA BINDING PROTEIN)	Sonstige	0,17608333	1,15619118	0,03290936
Cannabinoid receptor 1 (brain)	Sonstige	0,03108333	0,53594118	0,04194863
Homo sapiens HSPC017 mRNA	Sonstige	0,29116667	0,59132353	0,04915324

Tabelle 5: Vergleich von T_3 mit T_4

In der folgenden Tabelle sind die differentiell exprimierten Gene mit deren Funktionen, Mittelwerten und den dazu gehörigen T-Testwerten angegeben.

Gene Description	Funktion	MittelwertT_3	MittelwertT_4	T-TestT_3T_4
Human protein phosphatase 2A regulatoryisoform	Metabolismus	0,968	0,35295	0,03160241
Cytochrome B561 (vesicle specific)	Metabolismus	1,12820588	2,41405	0,03271374
HMGCAR (3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL-COENZYME A REDUCTASE)	Metabolismus	0,70019118	0,11015	0,04151348
TF Clone 535/65	Proliferation	6,54986765	2,8056	0,00797808
rac2	Proliferation	0,65826471	0,30975	0,01837751
ATF-4 = CREB-2 = TAXREB67	Proliferation	2,24858824	5,27585	0,02743484
TF Clone 535/72	Proliferation	7,91527941	3,3668	0,02842535
TF Clone 343/10	Proliferation	4,09213235	1,2178	0,04197495
CDC10 protein homolog	Proliferation	0,73033824	0,16195	0,04898673
xs474	Sonstige	3,58341176	7,23725	0,03699652
Endothelial differentiation, G-protein-coupled	Sonstige	98,0913971	36,4451	0,0370411
serine (or cysteine) proteinase inhibitor A1	Sonstige	1,70607353	0,6841	0,03961138
coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	Sonstige	2,06080882	0,82545	0,04668814
alpha-tubulin (hu)	Zytoskelett	4,14805882	9,121	0,04314864

Tabelle 6: Vergleich von T_1 mit T_4

In der folgenden Tabelle sind die differentiell exprimierten Gene mit deren Funktionen, Mittelwerten und den dazu gehörigen T-Testwerten angegeben.

Gene Description	Funktion	MittelwertT_1	MittelwertT_4	T-TestT_1T_4
Homo sapiens claudin 7 (CLDN7)	Adhäsionsmolekül	0,5332	1,1583	0,02330739
xs474=TIMP2	ECM	1,8653	7,23725	0,00828689
cathepsin W (lymphopain)	ECM	0,4966	1,5788	0,00714366
hexabrachion = tenascin	ECM	0,2072	0,56655	0,04229279
furin	ECM	0,1915	0,5926	0,04454706
beta2 integrin	ECM	1,163	2,7575	0,01996633
cathepsinL	ECM	1,4721	4,6928	0,03159484
MyosinII	ECM	0,826	2,0588	0,03291141
Prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)	Entzündung	0,2038	0,55545	0,02955166
cytokine-inducible kinase	Entzündung	0,2401	0,68645	0,03988533
EST (95%) = xs25 (hu M2-type pyruvate kinase)	Metabolismus	0,1987	1,21315	0,01039928
EST (97%) =xs025(hu M2-type pyruvate kinase)	Metabolismus	0,3371	1,06675	0,01042374
EST (98%) =xs025 (hu M2-type pyruvate kinase)	Metabolismus	0,1778	0,88195	0,01188122
M2-type pyruvat-kinase	Metabolismus	0,3597	0,8618	0,01545782

Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	Metabolismus	0,3038	0,9392	0,02011357
EST01587 Homo sapiens cDNA clone HHCMD25 similar to Pyruvate kinase isozyme M2 (95%)	Metabolismus	0,2527	0,83335	0,0204691
ESTs, Weakly similar to protein phosphatase2C gamma	Metabolismus	0,3435	0,7851	0,02069105
activin A receptor type II-like 1	Metabolismus	0,1798	0,67105	0,0330591
serine/threonine kinase, nuclear Dfnb2-related (Drosophila) homolog	Metabolismus	1,1622	4,4903	0,03416594
Fas-activated serine/threonine kinase	Metabolismus	0,2461	0,8523	0,03567157
PYRUVATE KINASE, M1 (HUMAN) (99%)	Metabolismus	0,2926	1,37905	0,03999407
CCRK	Metabolismus	0,1233	0,61835	0,04473464
protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), beta isoform	Metabolismus	0,2084	0,9908	0,04475489
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, c	Metabolismus	0,4047	1,18625	0,04531294
Homo sapiens pyruvate kinase, muscle (PKM2)	Metabolismus	0,24025296	0,59425	0,04583384
Human mitochondrion, complete genome	Organelle	15,1484	37,45165	0,01519301
CDC-like kinase 2 (CLK2)	Proliferation	0,2623	0,7724	0,00876433
inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	Proliferation	0,3265	1,03105	0,00879995
glycogen synthase kinase 3 alpha (GSK3 alpha)	Proliferation	0,189	0,7641	0,00900331
G1/S-specific cyclin D3 (CCND3)	Proliferation	0,3364	0,85005	0,01152138
CDC42 GTPase-activating protein	Proliferation	0,912	3,1557	0,01218849
DP-1 (transcription factor)	Proliferation	0,1899	0,5097	0,01600484
cyclin D3 (700 bp subclone)	Proliferation	0,2712	0,57525	0,01609488
Homo sapiens general transcription factor 2-I (GTF2I)	Proliferation	1,0285	2,25395	0,01836094
G1/S-specific cyclin D1 (CCND1); cyclin PRAD1; bcl-1 oncogene	Proliferation	1,6271	8,28955	0,01890279
HHR23A; UV excision repair protein protein RAD23A	Proliferation	0,27	0,74005	0,02458122
TF Clone 535/30	Proliferation	0,2202	0,6352	0,03173517
TF Clone 535/09	Proliferation	0,1374	0,51735	0,03932506
TF Clone 535/48	Proliferation	0,8917	3,53525	0,04902619
JK-recombination signal.protein (hu)	Signalprotein	0,3425	0,9584	0,00332663
XUD35	Sonstige	0,3758	1,3833	0,00613308
Alu	Sonstige	0,1503	0,56485	0,00833537
IEX-1 (=DIF-2)	Sonstige	17,9043	39,65955	0,01373611
pbx2 = G17 (= RAGE?)	Sonstige	0,2739	0,8075	0,01438039
Dopamine receptor D5	Sonstige	1,3096	3,2431	0,01710621
EST AA053251	Sonstige	1,6766	5,40915	0,02073179
hu TCB gene encoding cytosolic thyroid hormone-binding protein (97%)	Sonstige	0,2365	1,3646	0,02589278
xs222	Sonstige	2,3786	5,2188	0,02646956
hypothetical protein from BCRA2 region (CG005)	Sonstige	0,2075	0,65175	0,03161709
ALU-F	Sonstige	0,2963	0,9886	0,03212845
EST R12563 (=d-6 fatty acid desaturase)	Sonstige	0,1745	0,86345	0,03298989
similar to gb:D13748 EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4A-I (HUMAN) (98%)	Sonstige	1,3338	2,7417	0,03448829

HSP89b	Sonstige	1,3078	3,30905	0,03555594
xs438	Sonstige	0,43571202	1,0905	0,03581148
hu mRNA for EF-1-gamma (99%)	Sonstige	1,2068	2,52815	0,03682185
IFI-16 (= IFNGIP1?)	Sonstige	0,3251	0,73565	0,03701683
XUD38	Sonstige	0,2442	0,8291	0,03960268
Hu neuroleukin	Sonstige	0,4644	1,24305	0,04031343
hu Miller-Dieker lissencephaly protein (LIS1)	Sonstige	0,2378	0,52725	0,04298879
similar to NM_010221.1 Mus musculus FK506 binding protein 6 (65 kDa) (Fkbp6)	Sonstige	0,12027127	0,7653	0,04359798
hu mutant cerebroside sulfate activator protein	Sonstige	5,1945	14,3945	0,04459706
Homo sapiens actin, gamma 1 (ACTG1)	Zytoskelett	6,9374	23,08345	0,00132362
alpha-tubulin (hu)	Zytoskelett	1,6078	9,121	0,00592454
alpha-tubulin (hu)	Zytoskelett	3,0886	6,79905	0,02295853
Hu cytokeratin 8 mRNA (98%)	Zytoskelett	0,2326	0,86585	0,02939301
Human non-muscle alpha-actinin mRNA	Zytoskelett	0,2626	0,63225	0,03943348
Vimentin	Zytoskelett	1,4051	3,32215	0,04730506

Tabelle 7: Vergleich von N_0 mit N_1

In der folgenden Tabelle sind die differentiell exprimierten Gene mit deren Funktionen, Mittelwerten und den dazu gehörigen T-Testwerten angegeben.

