

*Aus der Klinik für Allgemein- und Unfallchirurgie
der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
(Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H.-D. Röher)*

Microarrayuntersuchungen bei Phäochromozytomen

Ein neuer Versuchsansatz zur differenzierenden
Dignitätsbeurteilung

Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Chirurgie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. med. Kenko Cupisti

Düsseldorf, im März 2003

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	4
1) Ziel des Projektes	4
2) Phäochromozytome	5
3) Bedeutung der Microarray-Technologie	17
4) Vorausgegangene Arbeiten zur Microarray-Technologie	19
5) Fragestellungen	26
Material und Methoden	28
1) Patienten	28
2) Vergleichsstandard	30
3) Aufklärung und Ethik	35
4) Herkunft der in Uppsala verwendeten Arrays	35
5) Lagerung des Gewebes	36
6) Gewinnung und Qualitätskontrolle der RNA	36
7) Synthese und Qualitätskontrolle der markierten cDNA	38
8) Array-Hybridisierung	40
9) Stringentes Waschen und TSA-Detektion	42
10) Scannen der Arrays und Anpassen eines Gitternetzes	43
11) Normalisierung und Datenverarbeitung	48
12) Suche nach Kandidatengen und hierarchisches Clustern	52
13) RT-PCR zur Bestätigung der Arrayergebnisse	52
Ergebnisse	53
1) Hierarchisches Clustern	53
2) Suche nach signifikanten Genen	55
3) RT-PCR	74
Diskussion	78
1) Darstellung und Begründung der Patientenauswahl	78
2) Begründung der Methode	80

3)	Arrayuntersuchungen bei neuroendokrinen Tumoren	87
4)	Analyse der differentiell exprimierten Gene	88
5)	Stathmin	91
6)	Diskussion weiterer interessanter Gene	93
7)	Bewertung der eigenen Ergebnisse	95
8)	Ausblick	96
Literatur		98
Danksagung		110

Einleitung

1) Ziel des Projektes

Die richtige Einschätzung des malignen Potentials und des biologischen Verhaltens eines Tumors ist der Schlüssel für Anwendung und Ausdehnung einer operativen oder nicht-operativen Therapie, einer Zusatzbehandlung und einer rationalen Nachsorge. Während bei den meisten soliden Tumoren, d.h. Karzinomen und Sarkomen, zumindest über die grundsätzliche Malignität kein Zweifel besteht, nehmen die neuroendokrinen Tumoren eine Sonderstellung ein. Schon in ihrer ursprünglichen im Jahre 1907 von dem Pathologen Oberndorfer [82] geprägten Bezeichnung *Karzinoid*, d.h. karzinom-ähnlich, kommt diese Unsicherheit und z.T. auch Hilflosigkeit zum Ausdruck. Sie besteht bis heute fort. Nach wie vor stehen Kliniker und Pathologen vor dem Problem, dass bei diesen Tumoren keine lichtmikroskopisch fassbaren histomorphologischen Kriterien definierbar sind, die eine eindeutige Zuordnung anhand des Primärpräparates ermöglichen und somit unterschiedliche Risikogruppen unterscheidbar machen. Aufwendige Scores, die sich aus mehreren Kriterien zusammensetzen [105] lösen dieses grundsätzliche Problem nicht.

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Untersuchungstechnik, die DNA-Microarray-Technologie, zur Lösung dieser Frage eingesetzt. Sie beruht nicht auf morphologischen Aspekten, sondern stellt die Genaktivität eines Tumors dar, die sich naturgemäß von der des entsprechenden Normalgewebes unterscheiden muss.

Untersucht werden Phäochromozytome, katecholaminproduzierende Tumoren des Nebennierenmarks, die aufgrund ihrer Häufigkeit und klinischen Manifestation zu den wichtigsten neuroendokrinen Tumoren überhaupt gehören.

Ziel der Arbeit ist eine Analyse der Genaktivität dieser Tumoren als Gesamtgruppe und möglicherweise die Identifizierung von Genen, die für die Eigenschaft der Malignität verantwortlich sind.

2) Phäochromozytome

Phäochromozytome sind Tumoren des Nebennierenmarks, die in der Regel durch ihre Hormonfreisetzung symptomatisch werden. Die intermittierende Ausschüttung von Katecholaminen führt zu krisenhaften Blutdruckanstiegen, Herzrasen und Kopfschmerzen. Bei der Abklärung der sekundären Hypertonie gehört das Phäochromozytom somit zu den wichtigsten Differentialdiagnosen. Während 90 Prozent aller Phäochromozytome histologisch gutartig und durch Operation heilbar sind, ist der Spontanverlauf eines unbehandelten Tumors fast immer tödlich.

„Histologically, they are usually benign; physiologically they are malignant (Apgar und Papper, 1951; Baumgarten und Cantor, 1940, in Manger&Gifford [74]).“

“Pheochromocytoma possesses the unique combination of being potentially lethal on the one hand, yet benign and eminently curable in about 90% of patients in the other (van Heerden [107]).“

Nomenklatur

Die Nomenklatur ist etwas überlappend und gelegentlich unpräzise [81]. Alle von den Paraganglien ausgehende Tumoren werden als Paragangliome bezeichnet. Diejenigen unter diesen Tumoren, die vom Nebennierenmark abstammen, das man als das größte Paraganglion auffassen kann, heißen Phäochromozytome. Somit sind die Phäochromozytome eine Untergruppe der Paragangliome, wenn auch zahlenmäßig die mit Abstand bedeutsamste. Die nicht vom Nebennierenmark abstammenden Paragangliome werden fälschlich auch als extraadrenale Phäochromozytome bezeichnet. Sie können, entsprechend der anatomischen Lokalisation der sympathischen Ganglien, überall zwischen Schädelbasis und Harnblase vorkommen. Hormonell inaktive Paragangliome werden als Glomustumoren bezeichnet. Eine ältere Bezeichnung für ein nicht-chromaffines Paragangliom lautet Chemodektom. Maligne Phäochromozytome werden auch als Phäochromoblastome bezeichnet.

Historie

Die Erstbeschreibung eines Phäochromocytoms erfolgte durch 1886 Frankel [40] anhand eines Autopsiebefundes. Die charakteristische Braunfärbbarkeit dieser Tumoren mit Chromsalzen, die später zur Namensgebung führte, wurde von

Manasse 1896 [73] entdeckt. 1908 wurde der Begriff *Paragangliom* zur Bezeichnung chromaffiner extraadrenaler Tumoren aus den Paraganglien durch Alezais und Peyron [3] geprägt. 1912 erfolgte die Begriffseinführung *Phäochromozytom* durch Pick [86], abgeleitet von den chemischen und histologischen Eigenschaften der Tumorzellen: φαίός dämmerig, dunkel; χρώμα Farbe [65]; *cytoma* Tumor, d.h. ein Tumor dessen Zellen nach Exposition mit Chromsalzen eine dunkle (bräunliche) Farbe annimmt. 1922 wurde erstmalig die typische Symptomatik eines Phäochromozytoms als Auslöser paroxysmaler Tachykardien durch L'Abbé bei einer 28jährigen Patientin [64] beschrieben. Die ersten erfolgreichen Operationen bei Phäochromozytomen wurden 1926 von Roux in der Schweiz und 1927 von C.H. Mayo an der Mayo Klinik, USA, durchgeführt [74]. In einer Literaturübersicht aus dem Jahre 1951 berichtete Graham [45] über nur 125 Phäochromozytom-Operationen zu diesem Zeitpunkt, darunter 33 Todesfälle aufgrund intraoperativer hypertoner oder hypotoner Blutdruckentgleisung. Erst durch den Einsatz zweier neuer Pharmaka, *Phentolamin* gegen Hypertension und *Noradrenalin* gegen Hypotension, konnte in der Folge diese hohe perioperative Mortalität gesenkt werden. 1956 konnte Kvale [63] jedenfalls über die erfolgreiche Resektion von 61 Phäochromozytomen bei 51 Patienten ohne Todesfall berichten. Eine neue Ära der Nebennieren- und Phäochromozytomchirurgie leitete Gagner [42] 1992 mit dem Bericht über die erste laparoskopische Adrenalectomie ein. Eine ausführliche Schilderung der historischen Abläufe findet sich bei Manger&Gifford [74].

Epidemiologie

Die genaue Inzidenz des Phäochromozytoms ist unbekannt. Schätzungen gehen von 1-2 Fällen pro 1.000.000 Einwohner pro Jahr aus. Andererseits wird vermutet, dass 0,1 % der Bevölkerung mit diastolischer Hypertension ein Phäochromozytom hat. In einer Autopsieserie von über 40.000 konsekutiven Todesfällen in der Mayo-Klinik lag die Prävalenz des Phäochromozytoms bei 0,13 % [102].

Phäochromozytome treten in jedem Lebensalter auf, bevorzugt aber im 4. und 5. Lebensjahrzehnt. Paragangliome dagegen erscheinen häufiger im 2. und 3. Lebensjahrzehnt. Frauen scheinen geringfügig häufiger betroffen als Männer. Maligne Phäochromozytome (Phäochromoblastome) machen etwa 10 % aller Fälle aus.

Entwicklungsgeschichte

Die Zellen des Nebennierenmarks sind neuroektodermaler Herkunft. Sie entstammen pluripotenten Stammzellen der Neuralleiste, aus denen auch die extraadrenalen sympathischen Paraganglien und die sympathischen Ganglionzellen hervorgehen [52].

Symptome

Die Symptomatik des Phäochromozytoms ist vielfältig und umfasst klassischerweise anfallsweises Herzrasen, Schweißausbrüche und Kopfschmerzen bei 70 – 90 % der Patienten. Grundsätzlich sind aber alle Symptome möglich, die aus einem plötzlichen starken Blutdruckanstieg bis über 300 mmHG resultieren können, wie z.B. Sehstörungen, Übelkeit, Luftnot, Nervosität und Angstgefühle, aber auch Brust- und Bauchschmerzen, Arm-Parästhesien und Krampfanfälle. In vielen Fällen werden diese Symptome durch körperliche Anstrengung getriggert und dauern typischerweise 5 bis 10 Minuten an. Als Dauersymptome werden auch Bluthochdruck, Gewichtsverlust, Verstopfung und Wärmeintoleranz berichtet [74].

Diagnostik

Die letztendliche Diagnosesicherung eines Phäochromozytoms erfolgt histologisch. Die präoperative Diagnostik umfasst im Verdachtsfall die biochemische Sicherung durch Messung der Katecholamine und Vanillinmandelsäure im 24h-Sammel-Urin. Ebenfalls möglich, aber weniger aussagekräftig ist die Bestimmung von Adrenalin, Noradrenalin und Chromogranin A im Serum. Im Zweifelsfall sind auch in Gegenwart eines bildgebend dargestellten Nebennierentumors weitere Testverfahren, z.B. pharmakologische Provokationstests mit Glucagon, Histamin, Metoclopramid oder Naloxon indiziert. Auch ein Suppressionstest mit Clonidin ist möglich [69]. Ein biochemisches Testverfahren, das spezifisch für Malignität wäre, existiert nicht. Bildgebend sind Ultraschall, Computertomographie, Kernspintomographie und szintigraphische Verfahren (Metaiodobenzylguanidine {MIBG} und ¹⁸Fluoro-DOPA Ganzkörper PET [51]) geeignet, einen Tumor zu lokalisieren. Die letztgenannten sind auch besonders wertvoll bei der Diagnose einer metastasierten Erkrankung. Punktionsbiopsien sind aufgrund der möglichen Katecholaminfreisetzung nicht indiziert.

Therapie

Therapie der Wahl ist stets die chirurgische Resektion des Tumors. Um die Auswirkungen intraoperativ durch Manipulation am Tumor freigesetzter Katecholamine abzufangen ist eine präoperative Behandlung mit alpha-Rezeptorenblockern notwendig. In der eigenen Klinik wird hierzu typischerweise *Phenoxybenzamin* (z.B. Dibenzyran®) in steigender Dosierung beginnend mit 20 mg bis hin zu 100 mg pro Tag eingesetzt. Parallel dazu ist eine erhöhte Flüssigkeitsaufnahme erforderlich. Alternative Substanzen zur präoperativen alpha-Blockade sind Doxazosin (z.B. Diblocin®) oder Prazosin. Die Dauer der Vorbehandlung richtet sich nach der klinischen Symptomatik, wird aber 1 Woche kaum unterschreiten. Bei Auftreten von Arrhythmien oder Tachykardien können sequentiell (aber keinesfalls von Anfang an) beta-Rezeptorenblocker (z.B. Propranolol [Dociton®]) hinzugegeben werden.

Intraoperativ ist ein kontinuierliches Blutdruckmonitoring über einen arteriellen Zugang erforderlich. Der Anästhesist muss jederzeit in der Lage sein, plötzliche Blutdruckanstiege durch Infusion von Nitroprussidnatrium oder Adenosin abzufangen, oder im Gegenteil auch den Blutdruck nach Ligatur sämtlicher zu- und abführender Gefäße zu unterstützen.

Die Diskussion über den besten operativen Zugangsweg dauert an. In der Regel werden heute Tumoren kleiner als 6 cm laparoskopisch entfernt, bei größeren Tumoren ist ein offenes Vorgehen empfehlenswert. Hierbei sind transabdominelle Zugangswege über eine mediane Laparotomie, einen Subcostalschnitt oder, bei besonders großen Tumoren, auch über einen thorakoabdominellen Zugang möglich. Alternativ besteht, bei eher kleineren Tumoren, die Möglichkeit eines extraperitonealen Vorgehens von lateral oder dorsal, dabei meist mit Resektion der 12. Rippe.

In einer Reihe von Publikationen wird eine Korrelation zwischen Tumorgröße und Malignität aufgezeigt [43, 56, 62]. Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die diesen Zusammenhang nicht nachweisen können [37].

Im Falle eines malignen Phäochromozytoms sind neben einer paraaortalen Lymphknotendissektion auch wiederholte chirurgische Maßnahmen zur Verringerung der endokrin aktiven Gewebemasse empfehlenswert, ähnlich wie auch bei anderen neuroendokrinen Tumoren, wie z.B. dem C-Cell-Karzinom der Schilddrüse. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit malignem Phäochromozytom wird mit 20-

45% angegeben [11, 87, 107]. Zusätzliche Maßnahmen wie Lymphknotendissektionen, Chemo- und Strahlentherapie scheinen die Überlebenszeit deutlich zu verlängern (9 Jahre versus 3,7 Jahre in einer retrospektiven Studie an 100 Patienten von Thompson [105]). Prospektive Studien zu dieser Frage existieren nicht.

Typisch für das biologische Verhalten eines neuroendokrinen Tumors ist, dass das Auftreten von Metastasen gelegentlich erst Jahre nach Entfernung des Primärtumors beobachtet wird [37]. Somit sind auch Notwendigkeit und Ausmaß einer Nachsorge bei Patienten mit als benigne eingestuften Tumoren strittig.

Histologische Charakteristika und Schwierigkeiten bei der Dignitätsbeurteilung

Etwa 10% der Phäochromocytome und 15-35% der abdominalen Paragangliome sind maligne [37]. Der Metastasierungsweg ist sowohl lymphogen als auch hämatogen und betrifft Lymphknoten, Lunge, Leber, Knochen und andere Organe.

Es ist allgemein akzeptiert, dass das biologische Verhalten eines Phäochromozytoms aus dem makroskopischen und mikroskopischen Aspekt allein nicht abgeleitet werden kann [105]. Kernpleomorphismen, Mitosefiguren, Ausdehnung auf die Rinde, Nekrosen und immunzytochemische Charakteristika und selbst Kapseldurchbruch und Gefäßinvasion sind nicht geeignet, Sicherheit über die Dignität zu geben. Im strengen Sinne beweisend für Malignität ist nur der Nachweis von Tumorabsiedlungen in Lymphknoten oder Organen, die normalerweise keine chromaffinen Zellen enthalten. Nur so können auch multizentrische Phäochromozytome ohne Metastasierungstendenz abgegrenzt werden. Dieses Kriterium wird von der WHO in ihrer Klassifikation neuroendokriner Tumoren angewandt [99].

Eine breitangelegte retrospektive Studie zur Wertigkeit der Histologie bei der Dignitätsbeurteilung von Phäochromozytomen veröffentlichte Thompson 2002 [105]. Ziel der Studie war, einen Diagnosescore zu erarbeiten, der es ermöglichen sollte, benigne von malignen Phäochromozytomen aufgrund histomorphologischer Charakteristika zu unterscheiden. Eingeschlossen wurden 100 Phäochromozytome aus den Jahren 1970-1997. 50 dieser Tumoren waren ursprünglich als benigne diagnostiziert worden, die anderen 50 als maligne oder zumindest atypisch. Von diesen 50 letzteren hatten 33 Patienten im Verlauf dokumentierte Metastasen

entwickelt. Der von Thompson vorgeschlagene *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scoring Scale (PASS)* umfasst die folgenden Merkmale:

Large nests of diffuse growth (>10% of tumor volume)	2 Punkte
Central (middle or large nests) or confluent tumor necrosis (not degenerative change)	2 Punkte
High cellularity	2 Punkte
Cellular monotony	2 Punkte
Tumor cell spindling (even if focal)	2 Punkte
Mitotic figures >3/10 high-power field	2 Punkte
Atypical mitotic figure(s)	2 Punkte
Extension into adipose tissue	2 Punkte
Vascular invasion	1 Punkt
Capsular invasion	1 Punkt
Profound nuclear pleomorphism	1 Punkt
Nuclear hyperchromasia	1 Punkt

Insgesamt konnte jeder Tumor bis zu 20 Punkte erhalten. Alle Tumoren mit malignem Verlauf erhielten dabei mindestens 4 Punkte. Einschränkend muss bemerkt werden, dass in der untersuchten Gruppe nur insgesamt drei Tumoren mit mehr als 15 Punkten bewertet wurden. Von den zugehörigen Patienten verstarb einer nach 2,9 Jahren an einem disseminierten Tumorleiden, während die anderen beiden 3,0 und 27,8 Jahre nach Operation metastasenfrem am Leben sind. Thompson wies in seiner Arbeit speziell darauf hin, dass in seiner Untersuchung bemerkenswerter Weise weder die Tumorgöße noch das Tumorgewicht einen unabhängigen Prognosefaktor darstellte.

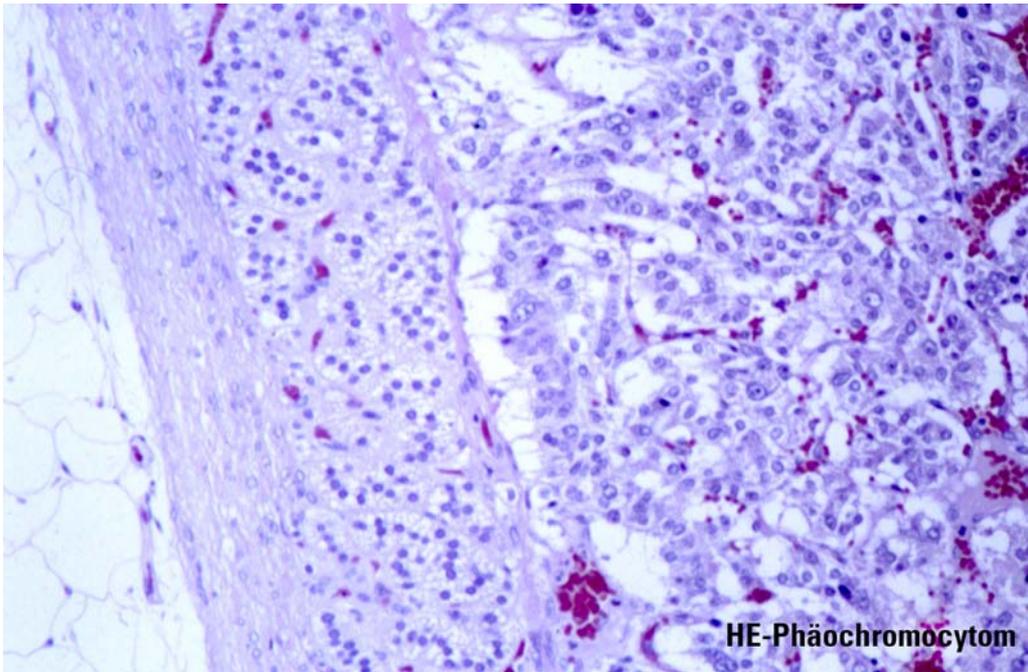


Abbildung1: gekapselter endokriner Tumor, leicht vaskularisiert mit mosaikartig angeordneten endokrinen Zellen. Links Kapsel und atrophische Reste des normalen Nebennierenrindengewebes.

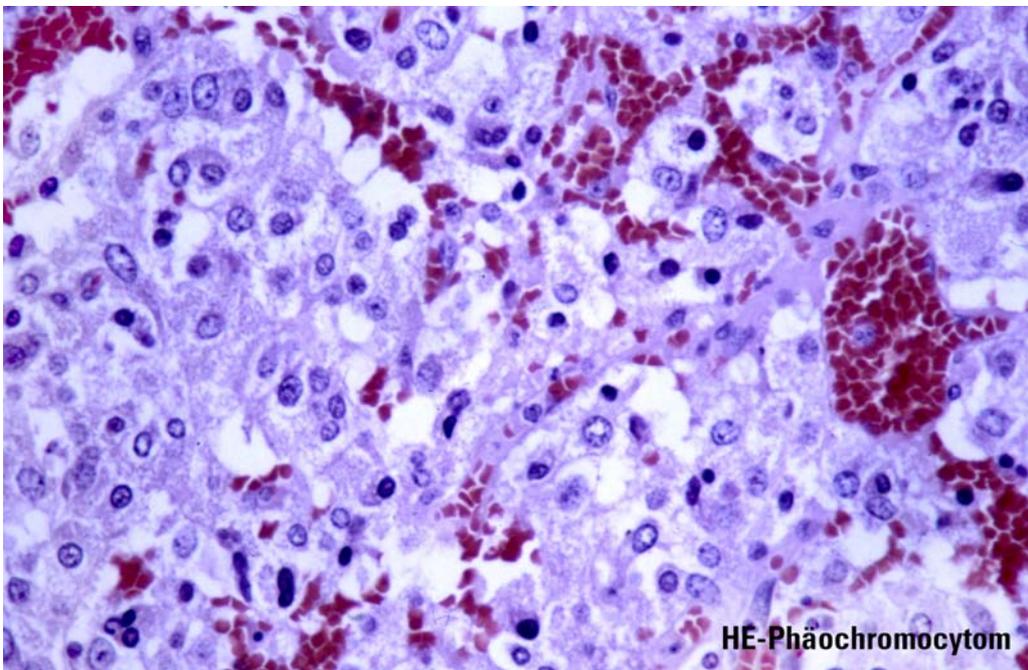


Abbildung 2: Vergrößerung aus 1: Anteile eines vaskularisierten endokrinen Tumors mit voluminösen kohäsiven Zellen mit leichten Kernunregelmäßigkeiten und granuliertem Zytoplasma.

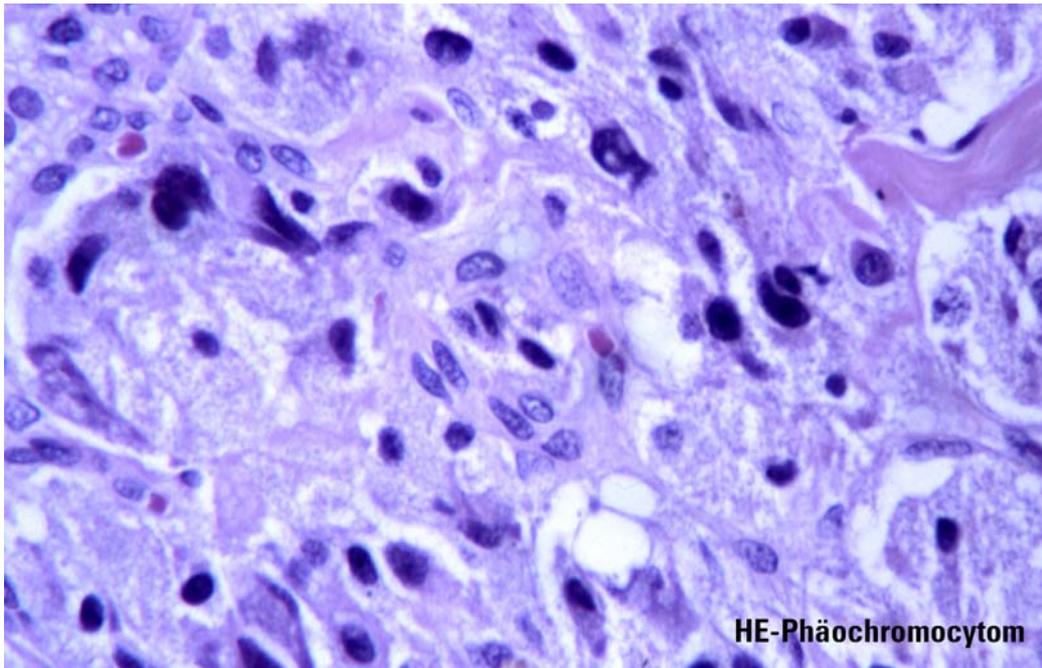


Abbildung 3: höhere Vergrößerung desselben Tumors hier mit Kernpolymorphien und Hyperchromasien.

Abbildungen 1-3: Pathohistologisches Präparat eines Phäochromozytoms (Leihgabe von Professor Dr. Lars Grimelius, Pathologisches Institut der Universität Uppsala. Deutsche Befundinterpretation durch Dr. Stefan Braunstein, Pathologisches Institut der Universität Düsseldorf)

Genetik und Tumorsyndrome

Phäochromozytome und Paragangliome treten sowohl sporadisch, als auch familiär gehäuft im Rahmen bestimmter Tumorsyndrome auf. Dabei handelt es sich um:

1. die **multiple endokrine Neoplasie Typ 2 (MEN 2)**. Sie wird verursacht durch aktivierende Mutationen im *RET*-Protoonkogen auf Chromosom **10q11.2** [77, 88]. Das Gen hat 21 Exons, wobei Mutationen hauptsächlich in den Exons 10, 11 und 13 auftreten. Je nach spezifischer Mutation unterscheidet man zwischen dem MEN 2A-Syndrom, das gekennzeichnet ist durch das syn- oder metachrone Auftreten eines C-Cell-Karzinoms der Schilddrüse (95%), eines uni- oder bilateralen Phäochromozytoms (50%) und eines primären

Hyperparathyreoidismus (20%); und dem MEN 2B-Syndrom. Bei diesem treten ein C-Cell-Karzinom der Schilddrüse, uni- oder bilaterale Phäochromozytome und ein marfanoider Habitus mit Neurinomen an Lippen, Zunge und Gastrointestinaltrakt auf.

2. das **von Hippel-Lindau-Syndrom (VHL)**. Es wird verursacht durch inaktivierende Mutationen im 1993 entdeckten *VHL*-Gen. Es ist lokalisiert auf Chromosom **3p25-26** und hat 3 Exons. [67, 92]. Das von Hippel-Lindau-Syndrom ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Phäochromozytomen bei 7-20% der Patienten in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Mutation, Retina-Angiomen, ZNS-Hämangioblastomen und klarzelligen Nierenzellkarzinomen, pankreatischen Inselzelltumoren endolymphatischen Tumoren und Zysten der Niere, des Pankreas und des Nebenhodens.
3. die **Neurofibromatose Typ 1 (NF1)** oder **Morbus Recklinghausen**, verursacht durch inaktivierende Mutationen im *NF1*-Gen auf Chromosom **17q11.2** [111]. Dieses Gen besteht aus 60 Exons und ist allein aus diesem Grund für routinemäßige Kompletsequenzierungen kaum geeignet. Das klinische Bild ist relativ typisch und geprägt durch das Vorhandensein multipler v.a. kutaner Neurofibrome. Weitere Veränderungen sind sogenannte *Café au lait spots* der Haut und sommersprossenartige axilläre oder inguinale *frecklings*, N.opticus-Gliome, Iris-Hamartome und Phäochromozytome.
4. das **familiäre Paragangliom-Syndrom**. Dieses relativ neu entdeckte Krankheitsbild wird verursacht durch Mutationen in den Genen Succinat-Dehydrogenase *subunit* D (SDHD) auf Chromosom **11q23** (4 Exons) oder Succinat-Dehydrogenase *subunit* B (SDHB) auf Chromosom **1p36** (8 Exons). SDHD und SDHB kodieren mitochondriale Enzyme, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind [9, 10, 12, 80, 83].

Bei allen vier o.g. Krankheitsbildern liegen Keimbahnmutationen vor, d.h. die krankheitsauslösende Mutation ist in jeder Körperzelle nachweisbar und das Phäochromozytom ist nur eine von mehreren möglichen Krankheitsmanifestationen.

Daneben gibt es weitere, noch seltenere Tumorsyndrome in deren Rahmen das Auftreten von Phäochromozytomen oder Paragangliomen beschrieben ist, dieses aber eher nicht zur typischen Manifestation gehört.

Dazu gehört das sehr seltene **Beckwith-Wiedemann-Syndrom**. Es tritt meistens sporadisch und in ca. 15 % der Fälle hereditär auf. Es wird in der Regel kurz nach der Geburt diagnostiziert. Typisch sind Hemihypertrophien einzelner Gliedmaßen und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung embryonaler Tumoren wie Nephroblastome, Hepatoblastome und Rhabdomyosarkome. An den Nebennieren sind neben Corticoadrenalomen auch zwei Fälle mit Phäochromozytomen in der Literatur beschrieben, in einem Fall maligne und im anderen Fall beidseitig [13]. Bei diesem Syndrom wurden cytogenetische Anomalien mit Chromosomenverlust in der Region **11p15.5** beschrieben (IGF2-Gen, H19, P57KIP2, QVLQT1, GOK).

Ein weiteres, ebenfalls sehr seltenes Krankheitsbild, bei dem Paragangliome auftreten können, ist der **Carney Komplex**. Er wurde 1977 von dem amerikanischen Pathologen J.A. Carney [22] beschrieben und beinhaltet Leiomyosarkome des Magens (heutige Bezeichnung: gastro-intestinaler Stroma-Tumor {GIST}), multiple pulmonale Chondrome mit „popcornartigen“ Verkalkungsstrukturen im Röntgenthoraxbild, abnormale Haut- und Schleimhautpigmentationen und abdominale Paragangliome. Publiziert sind derzeit etwa 60 Fälle. Die Erkrankung manifestiert sich im frühen Erwachsenenalter. Bei einem Großteil der untersuchten Familien werden inaktivierende Mutationen im PRKAR1A-Gen auf Chromosom **17q22-24** gefunden [101]. Es wird vermutet, dass die betroffenen Patienten auch eine allgemein herabgesetzte Resistenz gegen die Ausbildung von Tumoren aufweisen.

Demgegenüber ist der Anteil der **sporadischen** Phäochromozytome nach neueren Erkenntnissen geringer als bislang vermutet. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnten Neumann und Mitarbeiter [80] bei einer genetischen Analyse von 271 Patienten mit klinisch sporadischen Phäochromozytomen und/oder Paragangliomen (d.h. Patienten ohne klinischen oder anamnestischen Anhalt für Heredität, sogenannte nicht-syndromische Phäochromozytome/Paragangliome) bei 66 Patienten (24 %) Keimbahnmutationen in einem der Gene *RET*, *VHL*, *SDHB* oder *SDHD* feststellen.

Damit wird die weithin bekannte „10er-Regel“, die besagt, dass 10% aller Phäochromozytome extraadrenal lokalisiert sind und davon wiederum 10%

extraabdominal, 10% maligne, 10% bei Patienten ohne Hypertonus und 10 % genetisch bedingt, zumindest in Bezug auf den letzten Punkt ungültig [34]. Ein Beispiel dafür, dass die molekulare Analyse Erfahrungen, die aus der rein klinischen Beobachtung abgeleitet wurden, überschreiten und korrigieren kann. Tatsächlich liegt nach dieser Untersuchung bei gut einem Viertel aller Phäochromozytome eine vererbte Keimbahnmutation zugrunde. Diese ist in vielen Fällen offenbar als Neumutation anzusehen.

Zu den wichtigsten Untersuchungsprinzipien bei der Suche nach weiteren Genen, die für eine Tumorpropagation verantwortlich sind, gehören sogenannte LOH (*loss of heterozygosity*)-Studien. Der Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe eines Patienten deckt dabei im Tumorgewebe deletierte Chromosomenabschnitte auf, die, gemäß der *two-hit*-Hypothese von Knudson [60], Tumorsuppressorgene enthalten. Solche LOH-Studien an sporadischen Phäochromozytomen legen nahe, dass spezifische Loci auf den Chromosomen **1p34-36** [14, 15], **3p** [14], **17p** und **22q** [14] mögliche Tumorsuppressorgene tragen [14, 15, 80].