Gene Description	Funktion	MittelwertN_0	MittelwertN_1	T-TestN_0N_1
TIMP-3	ECM	3,49126087	8,47229032	0,0031972
E-cadherin	ECM	4,97123913	11,0811935	0,005481
plasminogen activator, urokinase	ECM	0,4983913	1,01858065	0,01807227
cathepsinL	ECM	1,53713043	4,18416129	0,02175417
MT 1B (metallothionein I-B)	ECM	2,3893913	0,60146774	0,0267893
matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	ECM	0,29358696	0,88037097	0,02785537
MT1L (Metallothionein 1L)	ECM	4,44021739	2,06529032	0,04881756
beta2 integrin	ECM	1,52121739	3,47308065	0,00505424
Chemokine (C-X-C motif), receptor 4 (fusin)	Entzündung	1,36376087	3,08880645	0,04090751
T-cell spec tyrosine kinase	Entzündung	0,22758696	0,79130645	0,04118112
TGF-beta superfamily protein; Homo sapiens prepro placental TGF-beta gene; Human placental bone morphogenic protein PLAB mRNA	Entzündung	1,03219565	3,25277419	0,04725483
pre-B cell enhancing factor (PBEF	Entzündung	3,43802174	8,20674194	0,00045645
serine/threonine kinase, nuclear Dfnb2-related (Drosophila) homolog	Metabolismus	1,33776087	3,08516129	0,01274731
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, M	Metabolismus	0,74286957	1,67304839	0,00168006
Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor)formerly 2B), regulatory subunit B (19kD), alpha isoform (calcineurin B, type I)	Metabolismus	0,52336957	0,16382258	0,00593171
Acid phosphatase 5, tartrate resistant	Metabolismus	1,00215217	2,63735484	0,04394779
HOX2A = HOXB5 = HOX2.1 (= HU1 = HHO.C10?)	Proliferation	0,32854348	0,73927419	0,00688426

survival of motor neuron 1, telomeric	Proliferation	1,1726087	2,52603226	0,0077971
CDC-like kinase 2	Proliferation	0,2448913	0,54935484	0,01743766
p21-activated kinase alpha (PAK-alpha; PAK1)	Proliferation	0,27273913	0,59143548	0,03493678
cyclin I	Proliferation	4,43045652	8,99151613	0,04160647
Endothelin receptor type A	Sonstige	1,17104348	2,51774194	0,0021365
Hu SREBP-1	Sonstige	1,06915217	2,21827419	0,00409353
hu brain glycogen phosphorylase	Sonstige	0,2701087	0,74662903	0,01280695
EST R12563 (=d-6 fatty acid desaturase)	Sonstige	0,23919565	0,53941935	0,02233864
Alu	Sonstige	0,24586957	0,86377419	0,03851346

Tabelle 8: Vergleich von M_0 mit M_1

In der folgenden Tabelle sind die differentiell exprimierten Gene mit deren Funktionen, Mittelwerten und den dazu gehörigen T-Testwerten angegeben.

Gene Description	Funktion	MittelwertM_0	MittelwertM_1	T-TestM_0M_1
matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	ECM	0,7060875	0,23911111	0,0252058
matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	ECM	5,88835	0,651	0,00186445
beta2 integrin	ECM	2,9510875	1,42033333	0,01006353
thrombospondin-1	ECM	2,2280375	1,02238889	0,01973961
thrombospondin-4	ECM	1,4444875	0,58305556	0,00144378
Homo sapiens lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LY6E) = retinoic acid induced RIG-E precursor (E)	Entzündung	0,254025	0,609	0,04260731
IL-8 (Interleukin 8)	Entzündung	2,5607375	0,98866667	0,00623781
MIP-2 alpha (=gro, Macrophage inflammatory protein-2-alpha precursor)	Entzündung	2,9469875	0,77455556	0,01617326
STAT6 (= IL-4 STAT?)	Entzündung	0,581225	1,16266667	0,02930448
protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2	Metabolismus	10,163925	4,90966667	0,00037934
alkaline phosphatase, intestinal [	Metabolismus	2,1772375	0,64472222	0,04336711
EST, Highly similar to serine phosphataseFCP1a [H.sapiens]	Metabolismus	1,28715	0,30755556	0,00793426
EST01587 Homo sapiens cDNA clone HHCMD25 similar to Pyruvate kinase isozyme M2 (95%)	Metabolismus	0,6915625	1,44733333	0,02583127
Inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	Metabolismus	1,5619625	0,64127778	0,02626292
INSIG1 (Homo sapiens insulin induced protein 1)	Metabolismus	0,7923	0,36322222	0,01968068
Protein tyrosine phosphatase receptor M	Metabolismus	1,4787375	0,63438889	0,00120204
CDC10 protein homolog	Proliferation	0,632875	0,064	0,01944972
cyclin D2	Proliferation	3,7129875	1,54394444	0,00038935
extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5); BMK1 kinase	Proliferation	1,2511625	0,55555556	0,00690676
G1/S-specific cyclin D2 (CCND2) + KIAK0002	Proliferation	6,887775	3,08144444	0,00045337
TF Clone 343/10	Proliferation	3,9166	0,6095	0,00192481
TF Clone 535/63	Proliferation	5,13745	2,51738889	0,02916857
TF Clone 603/04	Proliferation	2,24025	5,10277778	0,0439844
T7: MGXXX promoter sequences Length = 77 / SP6: Human chromosome	Proliferation	10,6592875	23,5246111	0,01833351