Benn und Mitarbeiter. [15] vermuteten nach LOH-Studien auf Chromosom **1p** mindestens drei verschiedenen Tumorsuppressorgene in den Regionen PC1 (D1S243 bis D1S244), PC2 (D1S228 bis D1S507) und PC3 (D1S507 bis zum Zentromer). Insbesondere der Region PC2 wurde in dieser Untersuchung größere Bedeutung zugemessen. Als mögliche Kandidatengene dieser Region wurden *casparase 9*, *ZNF151* und *CD30* genannt. Für die Regionen PC1 und PC3 wurden *TNFRSF12*, *PIK3CD* und *p73*, bzw. *CDC42*, *E2F2*, *HEIR 1* und *RAP1A* angegeben.

Bender und Mitarbeiter [14] fanden bei 36 VHL-assoziierten Phäochromozytomen einen LOH auf Chromosom **3p** (VHL-Locus) bei 91% der Tumoren, einen LOH auf **1p** bei 15% der Tumoren und einen LOH auf **22q** bei 21% der Tumoren. Für die 17 sporadischen Phäochromozytome dieser Studie ergaben sich statistisch signifikant umgekehrte Verhältnisse: LOH auf **3p** bei 24%, LOH auf **1p** bei 71% und LOH auf **22q** bei 53%. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass sporadische und VHL-assoziierte Phäochromozytome unterschiedliche pathogenetische *pathways* beschreiten; eine hinsichtlich geplanter Arrayuntersuchungen sehr reizvolle Aussicht. Lui und Mitarbeiter [72] zeigten 2002 durch vergleichende genomische Hybridisation (CGH, *comparative genomic hybridization*) an einer Serie von 36 VHL-assoziierten Phäochromozytomen einen Verlust von Chromosom **3** (p oder gesamt) bei 34

Tumoren (94%) und von Chromosom **11** (p oder gesamt) bei 31 Tumoren (86%). Der Verlust von Chromosom **11** ist dabei offenbar spezifisch für das VHL-assoziierte Phäochromozytom, denn er ließ sich in 10 ebenfalls untersuchten VHL-assoziierten ZNS-Hämangioblastomen gar nicht nachweisen und fand sich in sporadischen und MEN 2-assoziierten Phäochromozytomen mit deutlich geringerer Häufigkeit. An dritter Stelle der Häufigkeit rangierten Verluste auf Chromosom **1p11-p31** (17% bei VHL-assoziierten Phäochromozytomen). Eine Analyse der beiden auf Chromosom 11 bereits bekannten Tumorsuppressorgene, nämlich *SDHD* und *MEN1* ergab in all diesen Fällen keine Mutation, so dass neben anderen Erklärungen auch die Möglichkeit weiterer, bislang unbekannter Tumorsuppressorgene auf Chromosom 11 gegeben ist. Ähnlich wie Benn kommt auch Lui zu der Schlussfolgerung, dass VHL-assoziierte Phäochromozytome einen eigenen *pathway* beschreiten.

Edström Elder [38] fand in einer ähnlichen Untersuchung mittels CGH an 34 Phäochromozytomen bei 32 Tumoren numerische Veränderungen in der Zahl der DNA-Kopien. In abfallender Häufigkeit wurden Verluste auf den Chromosomen **1(1cen bis-p31), 3q, 11p, 3p, 4q, 11q** und **2q** gefunden. Zusätzliche Kopien fanden sich auf **19p, 19q, 17q, 11q** und **16p**.

Im Kontrast zu dieser Vielzahl an Informationen über genetische Veränderungen bei Phäochromozytomen insgesamt ist über die genetische Grundlage der Malignität oder malignen Transformation dieser Tumoren bislang nichts sicheres bekannt. Bei einer LOH-Untersuchung an insgesamt 53 Phäochromozytomen fanden Bender und Mitarbeiter [14] bei allen 4 malignen Phäochromozytomen der Studie (drei sporadisch, eines VHL-assoziiert) einen LOH auf Chromosom **1p**. Damit liegt die Vermutung eines Tumorsuppressorgens auf Chromosom **1p** nahe. Eine statistische Signifikanz ergab sich bei der geringen Anzahl maligner Tumoren aber nicht. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Untersuchung von Neuroblastomen gemacht [Literatur bei 14].

Ein weiterer Versuch, Unterschiede zwischen benignen und malignen Phäochromozytomen aufzuzeigen, stammt von einer Arbeitsgruppe um Helman [50]. Bei der Analyse der *neuropeptide Y* mRNA fanden sie eine Expression in 9 von 9 benignen, aber nur in 4 von 11 malignen Tumoren.

3) Bedeutung der Microarray-Technologie

Aufbau eines Arrays und Untersuchungsprinzip

Um die in einem Gen verschlüsselte Information zu aktivieren, sind zwei Schritte notwendig: 1. die *Transskription* der genomischen DNA in die sogenannte m(essenger)RNA und 2. die *Translation* der nun in der mRNA gespeicherten Information in eine Proteinstruktur. Beide Vorgänge, das „Abschreiben“ und die „Übersetzung“ sind hochkomplexe Vorgänge [75]. Beide zusammen führen zur Expression eines Gens.

Diese Expression kann durch Northern Blot, RT-PCR (*reverse transkriptase-polymerase chain reaction*) und Gewebe-in-situ-Hybridisierung untersucht werden. Das Verfahren der RT-PCR wird im Ergebnisteil dargestellt.

Das grundlegende Prinzip des Northern Blots und der Gewebe-in-situ -Hybridisierung besteht in der Ausnutzung der Fähigkeit komplementärer Einzelstrang-Nukleinsäure-Moleküle (DNA und/oder RNA), miteinander ein Doppelstrangmolekül zu bilden, d.h. miteinander zu *hybridisieren*. Die zu analysierende Probe wird dabei an eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran gebunden und mit markierten, in ihrer Sequenz bekannten DNA- oder RNA-Molekülen zusammengebracht. Durch Messung der Menge komplementär gebundener (d.h. hybridisierter) markierter RNA ist dann ein Rückschluss auf die Zusammensetzung der Probe möglich [100].

Alle drei o.g. Methoden sind geeignet, einzelne oder einige wenige Gene in ihrer Aktivität zu untersuchen. Im Zuge der rasch voranschreitenden Entschlüsselung des gesamten menschlichen Genoms wurden Anstrengungen unternommen, Technologien zu entwickeln, die es ermöglichen sollten, eine erheblich größere Menge von Genen, möglicherweise sogar das komplette Genom, simultan zu analysieren.

Bei der großen Zahl der Gene waren dazu eine Automatisierung und eine Miniaturisierung erforderlich. Im DNA-Microarray sind beide Prinzipien verwirklicht. Der Begriff *microarray* drückt dies auch aus. Er setzt sich aus dem griechischen Adjektiv *μικρός* „klein“ und dem englischen Begriff *array* zusammen. Das Substantiv „*array*“ kann man mit „Ordnung, stattliche Reihe, Menge“ übersetzen. Das Verb *to array*“ bedeutet dementsprechend „ordnen, aufstellen (besonders im Sinne von: Truppen aufstellen)“ [66].

Synonym zu der Bezeichnung *DNA-Microarray* werden auch die Begriffe *DNA-Chip* und *Gen-Chip* (Affymetrix patentiert) verwendet.

Eine wichtige Voraussetzung für Automatisierung und Miniaturisierung war die Verwendung solider nicht-poröser Trägermaterialien wie Glas.

Je nach Konstruktionsart lassen sich grundsätzlich zwei verschiedene Array-Typen unterscheiden:

1. Microarrays mit DNA-Clonen (500-2000 Nukleotide), die zunächst außerhalb des Glasträgers amplifiziert und anschließend per sogenanntem mechanischen *microspotting* auf den Array „gedruckt“ werden. In der englisch-sprachigen Literatur wird dieser Vorgang als *array printing* bezeichnet. Der Begriff des DNA-Clons bedeutet hierbei exakt definierte und einem bestimmten Gen zugeordnete DNA-Fragmente. Die verwendeten Clone werden in Plasmidform käuflich erworben (Fa. *research genetics*). Sie werden nach Transfektion in E.coli-Bakterien amplifiziert und anschließend aufgereinigt. Nach Amplifikation mittels PCR erfolgt dann das Aufdrucken auf einen Array.

Die in dieser Arbeit beschriebenen, in Schweden produzierten Arrays gehören zu diesem Typ.

Eine Variation des mechanischen *microspottings* ist das *ink jetting*-Verfahren, bei dem die DNA mittels piezoelektrischer Kräfte über eine Düse auf den Glasträger aufgebracht wird. Die Düse selbst kommt dabei mit dem Glas-Träger nicht in direkten Kontakt.

2. Microarrays mit Oligonukleotiden (typischerweise 15-50 Nukleotide), die *in situ* auf dem Träger synthetisiert werden. Pionier dieses Verfahrens ist die Firma Affymetrix, Inc., Santa Clara, Kalifornien. Zur Anwendung kommt dabei eine Kombination photolithographischer Technologien aus der Halbleiterindustrie und chemischer Verfahren der Oligonukleotidsynthese.

Einen Überblick über die o.g. Verfahren findet sich bei Schena et al., Trends in Biotechnology [93].

Nicht zu verwechseln mit den hier dargestellten DNA-Microarrays sind die sogenannten *Tissue Microarrays* [61, 70, 85]. Zwar kommt auch bei diesen das Prinzip der Miniaturisierung eines Untersuchungsverfahrens auf einem Glasträger zur

Anwendung. Untersuchungsmaterial und Untersuchungsprinzip sind aber gänzlich anders:

Tissue Microarrays bestehen aus ca. 1000 zylindrischen Gewebebiopsien von jeweils unterschiedlichen Patienten, die allesamt auf einem einzigen Glaträger aufgebracht werden. Jede Gewebebiopsie nimmt dabei einen scheibenförmigen Raum von 0,6 mm Durchmesser und 4-8 µm Dicke ein. Nach immunhistochemischer Färbung oder *in situ* Hybridisierung kann unter dem Mikroskop das Färbeverhalten aller 1000 Gewebeproben betrachtet werden und es sind nicht 1000 Einzelschnitte und Färbungen notwendig. Dieses Verfahren eignet sich besonders zum schnellen Screening eines (neuentdeckten) Tumormarkers bei einer großen Anzahl von Tumor- und Normalgeweben und dient mehr der Grundlagenforschung als der individuellen Diagnostik.

Wenn im Folgenden in dieser Arbeit von Microarrays gesprochen wird, so sind damit immer DNA-Microarrays gemeint.

4) Vorausgegangene Arbeiten zur Microarray-Technologie

Dass die Microarray-Technologie eine aufstrebende Technologie ist, lässt sich u.a. an steigenden Publikationszahlen festmachen. Eine Internet-Recherche mittels PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=&DB=PubMed>) ergab unter dem Suchwort *microarray* allein für den Zeitraum von Januar bis August 2002 1232 Publikationen. Von diesen beschäftigt sich ein Großteil mit der Fortentwicklung der Technologie selbst. Im Folgenden wird eine Auswahl solcher Publikationen vorgestellt, bei denen überwiegend die klinische Anwendung im Vordergrund steht und teilweise neue Einsichten über Krankheitsentitäten und Subgruppen gewonnen werden konnten.

Die erste wichtige Arbeit, die exemplarisch die Möglichkeiten der Array-Technologie aufzeigte, wurde von Schena, Shalon, Davis und Brown **1995** in Science veröffentlicht [94]. Auf einem Glasobjektträger waren auf einem Areal von 3,5 x 5,5 mm 45 Gene der Blütenpflanze *Arabidopsis thaliana*, die das kleinste Genom der höher entwickelten Eukaryonten hat, und drei Kontrollgene von Mensch, Ratte und

Hefe angebracht. Mit so vorbereiteten Arrays wurden drei verschiedene Hybridisierungsexperimente durchgeführt:

1. Hybridisierung mit Arabidopsis-mRNA, angereichert mit einer bekannten Menge humaner Acetylcholinrezeptor-mRNA zur Kalibrierung des Systems durch Messung mit verschiedener Sensitivität.
2. Hybridisierung Arabidopsis-Wildtyp gegen HAT4-transgene Pflanzen mit bekannter Überexpression des Transkriptionsfaktors HAT4.
3. Hybridisierung von Arabidopsis-Blattzellen gegen Arabidopsis-Wurzelzellen.

Das Ergebnis des Arrays wurde bei Versuch 2 mittels Northern Blot verifiziert.

1999 konnten Golub und Mitarbeiter [44] zeigen, dass die alleinige Kenntnis des Genexpressionsmusters die Unterscheidung einer akuten myeloischen von einer akuten lymphoblastischen Leukämie möglich machte. Die 50 am meisten korrelierenden Gene, die die Autoren aus den insgesamt 6.817 Genen eines *Affymetrix* Oligonukleotid-Arrays herausfilterten, wurden dabei zu einem sogenannten „50-gene-predictor“ zusammengefasst. Dazu gehörten bemerkenswerterweise nicht nur solche Gene, die für die jeweiligen Vorläuferzellen charakteristisch sind, d.h. im Verlauf der normalen myeloischen oder lymphatischen Reifung aktiviert werden, sondern auch Gene, die mit der Steuerung des Zellzyklus, der Transkription und der Zelladhäsion in Verbindung stehen, sowie bereits bekannte Onkogene.

Ebenfalls **1999** demonstrierten Sgroi und Mitarbeiter [96] eine interessante Kombination der Microarray-Technologie mit einer weiteren miniaturisierten Technik: Durch *laser-capture-microdissection* (LCM) wurden bei einer Patientin mit Mamma-Karzinom unterschiedliche Zellpopulationen, nämlich normales Drüsengewebe, invasives Tumorgewebe und metastatisches Tumorgewebe isoliert und anschließend per Microarray untersucht. Hierbei zeigten sich Expressionsunterschiede zwischen den drei Zellpopulationen.

Dieselbe Kombination aus LCM und DNA-Microarrays nutzten auch Leethanakul und Mitarbeiter [68] im Jahr **2000** zur Untersuchung von 5 Plattenepithelkarzinomen des HNO-Bereiches (Zunge, Larynx und Pharynx). Erwartungsgemäß zeigten dabei die Tumorzellen eine verminderte Aktivität der Zytokeratine im Sinne eines

Differenzierungsverlustes. Stärker exprimiert waren dagegen solche Gene, die den Zellzyklus (z.B. *Cyclin D1*), die Angiogenese (z.B. *VEGF-C*) und die Apoptose (z.B. *casparase* Vorläufer und *IAP* [Inhibitor of Apoptosis Protein]) steuern, sowie verschiedene Wachstumsfaktoren und Onkogene. Unerwartet war in dieser Studie die Überexpression von Mitgliedern des sogenannten *wnt* und *notch pathways*.

Eine breit angelegte *in vitro* Studie veröffentlichten Ross und Mitarbeiter [91] im Jahr **2000**. Sie untersuchten per Microarray 60 Zelllinien unterschiedlicher Tumoren (*the NCI60*) des National Cancer Institutes, USA. Die Arrays enthielten dabei ca. 8.000 Gene. Ein Großteil der Zelllinien ordnete sich im hierarchischen Clustern entsprechend der Ursprungshistologie benachbart an, so Tumoren des ZNS, der Niere, des Ovars, des Colons, Leukämien und Melanome. Dagegen verteilten sich Tumoren der Prostata, kleinzellige Bronchial- und Mammakarzinome in verschiedene Endaufzweigungen. In Einzelfällen kamen nach Analyse der Genexpression dabei sogar Zweifel an der lichtmikroskopischen Diagnose auf.

Obwohl der Vorgang der Tumorprogression komplex ist, kann bereits die Modulation, d.h. Aktivierung oder Ausschaltung einzelner Gene erhebliche Veränderungen der Tumorzellmorphologie und des Tumorverhaltens nach sich ziehen. Ein Beispiel dafür ist das Gen *RhoC*. Es handelt sich dabei um ein Mitglied der Familie der Rho-GTPasen, die an der Kontrolle der Zytoskelett-Organisation einer Zelle beteiligt sind und damit auch ihre Motilität beeinflussen. Clark und Mitarbeiter [27] identifizierten im Jahr **2000** das Gen *RhoC* als wichtigen Faktor der Metastasenbildung. Ihre Arbeit ist beispielhaft für die Möglichkeiten, die sich aus der Anwendung der DNA-Microarray-Technologie ergeben, und die konsequente Überprüfung der Arrayergebnisse mittels zusätzlicher Methoden: Über ein *in vivo* Nacktmaus-Modell wurden zunächst aus einer humanen Melanom-Zelllinie mit schwachem Metastasierungspotential solche Zellen isoliert und angereichert, die über ein stärkeres Metastasierungspotential (in diesem Fall Fähigkeit zur Bildung von Lungenmetastasen) verfügten. Die aus diesen Zellen gewonnene RNA wurde zusammen mit der RNA der ursprünglichen Zelllinie auf einen Array aufgetragen und verglichen. Hierbei zeigte sich in den metastasierenden Zellen eine deutlich höhere Expression von *RhoC*, *Fibronectin* und *Thymosin β 4*. Die anschließende Überprüfung dieses Ergebnisses wiederum im Nacktmaus-Modell mittels spezieller Melanom-Zelllinien, die mit *RhoC*-Mutanten mit

gesteigerter oder verringerter Aktivität transfiziert waren, bestätigte die aus dem Array gewonnene Hypothese.

Erwähnenswert ist, dass eine erhöhte RhoC-Expression auch bei der Progression von Adenokarzinomen des Pankreas hin zu einem metastasierenden Phänotyp beobachtet wurde [103].

Eine Arbeitsgruppe um Huang [54] beschrieb im Jahr **2000** Genexpressionsunterschiede zwischen 11 niedrig malignen Astrozytomen WHO Grad 2 und normalem Hirngewebe (3 Hirnproben von zwei Patienten; Hippocampus, Cortex und Medulla oblongata ohne signifikanten Unterschied in der Genexpression innerhalb des Normalgewebes). Verwendet wurde dabei ein *Clontech* Array mit 1.176 tumor-assoziierten Genen/Clonen. Hierbei wurden im Tumorgewebe 6 Gene gefunden, die im Normalgewebe überhaupt nicht exprimiert wurden, 7 weitere Gene mit mindestens 2-facher Überexpression und 11 Gene mit mindestens 50 %iger Unterexpression. Die Arrayergebnisse wurden mittels RT-PCR und für ein Gen auch mittels Immunhistochemie verifiziert.

Alizadeh und Mitarbeiter [4, Kommentar in 16 und 109] gelang im Jahr **2000** eine Differenzierung des diffusen groß-zelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL), des häufigsten Subtyps unter den Non-Hodgkin-Lymphomen, in zwei Unterformen, die lichtmikroskopisch identisch, aber in Ihrem Ansprechen auf Chemotherapie sehr unterschiedlich sind. Diese Differenzierung wurde möglich anhand der Analyse des Genexpressionsmusters, das bei beiden Subtypen unterschiedliche Cluster ausbildete.

Zur Anwendung kam hierbei ein, auf die spezielle Fragestellung hin konstruierter, „Lymphochip“ mit insgesamt 17.856 cDNA-Clonen. Die untersuchten Proben waren Cyanin 5-markiert. Als Referenz cDNA diente bei dieser Untersuchung ein Cyanin 3-markierter Pool aus 9 verschiedenen Lymphom-Zelllinien.

Die Ergebnisse von Alizadeh bedeuteten die erste rein *microarray*-basierte Subgruppenbildung bei einem Tumor, der sich nach klassischen lichtmikroskopischen Kriterien einheitlich darstellt. In der Konsequenz ergibt sich daraus auch erstmalig eine klinische Indikation zur Arrayuntersuchung bei individuellen Patienten zur Therapieplanung.

Durchaus vergleichbar damit ist eine Arbeit von Bittner und Mitarbeitern [17] aus dem Jahr **2000**, bei der eine Trennung von aggressiven und weniger aggressiven Tumoren dargestellt wurde. Die Arbeitsgruppe untersuchte 31 kutane Melanome mit einem 6.971 Gene enthaltenden Microarray. Es ergab sich dabei ein Cluster mit ähnlichem Expressionsbild, in das sich 19 der 31 Melanome eingliedern ließen. Dabei zeigten Tumoren innerhalb des Clusters eine verminderte Expression solcher Gene, die mit der Zellausbreitung und Migration, sowie der Adhäsion in Verbindung stehen. In einer Reihe von Assays ließ sich bei diesen 19 Tumoren *in vitro* tatsächlich auch eine eingeschränkte Motilität, reduzierte Fähigkeit zum invasiven Wachstum und zur vaskulogenen Mimikry nachweisen. Bei der Analyse der klinischen Verlaufsdaten fiel auf, dass innerhalb des Clusters nur 3 von 10 Patienten (von denen Daten vorhanden waren) zwischenzeitlich verstorben waren, während außerhalb des Clusters 4 Todesfälle bei 5 Patienten zu verzeichnen waren. Bei insgesamt schlechtem klinischen Outcome aller Patienten innerhalb dieser Studie und fehlenden Daten konnte allerdings daraus und aus den sonstigen klinischen Parametern ein Signifikanzniveau nicht erreicht werden.

Bemerkenswert ist, dass die Gruppe der als höher maligne eingestuft Melanome *in vitro* ein tubuläres, gefäßartiges Netzwerk bildete, obwohl das Erscheinungsbild der Melanome unter dem Mikroskop nicht unterschiedlich war. Damit wurde erstmals aus der Analyse des Transkriptes eine Voraussage für experimentell überprüfbare phänotypische Eigenschaften möglich, die sich der Mikroskopie des Originaltumorpräparates entzogen.

Arrays können auch Aufschlüsse über die Herkunft von Tumorzellen geben:

Eine Arbeitsgruppe um Perou [84] untersuchte im Jahr **2000** 65 chirurgisch entfernte Mammakarzinome von 42 Patientinnen mittels eines Microarray-Systems, das 8.102 Gene repräsentierte. Als Vergleichsstandard diente ein Pool aus 11 verschiedenen Zelllinien. 20 Tumoren wurden doppelt, d.h. vor und nach einer im Median 16-wöchigen Chemotherapie mit Doxorubicin untersucht (offene Biopsie – Chemotherapie – Operation). Bei zwei Patientinnen wurde neben dem Primärtumor auch Gewebe einer Lymphknotenmetastase in die Untersuchung eingeschlossen. Die Tumoren zeigten dabei große Unterschiede im Gen-Expressionsmuster. Die größten Gemeinsamkeiten zueinander wiesen die Probenpaare gleicher Patienten auf, d.h. das molekulare Portrait der Tumoren war vor und nach Chemotherapie,

bzw. in Primärtumor und Metastase weitgehend stabil und individuell. Es wurden außerdem Gruppen co-exprimierter Gene identifiziert und mit histologischen Charakteristika korreliert. So zeigten Östrogenrezeptor-positive Tumoren ein Expressionsmuster wie Lumenzellen. Bei den Östrogenrezeptor-negativen Tumoren konnte eine Subgruppe identifiziert werden, die ein Basalzell-artiges Expressionsmuster aufwies. Die Autoren schlussfolgerten, dass hierdurch Rückschlüsse auf die jeweiligen Vorläuferzellen möglich seien.

Desai und Mitarbeiter [32] publizierten **2002** ihre Ergebnisse zur Untersuchung der Genexpression von Mammakarzinomen im Mausmodell. Untersucht wurde Tumorgewebe transgener Mäuse mit Überexpression von 6 verschiedenen Onkogenen für die Entwicklung von humanen Mammakarzinomen. Zur Anwendung kamen hierbei zwei spezielle Arrays: ein *Mouse oncochip* mit 2.700 Genen und ein *Mouse Incyte GEM1* mit 8.700 Genen. Ziel der Studie war die Suche nach einem gemeinsamen bzw. onkogen-spezifischen *pathway*. Dabei zeigten alle Tumoren Gemeinsamkeiten gegenüber dem Normalgewebe mit Induktion bzw. Suppression bestimmter Gene. Das hierarchische Clustern gewährte darüber hinaus auch eine Einteilung in drei onkogen-spezifische Expressionsmuster. Bemerkenswert an dieser Studie ist, dass die Validierung der Arrayergebnisse durch Northern Blot **nicht immer** ein übereinstimmendes Ergebnis zeigte, und sich somit die Schlussfolgerung ergab, dass die Interpretation von Array-Ergebnissen vorsichtig zu erfolgen habe (!).

Die Einordnung von Tumoren in neue, bisher nicht bekannte Subgruppen ist nur dann von klinischem Wert, wenn sich daraus auch entweder Prognosefaktoren ableiten lassen oder, noch besser, eine Therapie differenzierter begründen lässt. Dies entspricht der Idee einer „maßgeschneiderten“ Therapie (*tailored cancer treatment*). Im Jahre **2002** veröffentlichten van 't Veer und Mitarbeiter [108, Kommentar in 21] eine Microarrayuntersuchung an 98 primären Mammakarzinomen, die zum Zeitpunkt der Operation bzw. Biopsie alle ohne Lymphknotenmetastasen waren. 78 Tumoren waren sporadisch, davon 34 mit und 44 ohne Fernmetastasen nach 5 Jahren *follow up*, 18 Tumoren hatten eine *BRCA1*-Keimzellmutation, 2 Tumoren eine *BRCA2*-Keimzellmutation. Verwendet wurde ein Arraysystem mit 25.000 Genen wobei eine Untersuchung der Einzelgewebe gegen einen Tumorpool gebildet aus den sporadischen Tumoren erfolgte. Es wurden 5.000 signifikante Gene

identifiziert. Ein hierarchisches Clustern ergab zwei Cluster mit 62 (*top*) versus 36 (*bottom*) Tumoren. Die nach dem Cluster gebildeten 2 Gruppen korrelierten klinisch hinsichtlich der Entwicklung von Fernmetastasen. Die *top*-Gruppe wies dabei die bessere Prognose auf und beinhaltete beide *BRCA2*-Tumoren; die *bottom*-Gruppe beinhaltete Tumoren mit einer schlechteren Prognose, die Östrogen-rezeptor negativ waren und histologisch eine vermehrte lymphozytäre Infiltration zeigten, 16 von 18 *BRCA1*-Tumoren gehörten zu dieser Gruppe. Ein hoher Differenzierungsgrad und Angioinvasion gehörten nicht zum Cluster. Es erfolgte eine Auswahl von 231 Genen, die mit der Prognose am stärkste korreliert waren: in der Gruppe mit der schlechten Prognose fanden sich Gene, die an Zellzyklus, Invasion, Metastasierung, Angiogenese, Signaltransduktion beteiligt waren, hochreguliert. Zur Validierung dieses Ergebnisses wurde das gleiche Schemas auf eine unabhängige Gruppe 19 weiterer Tumoren (insgesamt 117 Tumoren) lymphknoten-negativer Patientinnen angewendet. Dabei zeigte sich eine richtige Zuordnung in 17 von 19 Fällen.

Die Autoren schlussfolgerten, dass die Prognose eines Mammakarzinoms bereits aus dem Genexpressionsprofil des Primärtumors abgeleitet werden könne. Die von ihnen allein aus dem Genexpressionsprofil abgeleitete Klassifizierung der Tumoren in zwei Gruppen mit hohem, bzw. niedrigem Metastasierungspotential führte im Vergleich zur Anwendung der Kriterien zweier Konsensuskonferenzen für die Indikation zu einer postoperativen Chemotherapie zu einer korrekten Klassifizierung von Hochrisikopatientinnen, die von einer Chemotherapie profitieren, reduzierte aber gleichzeitig die Anzahl solcher Patientinnen, die einer solchen Therapie unnötig unterzogen würden.

Mehr der Grundlagenforschung, als der direkten klinischen Anwendung dient Shoemakers [97] **2001** Einsatz sogenannter Tiling-Arrays zur „Annotation“ des humanen Genoms. Tiling-Arrays (engl. *tile*: Dachziegel, Kachel, Fliese) beinhalten überlappende Oligonukleotide, um interessierende Genregionen „dachziegelartig“ komplett abzudecken. Die Methode ist geeignet, vorausgesagte Exons zu bestätigen und in Gene einzuteilen.

5) Fragestellungen

Mittels DNA-Microarray-Untersuchungen wird die Genexpression bei Phäochromozytomen untersucht.

Das Ergebnis der Untersuchung soll Antworten auf die folgenden Fragen erbringen:

1. Welche Gene sind beim Phäochromozytom im Gegensatz zum normalen Nebennierenmark differentiell exprimiert ?
2. Stimmen diese Gene überein mit den aus anderen Untersuchungen vorhergesagten Chromosomenabschnitten, in denen ein Verlust oder eine Amplifikation beobachtet wurde ?
3. Gibt es auf RNA-Expressionsebene einen Unterschied zwischen benignen und malignen Phäochromozytomen ?

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass auch auf dem Gebiet der neuroendokrinen Tumoren die Anzahl der denkbaren Fragestellungen und möglichen Versuchsansätze für Microarrays nahezu unbegrenzt ist. Mit der gleichen Fragestellung und klinischen Dringlichkeit kann und sollte man auch Nebennierenrindentumoren, Inselzelltumoren des Pankreas wie Insulinome und Gastrinome, und vor allem neuroendokrine Tumoren (NET) des Gastrointestinaltraktes untersuchen. Ebenfalls interessant, wenn auch aufgrund ihrer Rarität weniger vordringlich, wäre ein Vergleich der sehr seltenen Nebenschilddrüsenkarzinome mit den viel häufigeren benignen Nebenschilddrüsenadenomen oder -hyperplasien.

Trotz all dieser interessanten Möglichkeiten war die Wahl der Phäochromozytome als (erstes) Studienobjekt doch in mehrfacher Hinsicht begründet:

1. Die grundsätzliche Diagnose eines Phäochromozytoms ist biochemisch und histologisch eindeutig zu stellen. Somit gab es keine Schwierigkeiten in der klinischen Erfassung.
2. Zu den genetischen und molekularbiologischen Grundlagen dieser Erkrankung gibt es bereits eine ganze Reihe von Erkenntnissen, vor deren Hintergrund die Microarrayergebnisse bewertet und diskutiert werden können.
3. Neben benignen und malignen Formen gibt es offenbar keine speziellen Untergruppen. Auch die syndromisch bedingten Formen verhalten sich klinisch und histologisch prinzipiell gleichartig wie die sporadischen Tumoren.

Demgegenüber sind z.B. Nebennierenrinden- und Inselzelltumoren aufgrund ihrer z.T. sehr individuellen Hormonproduktion und mikroskopischen Erscheinungsform wesentlich heterogener.

4. Das für Microarrayuntersuchungen notwendige normale Vergleichsgewebe ist bei Phäochromozytomen in Form des normalen Nebennierenmarks grundsätzlich verfügbar. Demgegenüber ist das Normalgewebe für die Untersuchung eines neuroendokrinen Tumors des Gastrointestinaltraktes, d.h. die einzelne enterochromaffine Zelle in der Darmmucosa, für eine ausreichende RNA-Gewinnung praktisch nicht zugänglich. Ähnlich verhält es sich mit Inselzelltumoren des Pankreas, für die RNA aus einem normalen Inselzellapparat erforderlich wäre. Hier wird man in Zukunft entweder auf Zellkulturen oder auf speziell komponierte Standard-RNA-Präparate zurückgreifen müssen.

Material und Methoden

1) Patienten

Untersucht wurden 13 Gewebeproben von 11 Patienten mit klinisch, biochemisch und histologisch gesichertem Phäochromozytom. Es handelte sich um 7 Frauen und 4 Männer. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag bei 49 Jahren im Median (Spanne 22-63 Jahre). Die Patienten waren nicht miteinander verwandt. Bei insgesamt drei Patienten lag ein hereditäres Tumorleiden vor: bei zwei Patienten war ein von Hippel Lindau-Syndrom bekannt, eine Patientin hatte einen M. Recklinghausen (Neurofibromatose).

Symptomatik

Die zur Diagnose führende Anamnese und Symptomatik der Patienten ist in Tabelle 1 dargestellt. Häufigstes Symptom war ein Hypertonus bei 9 Patienten. Bei zwei relativ jungen Männern war es bereits zu Folgeschäden gekommen: ein 47jähriger Mann hatte einen Schlaganfall ausgebildet und ein 57jähriger Mann hatte bereits 6 Jahre vor Diagnosestellung des Phäochromozytoms einen Herzinfarkt erlitten. Bei einer 32jährigen Frau, die über anfallsweises Herzrasen bereits seit 10 Jahren berichtete, wurde der Tumor letztlich im Rahmen einer Schwangerschaft, die mit einer Präeklampsie einherging, diagnostiziert.