17q21 clone ET28. Length = 186				
CPBP (=Zf9, DNA-binding protein CPBP)	Sonstige	6,5426625	2,86911111	0,02161723
EST AA037718	Sonstige	1,5277375	0,56561111	0,00091544
DNA binding prot., CROC-1A	Sonstige	0,6099125	1,2935	0,01600574
elastase 2, neutrophil	Sonstige	55,8563	10,1938889	0,00712568
gb|AC091118.1|AC091118 Homo sapiens chromosome 16 clone CTC-510K1	Sonstige	7,0238125	3,33716667	0,0458334
hu beta adaptin	Sonstige	0,38944947	0,79477778	0,03895544
mus HOX 2.6	Sonstige	37,9117	9,76516667	0,01143993
Neurotensin receptor 1 (high affinity)	Sonstige	0,741825	0,072	0,00735913
T7: Human zinc finger gene HZF3 Length = 750 / SP6: Human HF.12 gene mRNA Length = 1801	Sonstige	21,512825	2,30422222	0,03506321
T7:Human ZFP-36 mRNA for a zinc finger protein Length = 1749 / SP6: none	Sonstige	3,2053875	1,07561111	0,01553629
TG repeat	Sonstige	2,62700379	1,10111111	0,00891204
xs209	Sonstige	2,96895	1,28716667	0,00377617
xs476	Sonstige	0,554975	0,24066667	0,03164403
XUD74	Sonstige	4,315875	8,81805556	0,0005428
ZO-1	Sonstige	0,762475	0,37311111	0,02397776
Lipocortin 2	Zytoskelett	19,4280375	49,3840556	0,03209194
lipocortin II (hu) = AnnexinII	Zytoskelett	5,313125	11,5771111	0,01353602
a-tubulin 2	Zytoskelett	10,375575	26,6195556	0,0242073
alpha-tubulin (hu)	Zytoskelett	4,6189875	10,7948333	0,02769655
a-tubulin 2	Zytoskelett	7,4651875	25,843	0,01996719

Tabelle 9: Vergleich von S_1 mit S_2

In der folgenden Tabelle sind die differentiell exprimierten Gene mit deren Funktionen, Mittelwerten und den dazu gehörigen T-Testwerten angegeben.

Gene Description	Funktion	MittelwertS_1	MittelwertS_2	T-TestS_1S_2
matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	ECM	0,2105	0,85901563	0,01285532
beta2 integrin	ECM	0,9774375	3,23042188	0,00066758
thrombospondin-4	ECM	0,67275	1,53710938	0,0207831
MIP-2 alpha (=gro, Macrophage inflammatory protein-2-alpha precursor)	Entzündung	0,8298125	3,352375	0,02802965
Chemokine (C-C motif) receptor 6	Entzündung	0,2163125	0,99498438	0,04276193
Acid phosphatase 2, lysosomal	Metabolismus	0,6688125	1,98339063	0,0002086
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, c	Metabolismus	0,31925	1,639	0,0025201
c-jun N-terminal kinase 1 (JNK1); JNK46	Metabolismus	0,0124375	3,05723438	0,00412163
hu brain glycogen phosphorylase	Metabolismus	0,198875	0,60153125	0,00837785
Secretin receptor	Metabolismus	0,461	1,15982813	0,01084381
ESTs, Highly similar to protein tyrosinephosphatase TD14 [R.norvegicus]	Metabolismus	0,2639375	0,5434375	0,01203543
adrenergic, beta, receptor kinase 1	Metabolismus	0,4914375	1,50454688	0,01677543
protein kinase C, delta	Metabolismus	0,2270625	0,64915625	0,02518723