Operationen

Alle Ersteingriffe erfolgten zwischen Februar 1988 und Oktober 2000 an der Klinik für Endokrine Chirurgie der Universität Uppsala. In jedem Fall erfolgte eine Adrenalektomie. Der Tumor war in 7 Fällen rechtsseitig lokalisiert und in 3 Fällen linksseitig. Bei einem Patienten mit von Hippel Lindau-Syndrom lag ein beidseitiges Phäochromozytom vor, das synchron operiert wurde. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Operation, der Tumorgroße und sonstiger Begleitumstände wurden verschiedene Zugangswege zum Tumor genutzt: 5 Patienten wurden konventionell über einen transabdominellen Zugang operiert; bei einem Patienten war bei einem linksseitig

gelegenen 12x7x5 cm großen Tumor ein thorako-abdomineller Zugang erforderlich. Ein Patient wurde in konventioneller Technik von dorsal operiert. Bei 4 Patienten erfolgte ein laparoskopischer Eingriff. Dabei erfolgte einmal eine Konversion zu einer offenen Technik und ein Eingriff konnte unter Zuhilfenahme eines Handports endoskopisch beendet werden (siehe Tabelle 2).

Tumorgröße und Histologie

Tumorgröße und Histologie sind in Tabelle 2 bzw. 3 aufgelistet. Die pathohistologische Aufarbeitung der Tumoren erfolgte in allen Fällen durch Herrn Professor Dr. Lars Grimelius vom Pathologischen Institut der Universität Uppsala.

Die pathohistologische Untersuchung des Primärpräparates ergab in 6 von 11 Fällen keine besonderen Auffälligkeiten. Diese Tumoren wurden als benigne eingestuft. Bei den übrigen 5 Phäochromozytomen ergaben sich Besonderheiten, die von einem auffälligen Gefäßreichtum bis hin zu Tumorzellnachweis in Blutgefäßen reichte. Anhand der Primärpräparate wurde aber nur ein Tumor als „wahrscheinlich maligne“ eingestuft. Bei den übrigen 4 Phäochromozytomen wurde die Dignität als unklar bezeichnet.

Folgeoperationen und Follow up

Keines der 6 als benigne eingestuften Phäochromozytome rezidierte im weiteren Verlauf. Bei den 5 unklaren Tumoren kam es in 3 Fällen zu Rezidiven (siehe Tabelle 4):

Bei der Patientin **5194** wurde 6 Jahre nach Erstoperation ein 8x6x5 cm großes, die Leber und das Zwerchfell infiltrierendes Lokalrezidiv entfernt.

Bei der Patientin **7088** wurde 7 Monate nach Erstoperation ein 4x2 cm großes Lokalrezidiv reseziert.

Den schwersten Verlauf hatte Patient **5627**. Nach Resektion eines bereits sehr großen Primärtumors (12x7x5 cm) im August 1995 erfolgte knapp 4 Jahre später im April 1999 die Resektion einer hormonaktiven intraabdominellen Lymphknotenmetastase. Im Dezember 2000 wurde eine erneute Laparotomie mit linksseitiger Nephrektomie bei Lokalrezidiv mit multiplen Lymphknotenmetastasen

erforderlich. Im August 2002 wurden Lymphknotenmetastasen des Phäochromozytoms am Hals diagnostiziert und reseziert.

Mit in unsere Untersuchung einbezogen wurde Gewebe aus Lymphknotenmetastasen, das bei den beiden abdominellen Rezidivoperationen gewonnen wurde.

2) Vergleichsstandard

Als Vergleichsgewebe wurde eine normale Nebenniere genutzt, die bei einer Nierenoperation geopfert werden musste. Die RNA-Gewinnung erfolgte aus dem Mark dieser Nebenniere, das unmittelbar nach Entnahme von der Rinde disseziert wurde. Eine weitere normale Nebenniere, die ebenfalls im Rahmen einer Nephrektomie geopfert werden musste, wurde nicht für die Arrayuntersuchungen, aber, als zusätzliche Kontrolle, für die Stathmin-RT-PCR benutzt.

Proben-Nr.	Geschlecht	Alter bei Op	Symptomatik
5148	m	22	von Hippel Lindau-Syndrom, Hypertonie
5177	m	47	Hypertonie, Schlaganfall, Kopfschmerzen
5194	w	50	Hypertonie seit einigen Jahren, Tachykardie, Müdigkeit, Schwindel
5627	m	48	Hypertonie, Pleuraerguß, Diabetes mellitus, Müdigkeit
5685	w	49	M.Recklinghausen, Hypertonie
6258	w	48	Anfallsweises Herzrasen, Sehstörungen, Kopfschmerzen und Nachtschweiß seit 1 Jahr, "restless legs"
7088	w	63	Hypertonie
7094	w	53	schwere Hypertonie seit 7 Jahren
7160	w	32	Anfallsweises Herzrasen und Kopfschmerzen seit 10 Jahren, Präeklampsie bei Geburt eines Kindes 6 Wochen vor Operation
7293	m	57	Hypertonie, Herzinfarkt vor 6 Jahren
7313	w	55	von Hippel Lindau-Syndrom mit Angiomyolipom in der Niere, Hypertonie

Tabelle 1: klinische Angaben zu Geschlecht, Alter zum Operationszeitpunkt (in Jahren) und Symptomatik

Proben-Nr.	Erblichkeit	Malignität	Tumorseite	Tumorgroße (cm)	Zugang
5148	ja, von Hippel Lindau	Nein	beidseits	2x3 links, 4x3 rechts	transabdominell offen
5177	Nein	Nein	links	3 x 2	transabdominell offen
5194	Nein	Ja	rechts	7 x 5 x 5	transabdominell offen
5627	Nein	Ja	links	12 x 7 x 5	thorako-abdominell offen
5685	ja, Neurofibromatose	Nein	rechts	3	laparoskopisch mit Konversion
6258	Nein	Nein	rechts	3	offen über dorsalen Zugang
7088	Nein	Ja	rechts	4 x 5	transabdominell offen
7094	Nein	Nein	links	5,5 x 3 x 2,5	laparoskopisch mit Handport
7160	Nein	Nein	rechts	5,5 x 3,5 x 3	laparoskopisch
7293	Nein	Nein	rechts	9 x 7 x 6	transabdominell offen
7313	ja, von Hippel Lindau	Nein	rechts	6 x 6,5	laparoskopisch

Tabelle 2: Angaben zu Erblichkeit, Malignität, Tumorgroße und –seite, und Zugangsweg

Proben-Nr.	Histologische Befundung (durch Prof. Lars Grimelius, Universität Uppsala)
5148	keine besonderen Auffälligkeiten, Tumor als benigne eingestuft
5177	Histologisch gefäßreicher Tumor, Zellen etwas kleiner als gewöhnlich, leicht gesteigerte Mitosenzahl, größere Anzahl von Tumorzellen in Kapselnähe aber keine Kapselinvasion, Dignität unklar
5194	Histologie des Primärpräparates: Gefäßreichtum aber keine spezifischen Zeichen für Malignität
5627	Histologie des Primärpräparates: geringe Kapselinvasion der Tumorzellen, Dignität unklar
5685	keine besonderen Auffälligkeiten, Tumor als benigne eingestuft
6258	keine besonderen Auffälligkeiten, Tumor als benigne eingestuft
7088	Histologie des Primärpräparates: einige Tumorzellen in Blutgefäßen, Tumor als wahrscheinlich maligne eingestuft
7094	geringer Malignitätsverdacht bei Tumorzellnachweis in der Kapsel und unmittelbar perikapsulär, Dignität unklar
7160	keine besonderen Auffälligkeiten, Tumor als benigne eingestuft
7293	keine besonderen Auffälligkeiten, Tumor als benigne eingestuft
7313	keine besonderen Auffälligkeiten, Tumor als benigne eingestuft

Tabelle 3: Histologische Befunde

Proben-Nr.	Folgeoperationen	letztes Follow up	Tumornachweis bei FU
5148	Nein	2002	nein
5177	Nein	kein Follow up	
5194	7.9.1994 Lokalrezidiv an Zwerchfell und Leber-Segment 7, (8x6x5 cm), Leber- und Zwerchfellresektion über thorakoabdominellen Zugang, Histologisch Gefäßreichtum, atypische Nuclei und einige Mitosen, Tumorzellnachweis in Blutgefäßen, Tumor als klar maligne eingestuft	Okt 95	nein
5627	8.4.1999 Exstirpation einer intraabdominellen LK-Metastase 5.12.2000 Laparotomie und linksseitige Nephrektomie und Exzision intraabdomineller LK-Metastasen, 8/2002 Exstirpation von zervikalen LK-Metastasen am Hals, Histologie genauso wie 1999 und 2000	Aug 02	ja, zervikale LK-Metastasen
5685	Nein	kein Follow up	
6258	Nein	kein Follow up	
7088	20.1.2000 Lokalrezidiv mit klinischen und biochemischen Zeichen des Phäochromozytom, 4x2 cm großer Rezidivtumor mit einigen Mitosen, LK tumorfrei	Oct 2002	nein
7094	Nein	Feb 01	nein
7160	Nein	Apr 00	nein
7293	Nein	Nov 00	nein
7313	Nein	Aug 02	nein

Tabelle 4: Folgeoperationen und Follow up (FU)

3) Aufklärung und Ethik

Die wissenschaftliche Untersuchung des bei den Operationen entnommenen Gewebes erfolgte im Einverständnis der Patienten und gemäß den Richtlinien der Universität Uppsala, Schweden.

4) Herkunft der in Uppsala verwendeten Arrays

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Arrays wurden an der Universität Uppsala produziert. Standort der sogenannten Array-Plattform, die eine gemeinsame Nutzung dieser aufwändigen und kostspieligen Technologie in mehreren Instituten und Kliniken erlaubt, ist das Department für Genetik und Pathologie (Direktor: Professor Dr. Ulf Petterson) am Rudbeck-Laboratorium der Universität Uppsala.

Das „Bedrucken“ der Glasobjektträger (*array printing*) erfolgte mittels eines High-Density Spotters (*Cartesian Prosys 6000XL*), der über eine Kapazität von 100 Arrays pro Druckvorgang verfügt.



Abbildung: Array-Drucker (*Cartesian Prosys 6000XL*)

Die Größe des Arrayfeldes auf dem Glasobjektträger beträgt 76 x 25 mm.

Auf diesem Feld befinden sich 4 x 12 Blockfelder mit jeweils 18 x 18 *spots*. Insgesamt finden sich auf jedem Array 15.540 *spots*, d.h. 7.770 Gene in doppelter Ausführung. 12 Spotplätze bleiben frei.

Das doppelte Auftragen der DNA-Clone in versetzten Blockfeldern diente der Überprüfung der Reproduzierbarkeit innerhalb eines Arrays.

Eine genaue Auflistung aller verwendeten Gene (*Uppsala clone set*), die gelegentliche Modifikationen erfährt, findet sich unter der Internetadresse: <http://www.genpat.uu.se/wcn/uppsala.html>.

Die Kosten für die Herstellung eines einzelnen Arrays beliefen sich zum Zeitpunkt der Untersuchung auf ca. 1.000 Schwedische Kronen (ca. 112 €).

Ein *NEN*-Kit für Labeling und TSA-Detection von 20 Arrays kostet zwischen 20.000 und 30.000 Schwedische Kronen (ca. 2.220-3.330 €).

5) Lagerung des Gewebes

Das Tumorgewebe, aus dem die mRNA gewonnen wurde, wurde nach Entnahme bei der Operation geteilt. Ein kleinerer Teil wurde unverzüglich bei -70° Celsius eingefroren. Der größere Teil des Gewebes wurde in Paraffin eingebettet und histopathologisch untersucht.

6) Gewinnung und Qualitätskontrolle der RNA

Die Gewinnung der Gesamt-RNA (total RNA) erfolgte mittels der RNAwizTM-Methode (Fa. Ambion®).

Arbeitsschritte:

- Mechanische Homogenisierung von 50 mg Gewebe in Flüssigstickstoff,
- Auftrennung von Proteinen und Nukleinsäuren durch Inkubation mit 500 µl RNAwiz über 5 min,
- Zugabe von 100 µl Chloroform, Durchmischung und Inkubation über 10 min,
- Zentrifugation $> 10,000xg$ bei 4° Celsius über 15 min,

dadurch Separation in drei Phasen: eine obere wässrige farblose Phase, die die RNA enthält, eine mittlere trüb-visköse Phase, die den Hauptanteil der DNA beinhaltet und eine grünliche organische Phase mit dem Restgehalt der zellulären Bestandteile, Separation der oberen wässrigen Phase, Zugabe von 250 µl RNase freien Wassers und 500 µl Isopropanol, Durchmischung und Inkubation über 5 Minuten, Zentrifugation > 10,000xg bei 4 ° Celsius über 15 min, dadurch Ausfällung der RNA als Pellet, Waschen des Pellets mit 800µl 70%igem Ethanol, Zentrifugation > 10,000xg bei 4 ° Celsius über 5 min, dadurch erneute Ausfällung des Pellets, Resuspension in 88µl RNase-freien Wassers

Enzymatische Auflösung von DNA-Rückständen durch Inkubation mit DNase I über 60 min, Aufreinigung der RNA mittels spin columns, RNeasy® Mini Kit (Fa. Qiagen).

Die so gewonnene Gesamt-RNA wurde auf ein 0,8 %iges Ethidiumbromid-Agarose-Gel aufgetragen. Das typische Bild zeigte dabei zwei Banden der sogenannten r(ribosomalen)RNA, die mit 28S und 18S bezeichnet werden (siehe Bild). Die eigentliche, für die Umsetzung in cDNA benötigte, mRNA liegt zwischen diesen beiden Banden.

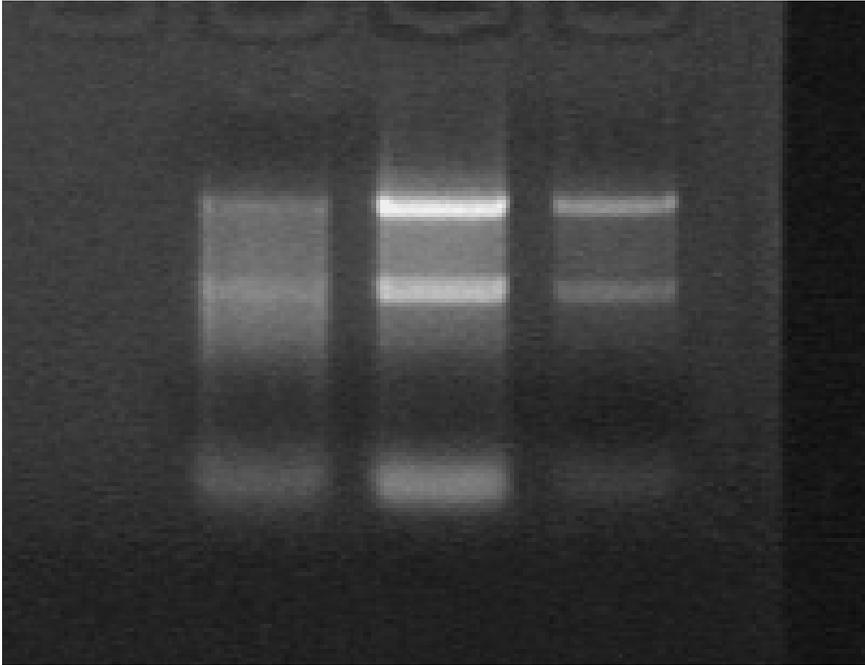


Abbildung 1: Ethidiumbromid-Agarose-Gel mit drei RNA-Isolaten

Konzentration und Reinheit der RNA wurden photospektrometrisch gemessen (GeneQuant II, RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech. Die $A(\text{bsorbance})_{260/280}$ ratio sollte über 1,6 liegen.

7) Synthese und Qualitätskontrolle der markierten cDNA

Die Synthese der c(omplementary)DNA erfolgte gemäß MICROMAX™ TSA™ Labeling and Detection Protokoll und Kit (Fa. PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, USA)

Arbeitsschritte:

Inkubation von 2 µg Gesamt-RNA mit 1 µl Reaction Mix-Konzentrat und jeweils 1µl Fluorescein- oder Biotin-markierten Nukleotiden mit einer entsprechenden Menge von RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µl,
Denaturierung von Sekundärstrukturen der RNA durch Inkubation bei 65 ° Celsius über 10 min,

Annealing der Primer an das RNA-Template durch Inkubation bei Raumtemperatur (25 ° Celsius) über 5 min,
Inkubation bei 42 ° Celsius über 2-3 Minuten,
Zugabe von 2,5 µl 10X RT Reaktionspuffer,
Zugabe von 2,0 µl AMV RT/RNase Inhibitor Mix (enthält das Enzym *Reverse Transkriptase*) und Inkubation über 60 min bei 42 ° Celsius,
Abkühlung auf 4 ° Celsius und Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 2,5 µl 0,5 M EDTA, pH 8,
Hydrolyse des RNA-Templates durch Zusatz von 2,5 µl 1,0 M NaOH bei 65 ° Celsius über 30 Minuten,
Stoppen der Hydrolyse durch Zusatz von 6,5 µl 1 M Tris HCl, pH 7,5.

Aufreinigung der Probe mittels Millipore Microcon YM – 100 Centrifugal Filter Units.

Die Qualitätskontrolle der cDNA erfolgte gemäß MICROMAX™ TSA™ Labeling and Detection Kit (sogenanntes *dot blotting*).

Arbeitsschritte:

Herstellung von Verdünnungsreihen aus der im vorangegangenen Schritt gewonnenen cDNA (1:10, 1:20, 1:40), sowie Fluorescein- und Biotin-markierter Kontroll-DNA (1:20, 1:40, 1:80) (im Kit vorhanden),
Auftragen von jeweils 2 x 1 µl der Verdünnungsreihe auf GeneScan-Membran
Beladung der Membran mit 10 ml 2X SSC,
Fixierung der cDNA-Spots auf der Membran mittels UV-Cross-Linking (*Stratalinker, automatic cross link program: 1200 x 10² micro Joules*),
Platzierung der Membran in einer Plastikfolie und Zugabe von 3,5 ml TN *blocking* Puffer mit 10 % Ziegen Serum und Inkubation über 30 min,
Verwerfen des *blocking* Puffers und Zugabe von Anti-Fluorescein-HRP(*horse radish peroxidase*)-Konjugat und Streptavidin-HRP-Konjugat und Inkubation über 30 min
Waschen der Membran mit TNT Buffer über 4 x 5 min unter Schütteln,
Inkubation mit 4CN Plus Diluent-Arbeitslösung über 30 min bei Dunkelheit.

Die cDNA-Synthese ist gelungen, wenn alle aufgetragenen Proben sichtbar sind und die 1:40 Verdünnung der Probe der Intensität der 1:80 Verdünnung der Kontrolle entspricht.

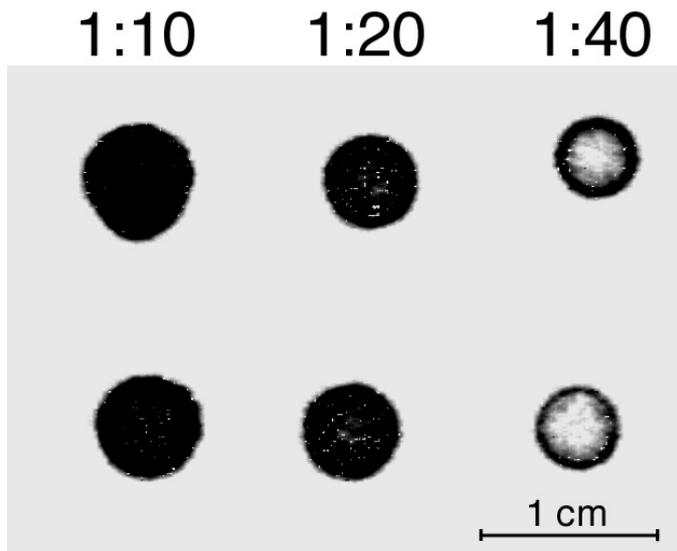


Abbildung 2: Ausschnitt aus einem *Dot Blot* der synthetisierten und markierten cDNA in dreimaliger Verdünnung; Proben jeweils doppelt aufgetragen.

8) Array-Hybridisierung

Die zu vergleichenden fluorescein- und biotin-markierten Proben, die gemeinsam auf den Array aufgetragen werden sollten, wurden in Hybridisationspuffer resuspendiert und zusammengegeben (Gesamtvolumen 60 μ l). Es folgte eine Denaturierung bei 90 ° Celsius über 2 min.

Es wurde ein Array in einer *Corning* Hybridisierungskammer platziert.



Abbildung 3: *Corning* Hybridisierungskammer geschlossen

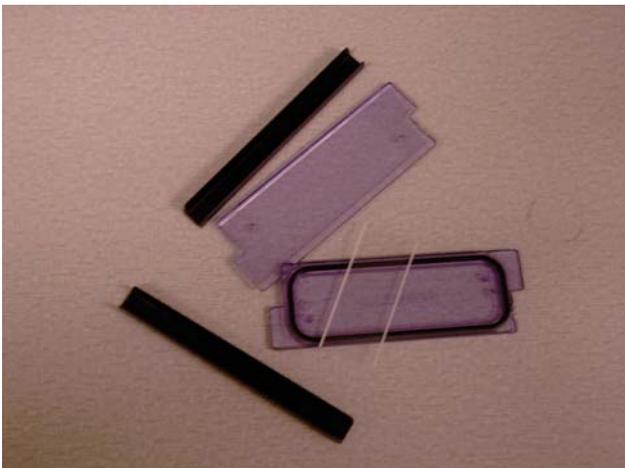


Abbildung 4: *Corning* Hybridisierungskammer zerlegt

Anschließend wurde die kombinierte Probe auf den Array aufgetragen und die Kammer verschlossen. Zum Schutz vor Austrocknung während der nachfolgenden Inkubation wurden in der *Corning* Hybridisierungskammer zusätzlich 2 x 500 µl SSC (*Sodium Citrat Chloride*) platziert. Es folgte eine Inkubation in einem Wasserbad bei 65 ° Celsius über 12-16 Stunden.

Jedes Experiment wurde zweifach mit vertauschter Farbmarkierung (*labeling*) durchgeführt, d.h. ein Array wurde mit einem Cyanin3-markierten Tumor und einer Cyanin5-markierten Referenz beladen und der zweite Array mit einem Cyanin5-

markierten Tumor und einer Cyanin3-markierten Referenz. Diese Maßnahme diente der Steigerung der Reliabilität der Untersuchung. Im folgenden wird diesbezüglich von *zwei korrespondierenden Arrays* gesprochen.

9) Stringentes Waschen und TSA-Detektion

Nach Inkubation wurde der Array aus der *Corning* Hybridisierungskammer herausgenommen und in folgenden Lösungen gewaschen:

5 min 0.5 x SSC (*Sodium Citrate Chloride*) + 0.01 % SDS *Lauryl Sulfat*

5 min 0.06 x SSC (*Sodium Citrate Chloride*) + 0.01 % SDS *Lauryl Sulfat*

2 min 0.06 x SSC (*Sodium Citrate Chloride*)

Die weiteren Arbeitsschritte dienen der TSA (*tyramide signal amplification*) Detektion:

Blockierung durch Auftragen von 600 µl TNG-10% Ziegenserum

Spülung mit 30 ml TNT Puffer

Anlagerung von HPR (*horse radish peroxidase*) durch Inkubation des Arrays mit 400 µl Anti-FL-HRP *conjugate* Lösung über 10 min.

Spülung mit 3 x 30 ml TNT Puffer über jeweils 1 min

Anlagerung von Cyanine 3 durch Inkubation mit 500 µl Cyanine 3 Tyramide Lösung über 10 min

Spülung mit 3 x 30 ml TNT Puffer über jeweils 5 min

HRP Inaktivierung durch Zugabe von 300 µl HRP Inaktivierungslösung

Spülung mit 3 x 30 ml TNT Puffer über jeweils 1 min

Anlagerung von HRP durch Inkubation des Arrays mit 400 µl Streptavidin-HRP *conjugate* Lösung über 10 min

Spülung mit 3 x 30 ml TNT Puffer über jeweils 1 min

Anlagerung von Cyanine 5 durch Inkubation mit 500 µl Cyanine 5

Tyramide Lösung über 10 min

Spülung mit 3 x 30 ml TNT Puffer über jeweils 5 min

Spülung mit 30 ml 0.06 x SSC (*Sodium Citrate Chloride*) über 1 min

Trocknen des Arrays durch Zentrifugation mit 800 Umdrehungen pro Minute über 4 min.

Der getrocknete Array wurde in einem dunklen Behälter gelagert und war damit prinzipiell mehrere Wochen stabil. Das Scannen des Arrays erfolgte jedoch in allen Fällen innerhalb von 4 h.

10) Scannen der Arrays und Anpassen eines Gitternetzes

Das Scannen (d.h. Einlesen) der Arrays erfolgte mittels eines GenePix 4000B-Scanners (*Axon Instruments, molecular dynamics, Part of Amersham Pharmacia Biotech*). Der Scanner war mit einem PC verbunden. Auf diesem war die zugehörige Software *GenePix Pro 4.0* installiert.

Beim Scannen eines Arrays muss vom Benutzer für die beiden Detektionswellenlängen (532 und 635 nm) individuell die sogenannte PMT- (*Photo Multiplication Tube*) Voltage gewählt werden. Je höher der gewählte PMT-Wert ist, desto sensibler ist die Detektion auch für schwache Signale auf dem Array. Gleichzeitig steigt damit aber auch die Detektion von Hintergrundsignalen außerhalb der *spots*. Ein idealer Array zeigt deutliche Signale über den *spots* bei möglichst wenig Hintergrundsignalen.

Wichtig sind folgende Zusammenhänge:

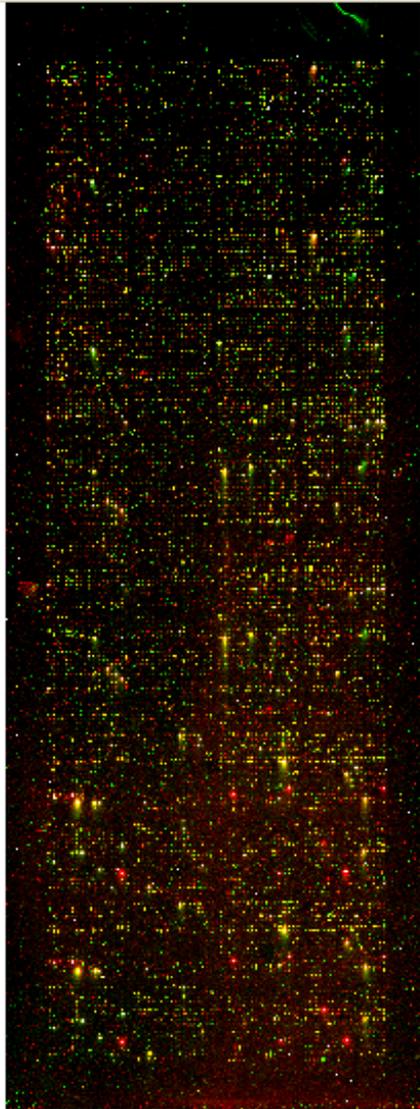
Fluorescein bindet Cyanin3 (pinkfarbenes Reagenz).

Dieses wird bei 532 nm detektiert und erscheint im Scan grün.

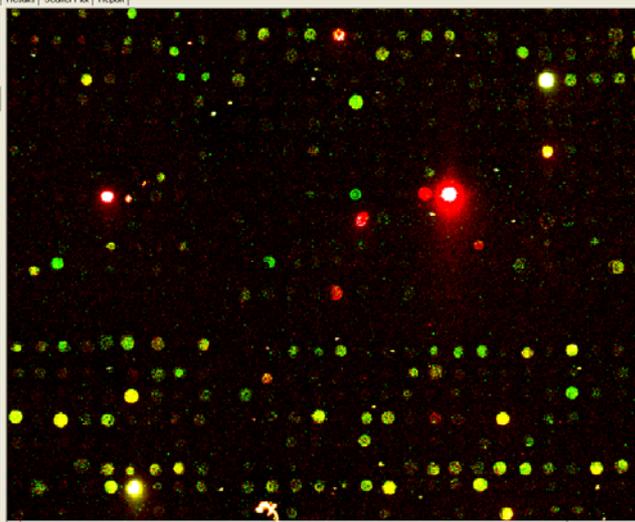
Biotin bindet Cyanin5 (blaues Reagenz).

Dieses wird bei 635 nm detektiert und erscheint im Scan rot.

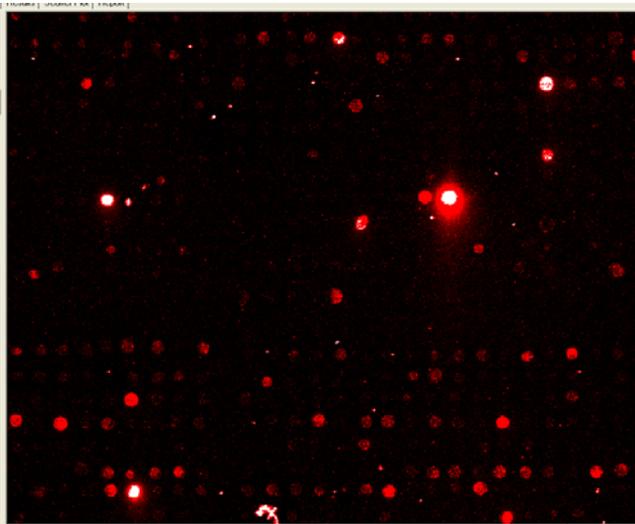
Abbildung 5: Scanbild eines Arrays (Gesamtübersicht)



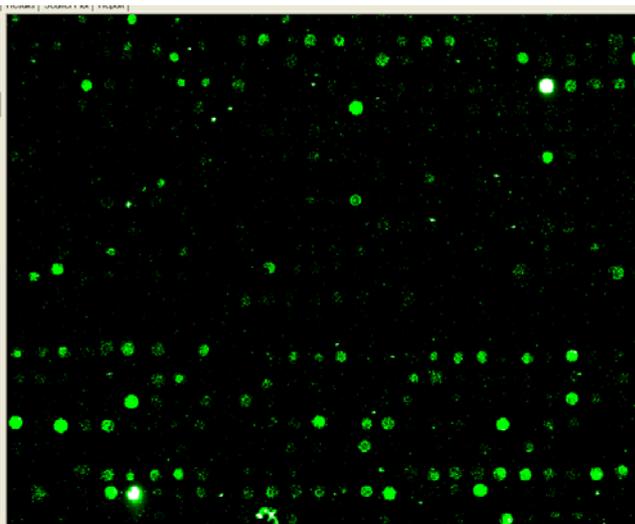
Die Scannbilder wurden im Corel© PHOTO PAINT 8.0 Image-Format gespeichert.



ratio 635 nm/532 nm



635 nm



532 nm

Abbildungen 6-8:

Dreifache Darstellung eines Arrayausschnittes bei 635 nm (rot), 532 nm (grün) und bei beiden Wellenlängen (ratio 635 nm/532 nm).

In den beiden Einzelwellenlängendarstellungen kommen jeweils unterschiedliche Spots zur Darstellung. Sehr stark markierte Spots erscheinen weiß. In der Darstellung mit beiden Wellenlängen (oberes Bild) erscheinen gleichstark detektierte Spots gelb.

Für jedes der 48 Blockfelder eines Arrays wurde ein Gitternetz (englisch *grid*) ebenfalls mittels der Software GenePix Pro 4.0 konstruiert. Die jeweils 18 x 18 Gen-Spots bildeten dabei die „Maschen“ des Blockfeldes. Sie wurden von dem Programm automatisch erkannt und adjustiert. Dennoch war eine manuelle Nachbearbeitung jedes einzelnen Blockes notwendig um einerseits vom Computer nicht erkannte Spots für die folgende Berechnung gültig werten zu können und andererseits vom Computer fälschlich als Signale gewertete Hintergrundpartikel und Artefakte ungültig zu werten.