ESTs, Moderately similar to myosinphosphatase targeting/regulatory subunit	Metabolismus	0,258875	1,17010938	0,02779474
G protein-coupled receptor 39	Metabolismus	0,2715	0,96967188	0,03477477
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	Metabolismus	0,399375	0,99528125	0,04478588
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, M	Metabolismus	0,7360625	1,4851875	0,04975223
TF Clone 343/10	Proliferation	1,148375	4,32617188	0,02455662
CDC10 protein homolog	Proliferation	0,0825	0,7654375	0,02496595
HSP89b	Sonstige	1,2261875	2,788625	0,01428222
ETS-2	Sonstige	0,5128125	1,56826563	0,02734498
ephrin receptor EphB3	Sonstige	0,7235	1,58429688	0,0307168
Homo sapiens HSPC017 mRNA	Sonstige	0,281625	0,67890625	0,03245385
Alu	Sonstige	0,2283125	0,81526563	0,04887577

Tabelle 10: Vergleich von S_2 mit S_3

In der folgenden Tabelle sind die differentiell exprimierten Gene mit deren Funktionen, Mittelwerten und den dazu gehörigen T-Testwerten angegeben.

Gene Description	Funktion	MittelwertS_2	MittelwertS_3	T-TestS_2S_3
HMGCAR (3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL-COENZYME A REDUCTASE)	Metabolismus	0,73889063	0,102	0,03838581
Human protein phosphatase 2A regulatory isoform	Metabolismus	1,02839063	0,35871429	0,03874894
c-jun N-terminal kinase 1 (JNK1); JNK46	Sonstige	3,05723438	0,30685714	0,01084639
cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1)	Sonstige	0,90925	0,37957143	0,01183307
HS1	Sonstige	0,73296875	0,05878571	0,04244108
MCL-1	Sonstige	0,8274375	0,2675	0,04506716

Tabelle 11: Vergleich von S_3 mit S_4

In der folgenden Tabelle sind die differentiell exprimierten Gene mit deren Funktionen, Mittelwerten und den dazu gehörigen T-Testwerten angegeben.

Gene Description	Funktion	MittelwertS_3	MittelwertS_4	T-TestS_3S_4
a disintegrin and metalloproteinase domain 15 (metargidin)	ECM	0,12994028	0,5188125	0,00619759
XS 2 H04	Entzündung	0,15685714	0,632	0,02257303
Protein phosphatase 2A, regulatory subunit B	Metabolismus	0,63128571	1,3085625	0,01816078
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, M	Metabolismus	1,5955	0,6488125	0,03893167
tyrosine kinase 2	Metabolismus	0,2475	0,510125	0,04260233
Homo sapiens pyruvate kinase, muscle (PKM2)	Metabolismus	0,40835714	1,11325	0,04550348

Protein tyrosine phosphatase J	Metabolismus	0,65085714	1,709625	0,04704761
mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase	Proliferation	0,23485714	0,5720625	0,04129332
Parathyroid hormone receptor 2	Sonstige	1,01542857	2,248875	0,02220889
calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	Sonstige	0,27128571	0,7176875	0,02382212
EST AA037718	Sonstige	2,09864286	0,5851875	0,04704502
hu mRNA for ORF	Sonstige	1,61585714	0,777625	0,04986253
a-tubulin 2	Zytoskelett	6,358	23,3014375	0,03695191

Tabelle 12: Vergleich von S_1 mit S_4

In der folgenden Tabelle sind die differentiell exprimierten Gene mit deren Funktionen, Mittelwerten und den dazu gehörigen T-Testwerten angegeben.