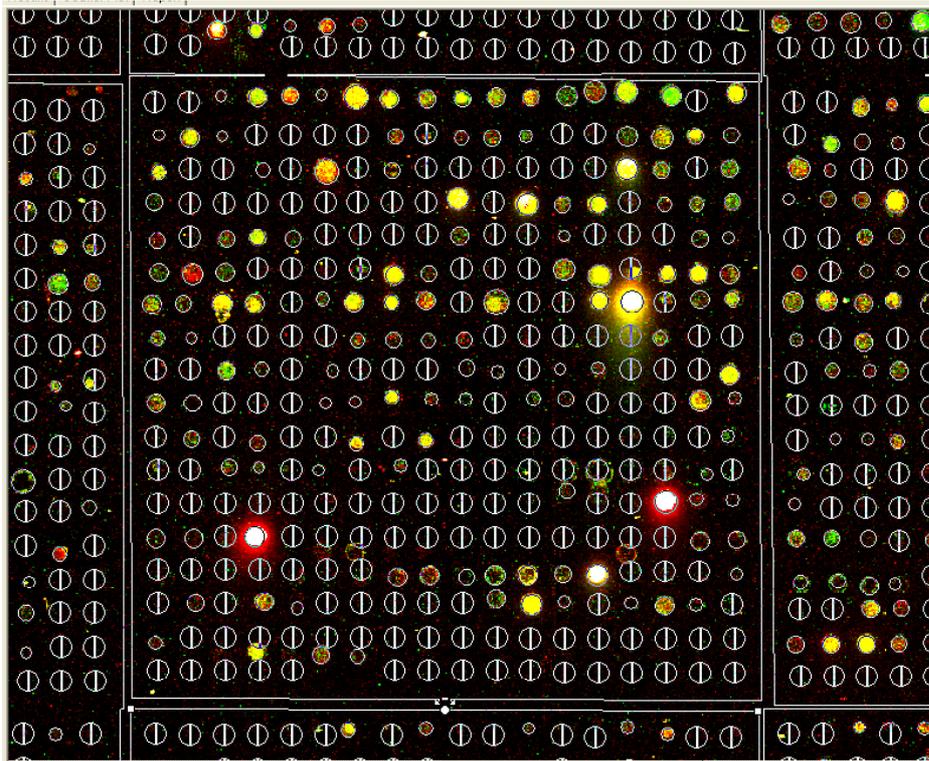


Abbildung 9: Darstellung eines Gitternetzes zur Berechnung der Einzelspots

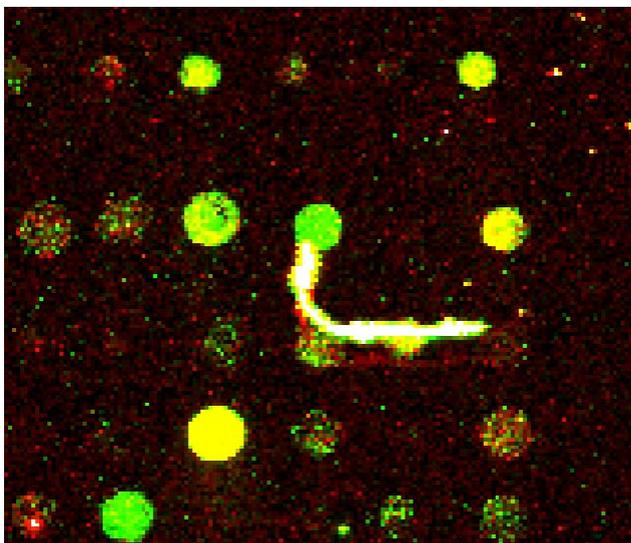
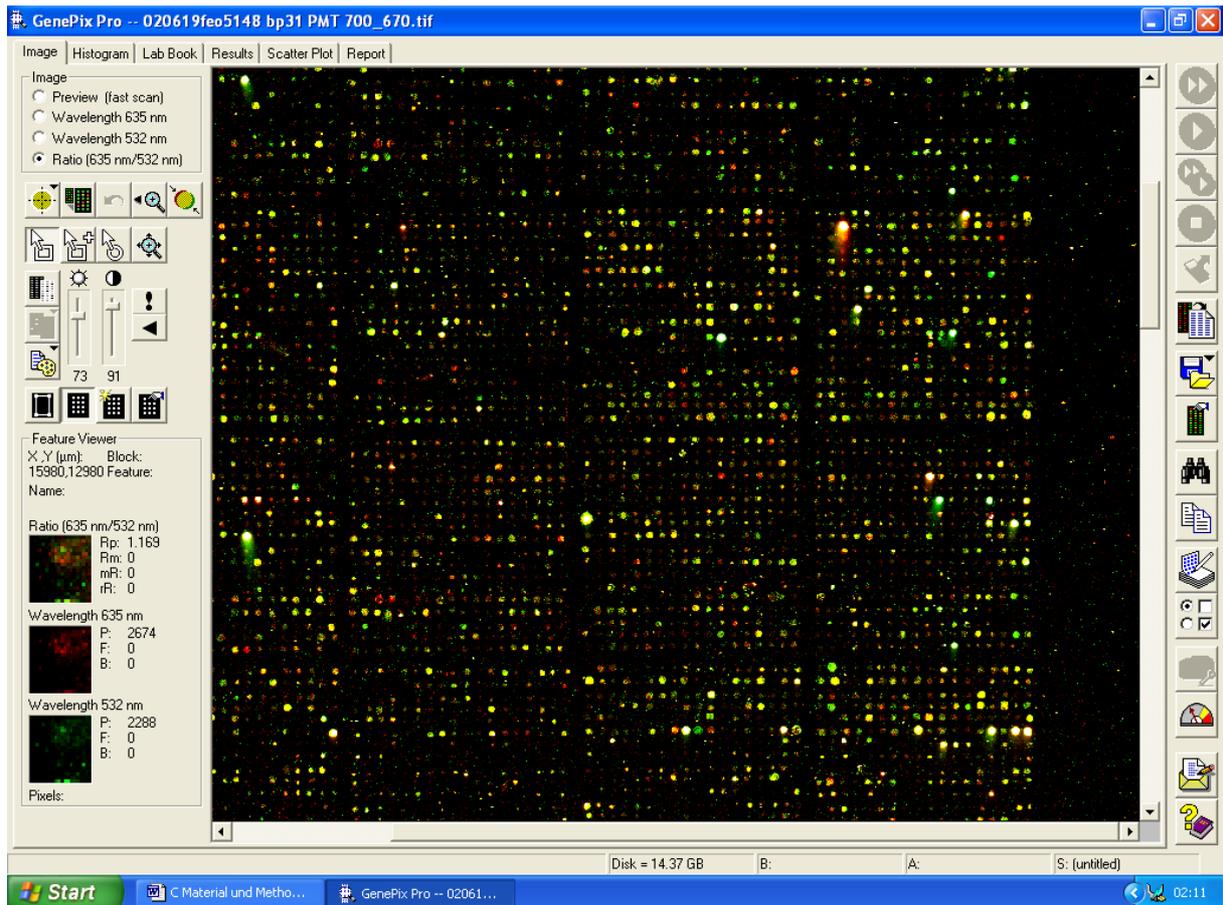


Abbildung 10: Bogenförmiger Artefakt, der zwei Spots der unteren Reihe nicht auswertbar macht. Diese werden als ungültig geflaggt.



An jedem der 15.540 Gitternetzpunkte, bzw. Spots erfolgte eine Messung der Lichtintensität bei 635 und 532 nm.

11) Normalisierung und Datenverarbeitung

Arrayuntersuchungen dienen der Messung von Genexpressionunterschieden zwischen zwei Geweben. Die *Gesamtmenge* der RNA bzw. DNA der beiden auf einen Array aufgetragenen Proben ist dabei idealerweise exakt gleich. Die Unterschiede bestehen nur in der Zusammensetzung. In der Wirklichkeit ist es aber kaum möglich, exakt gleiche Gesamt-RNA bzw. DNA-Mengen abzumessen und aufzutragen. Trägt man alle aus einem Array gewonnenen *ratio*-Werte (s.u.), d.h. die Verhältniszahlen rot / grün, in einen Graphen ein, zeigt der Median dieser Werte stets eine gewisse Verschiebung in den roten oder grünen Bereich hinein, abhängig

davon, ob die biotin- oder die fluoreszein-markierte Probe mehr Gesamt-RNA bzw. DNA enthält. Wenn diese Unterschiede auch normalerweise klein sind, können sie sich doch beim Vergleich mehrerer Arrays, insbesondere bei der Korrelation korrespondierender Arrays, störend auswirken. Es wurde daher über das Computerprogramm R 1.3.1 (*The R Development core team*, Version 1.3.1, R Console C 2001) eine sogenannte *Normalisierung* vorgenommen, welche diese Gesamtkonzentrationsunterschiede mathematisch ausgleichen konnte.

Durch Normalisierung ergaben sich für jeden Spot auf einem Array die Messwerte M und A. Dabei bedeutete

M = \log_2 rot/grün

Dieser Wert gibt die relative Farbverteilung an einem Spot an:

M = 0 bedeutet rot und grün sind gleich stark exprimiert, d.h. es liegt keine unterschiedliche Genexpression vor.

M positiv -> rot ist stärker exprimiert.

M negativ -> grün ist stärker exprimiert.

Durch Delogarithmierung von M erhält man die *ratio* rot/grün. Dabei bedeutet:

1 -> gleiche Expression.

> 1 -> rot ist stärker exprimiert.

< 1 -> grün ist stärker exprimiert.

A = $\log_2 \sqrt{\text{rot} \times \text{grün}}$, d.h. Wurzel aus rot x grün

Die Höhe dieses Wertes gibt den Expressionslevel an und korreliert mit der Reliabilität der Messung an jedem Spot.

Bei 15.540 *spots* ergaben sich somit 31.080 Daten pro Array. Die 26 Arrays für die insgesamt 13 Phäochromozytomproben, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, lieferten insgesamt $26 \times 31.080 = \mathbf{808.080}$ Messwerte.

Derzeit ist kein Computerprogramm in der Lage, diese Vielzahl von Rohdaten sinnvoll zu interpretieren und nicht alle Messwerte sind von Bedeutung, da ihre

Qualität durchaus unterschiedlich ist. Im Folgenden werden Wege beschrieben, die es erlauben, die wertvollen Daten herauszufiltern und die Gesamtmenge aller Daten deutlich (auf eine allerdings immer noch riesige Anzahl) zu reduzieren. Man muss sich aber bewusst sein, dass bei diesem Prozess möglicherweise einige wertvolle Daten verloren gehen können.

Diese Messwerte werden im Microsoft-Excel-Dateiformat gespeichert und weiterverarbeitet. In Säulen nebeneinander angeordnet, verhalten sich die M-Werte korrespondierender Arrays spiegelbildlich zueinander. Die Multiplikation aller M-Werte desjenigen Arrays, bei dem die Tumorprobe mit Cyanin3 markiert wurde, mit -1 hebt diese Spiegelbildlichkeit, die auf dem Wechsel der Farbmarkierung beruhte, auf. Die jeweils korrespondierenden Arrays sollten nun theoretisch an allen Messpunkten gleiche Werte zeigen.

Für jedes Gen ergaben sich 4 M-Werte, nämlich jeweils zwei auf den beiden korrespondierenden Arrays, da jedes Gen auf jedem Array paarweise aufgedruckt war. Idealerweise sollten diese 4 Werte jedes Gens übereinstimmen oder zumindest wenig voneinander abweichen. Der Mittelwert würde dann als *wahrer* Wert angenommen.

In der Wirklichkeit ist eine einfache Mittelwertbildung nicht erlaubt. Einerseits gibt es auf jedem Array Stellen, die offensichtlich nicht verwertbar sind (siehe Abbildung Artefakt). Andererseits können Ausreißer auftreten, die eine Mittelwertbildung sinnlos machen (ergeben sich z.B. an einem Gen die vier Messwerte 1, 2, 1 und 16, so ist die Annahme des Mittelwertes 5 nicht sinnvoll. Eher ist davon auszugehen, dass die 16 auf einem nicht gesehenen Artefakt beruht und der wahre Wert bei 1,33 liegt). In extremen Fällen und bei interessanten Genen ist eine individuelle Nachbetrachtung des betreffenden *spots* möglich. Angesichts der riesigen Datenmenge ist eine solche individuelle Betrachtung jedes Zahlenquartetts aber unmöglich. Die unglaublichen Messwerte wurden daher durch zwei sequentielle Rechenoperationen herausgefiltert. Im ersten Filterungsschritt wurden diejenigen Werte entfernt, die an *spots* gemessen wurden, die der Computer oder der kontrollierende Mensch als ungünstig bewertet hatte, denn auch an diesen Stellen erfolgte zunächst eine Messung durch den Computer. Im zweiten Filterungsschritt wurde der Durchschnitt der beiden *ratio*-Werte eines Gens auf einem Array berechnet und durch den Durchschnitt der

beiden *ratio*-Werte desselben Gens auf dem korrespondierenden Array geteilt. Ergaben sich dabei Werte größer als 2 oder kleiner als 0,5, wurden diese aus der weiteren Berechnung herausgenommen. Bei Genen, bei denen bereits durch den ersten Filterungsschritt nur einer der beiden Werte eines Paares übriggeblieben war, wurde dieser an Stelle des Durchschnittswertes verwendet. War ein komplettes Paar ausgelöscht, unterbleibt die Division und der verbliebene Einzelwert oder der Durchschnitt des verbleibenden Paares wurde akzeptiert.

Beispiel:

Für ein Gen ergeben sich an zwei korrespondierenden Arrays nach Multiplikation mit -1 und Delogarithmierung von M die folgenden 4 Messwerte:

Array 1	Array 2
0,95	1,08
0,95	0,94

Es erfolgt nun die Bildung eines Mittelwertes in jeder der beiden Spalten. Es ergibt sich:

Array 1	Array 2
0,95	1,01

Die Division beider Werte ergibt 0,94, ist also weder größer als 2 noch kleiner als 0,5. Der Mittelwert der beiden Werte, nämlich 0,98, wird dann als wahrer Wert angenommen. Er besagt, dass das entsprechende Gen in Tumor und Normalgewebe annähernd gleich stark exprimiert wird.

Auf diese Weise erhält man letztendlich zu jedem der 7.770 Gene zweier korrespondierender Arrays entweder einen gemittelten M-Wert oder keinen Wert, in dem Falle, dass ein Gen weder im Tumor noch in der Referenzprobe exprimiert wurde. Ebenfalls kein Wert ergibt sich in dem eher seltenen Fall, dass alle vier Spots ungültig waren.

12) Suche nach Kandidatengenenen und hierarchisches Clustern

Bei der Suche nach Kandidatengenenen, die in unterschiedlichen Proben differentiell exprimiert wurden, kam die folgende Software zur Anwendung:

SAM Version 1.13 „*Significance Analysis of Microarrays*“ (Gil Chu, Balasubramanian Narasimhan, Robert Tibshirani, Virginia Tusher; Stanford University, Ca, USA)

Für das hierarchische Clustern, das der Zuordnung von Proben in Gruppen und Erstellung von Mustern dient, wurde folgende Software verwendet:

J-Express V 2.1, MolMine AS, c/o Forlnova AS Thormøhlens gate 55, HIB, 5008 Bergen, Norway.

Nähere Einzelheiten zu beiden Computerprogrammen werden aus praktischen Gründen im Ergebnisteil dargestellt.

13) RT-PCR zur Bestätigung der Arrayergebnisse

Die Bestätigung einzelner Arrayergebnisse erfolgte durch semiquantitative RT-PCR (*reverse transcriptase – polymerase chain reaction*).

Diese Untersuchung wurde von Herrn Dr. Gunnar Westin und Herrn cand.med. Peyman Björklund konzipiert und durchgeführt. Am Beispiel des *Stathmin*-Gens ist die entsprechende Methodik in kurzer Form im Ergebnisteil dargestellt.

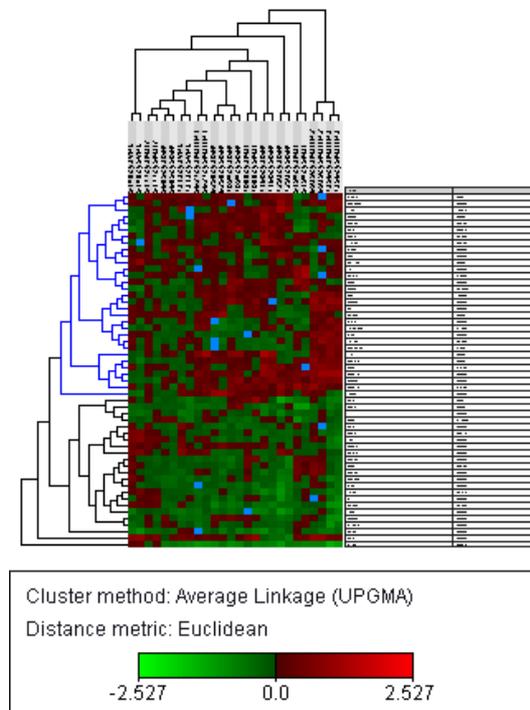
Ergebnisse

Aus 26 Arrayuntersuchungen ergaben sich ca. 800.000 Daten. Die Auswertung dieser Daten erfolgte mittels der Computerprogramme J-Express und SAM.