Gene Description	Funktion	MittelwertS_1	MittelwertS_4	T-TestS_1S_4
Homo sapiens lymphocyte antigen 6 complex, locus E (LY6E) = retinoic acid induced RIG-E precursor (E)	Entzündung	0,1920625	0,632	0,03206477
Acid phosphatese 2, lysosomal	Metabolismus	0,6688125	1,6375625	0,00331933
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	Metabolismus	0,399375	1,22275	0,01858334
Protein tyrosine phosphatase J	Metabolismus	0,543875	1,709625	0,02639599
cyclin D2	Proliferation	3,4485625	1,2378125	0,012855
cyclin D3 (700 bp subclone)	Proliferation	0,334	0,7905625	0,01876088
G1/S-specific cyclin D3 (CCND3)	Proliferation	0,401625	1,015875	0,01698581
mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase	Proliferation	0,1701875	0,5720625	0,01831367
TF Clone 535/09	Proliferation	0,18675	0,5625625	0,03455654
hu mRNA for EF-1-gamma (99%)	Sonstige	1,254375	2,623375	0,02131494
calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	Sonstige	0,255125	0,7176875	0,02187927

8 Danksagung

Herrn Prof. Adler danke ich für die Möglichkeit, eine Dissertation in der Abteilung Innere Medizin I zu verfassen.

Ich danke Herrn Prof. Gress für die Überlassung des Themas und die gute Unterstützung.

Mein Dank gilt vor allem Herrn Dr. Buchholz für die gute Betreuung, die konstruktive Kritik und für die vielen wertvollen Anregungen.

Herrn Dr. Kestler danke ich für die Unterstützung bei der statistischen und bioinformatischen Auswertung.

Ich danke den Mitarbeitern der AG Gress, insbesondere Frau Claudia Ruhland, Frau Anita Buck und Frau Susanne Braun für die gute Zusammenarbeit und den wertvollen Gedankenaustausch.

Mein Dank gilt ebenfalls meinen Eltern für die vielen ermutigenden Worte und für jegliche Unterstützung dieser Arbeit und des Medizinstudiums überhaupt.

Meinem lieben Mann danke ich für die wertvolle Kritik bezüglich der Statistik und des Layouts und für die vielen ermutigenden Worte.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Freunden, Kommilitonen und Familienmitgliedern, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben

.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Menjon Cordula

geboren am	17.03.1980 in Bremen
Eltern	Vater : Dr. Klaus Reimann, Diplomphysiker Mutter: Marlis Reimann, Realschullehrerin
Wohnort	Keferloherstraße 53, 80809 München
Familienstand	verheiratet
Ehemann	Valéry Menjon, Diplomingenieur

Ausbildung

09/1990 - 06/1999	Gymnasium in Stockach am Bodensee
10/1999 - 04/2005	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
08/2001	ärztliche Vorprüfung an der Universität Ulm
08/2002	erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Ulm
02/2003	Beginn der Dissertation an der Uniklinik Ulm
04/2005	zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Ulm
05/2005 - 03/2006	Praktisches Jahr, eingeschrieben an der Ludwig-Maximilians-Universität München
	1. Tertial: Innere Medizin im Krankenhaus München Schwabing: Hämatologie, Onkologie
	2. Tertial: Chirurgie im Krankenhaus München Schwabing
	3. Tertial: Dermatologie in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie München Thalkirchnerstraße

klinische Tätigkeiten und Praktika

02/2000 - 04/2000	Pflegepraktikum in der chirurgisch-orthopädischen Klinik Dr. Bertele in Ulm
09/2000	Praktikum im Krankenhaus „Plein Evangile“ in Yaoundé, Kamerun mit Schwerpunkt Tropenmedizin, sexuell übertragbare Krankheiten, Parasitologie
02/2002	Famulatur Innere Medizin, Hämatologie mit Schwerpunkt Onkologie, Universitätsklinik Ulm
03/2002	Famulatur HNO, Dr. Stussak, niedergelassener HNO-Arzt
02/2003	Famulatur beim Gesundheitsamt Ulm
03/2003	Famulatur Anästhesiologie, Universitätsklinik Ulm
05/2003 - 07/2003	Ultraschallseminar- und Praktikum, Universitätsklinik Ulm
10/2003 - 02/2004	EKG-Kurs, Universitätsklinik Ulm
02/2004 - 03/2004	Famulatur Psychiatrie, Uniklinik Ulm Prof. Dr. Spitzer
05/2004 - 07/2004	Teilnahme an Praktika in der Neurochirurgie in Günzburg sowie in der Herzchirurgie, Uniklinik Ulm Prof. Dr. Hannekum

Kenntnisse und Interessen

Sprachen	Deutsch:	Muttersprache
	Englisch:	verhandlungssicher
	Französisch:	verhandlungssicher
	Spanisch:	weitgehende Kenntnisse
	Italienisch:	weitgehende Kenntnisse
	Latinum	