1) Hierarchisches Clustern

Mittels des Programms J-Express wurden mehrere sogenannte Baumdiagramme unter verschiedenen Bedingungen erstellt. Zwei relativ extreme Beispiele, die die Eckpunkte einer sehr strengen bzw. einer nicht strengen Wahl der Bedingungen darstellen, werden im folgenden aufgeführt:

Im ersten Baumdiagramm (strenge Bedingungen) wurde eine mindestens 2fach unterschiedliche Genexpression bei Akzeptanz von höchstens 5% fehlenden Werten (blaue Kästchen) vorgegeben. J-Express konstruierte unter diesen Voraussetzungen ein nur 54 Gene beinhaltendes Baumdiagramm:



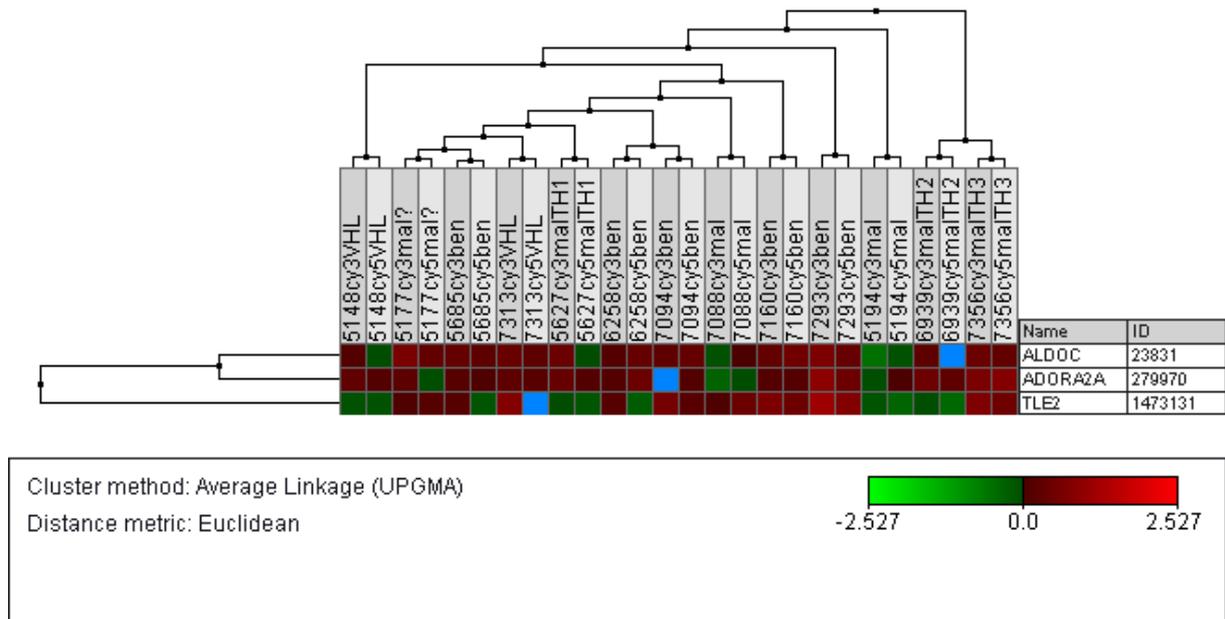


Abbildung 1: Gesamtbaumdiagramm 1 und Ausschnittvergrößerung

Im zweiten Beispiel (weniger strenge Bedingungen) wurde eine nur 1,5fach unterschiedliche Genexpression bei Akzeptanz von 60% fehlenden Werten vorgegeben. In diesem Fall konstruierte J-Express ein Baumdiagramm bestehend aus 1476 Genen.

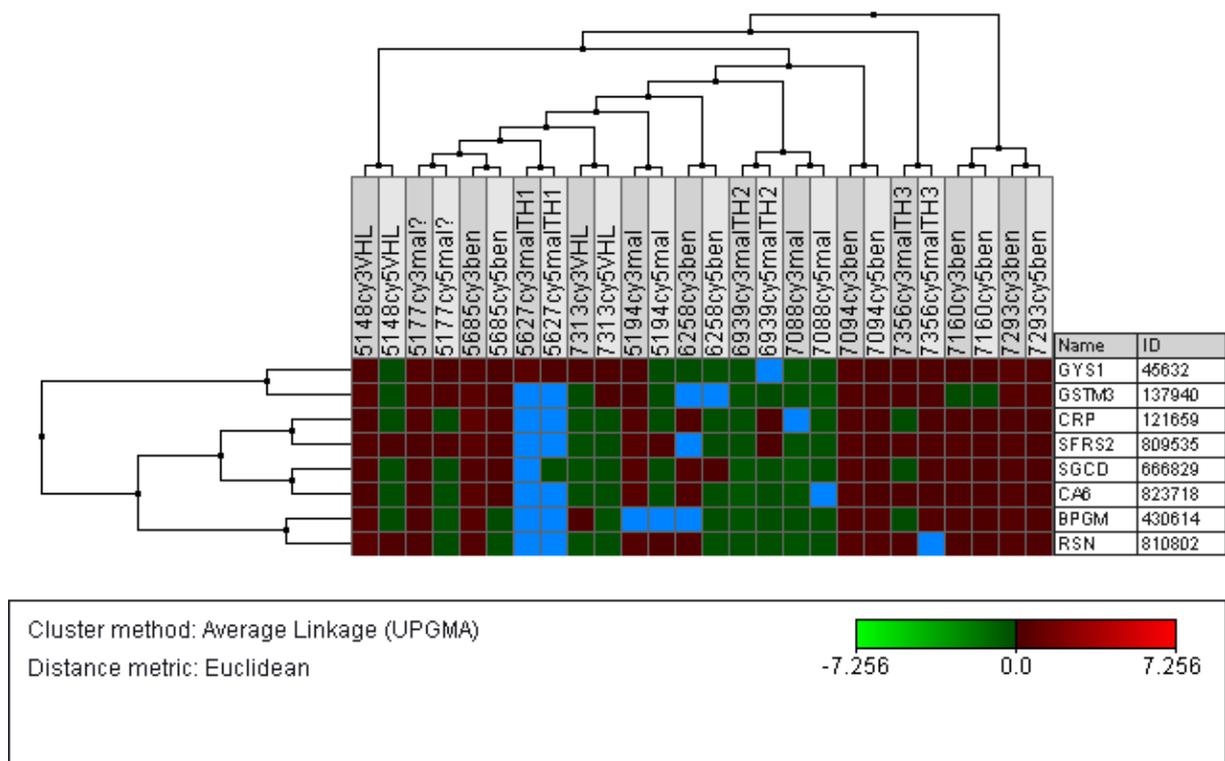


Abbildung 2: Ausschnittvergrößerung aus Baumdiagramm 2

Beiden Diagrammen (und allen, die in ihren Bedingungen dazwischen lagen) ist gemeinsam, dass sich korrespondierende Arrays jeweils nebeneinander zusammenlagern, was auch zu erwarten sein sollte, da bei Ihnen jeweils das gleiche Tumorgewebe (nur mit Farbwechsel) gegen das Normalgewebe gemessen wurde. Man kann darin einen Beweis für die Reproduzierbarkeit und Reliabilität der Untersuchung sehen. Eine stabile Zuordnung von bestimmten Tumorformen mittels des hierarchischen Clusters gelang aber nicht. Gut- und bösartige Tumoren lagerten sich nicht zusammen.

2) Suche nach signifikanten Genen

Die Suche nach signifikant unterschiedlich exprimierten Genen erfolgte mittels des Computerprogramms SAM Version 1.13 „*Significance Analysis of Microarrays*“.

Es handelt sich um ein Regressionsmodell bei dem der Zusammenhang zwischen einer oder mehreren Zielvariablen (*response*) und den sogenannten Erklärungsvariablen (*gene expression*) berechnet wird.

Die Zielvariable war in diesem Fall eine Gruppeneinteilung wie z.B. benigne oder maligne Tumoren. Erklärungsvariablen waren die ratio Werte, die sich durch die Normalisierung für jedes Gen ergeben hatten.

SAM berechnet durch multiple Permutationen für jedes Gen i einen Parameter d_i , den standardisierten Regressionskoeffizienten, der die Stärke der Korrelation zwischen der Zielvariablen und der Expression des betreffenden Gens angibt. Dabei erfolgt entweder ein Vergleich zwischen einer Gruppe von Tumoren und dem gemeinsamen Vergleichsstandard (*one class response*) oder zwischen zwei verschiedenen Tumoruntergruppen, wie z.B. benigne versus maligne Tumoren (*two class response*).

Als Schwellenwert (*cutoff*) für die Signifikanz wählt der Benutzer einen Wert δ , bei dem das 90. Perzentil der Falsch-Positiv-Rate (*false detection rate*) minimal wird [26].

SAM stellt dabei jedes Gen graphisch als schwarzen Punkt mit den Koordinaten x (*observed* = beobachtet) und y (*expected* = erwartet) dar. Je stärker unterschiedlich

ein Gen zwischen den Vergleichsgruppen exprimiert wird, desto weiter außerhalb der blauen Geraden wird es angeordnet. *delta* bedeutet dabei graphisch die Breite eines Korridors zu beiden Seiten der blauen Geraden. Bei zunehmendem *delta*, d.h. breiterem Korridor, wird die Anzahl der außerhalb liegenden Gene, d.h. der als signifikant benannten Gene, kleiner.

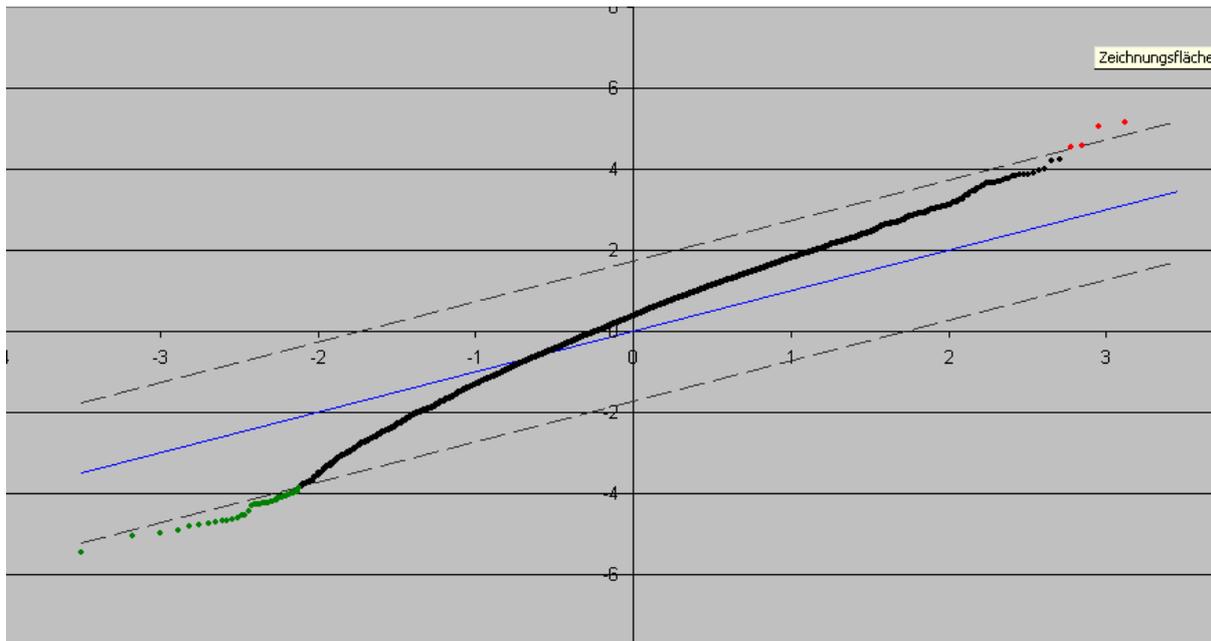


Abbildung 3: SAM-Plot für den Vergleich: alle Primärtumoren versus Standard (one class response). Die außerhalb des durch *delta* charakterisierten Korridors gelegenen Gene werden als signifikant unterschiedlich exprimiert bezeichnet (rot: stärkere Expression im Tumor; grün: schwächere Expression im Tumor).

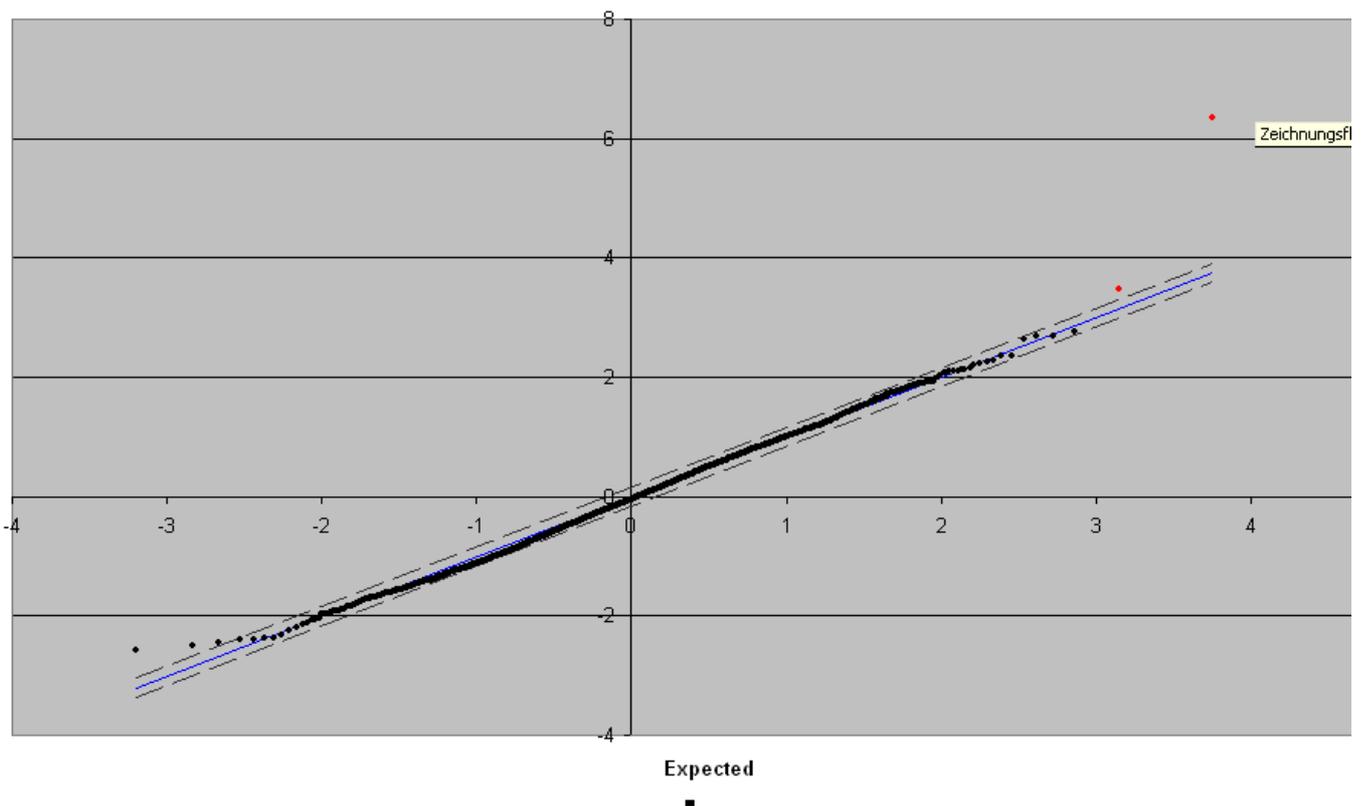
Für die Wahl von *delta* erhält der Benutzer für jeden Gruppenvergleich eine Signifikanztabelle für Delta (*Significance table for values of Delta*). In der Spalte „#of Genes Called“ wird eine Anzahl von Genen angegeben, die bei gegebenem *delta* signifikant unterschiedlich exprimiert sind (positiv und negativ). Bei zunehmendem *delta*, d.h. breiterem Korridor auf dem Graphen wird die Anzahl der genannten Gene kleiner. Gleichzeitig sinkt die prozentuale Wahrscheinlichkeit für falsch positiv genannte Gene in Absolutzahlen (*No. of Genes falsely called*) [Median und 90.Perzentile] und relativ (*FDR = False Discovery Rate*) [Median und 90.Perzentile]. Ab einem bestimmten Delta bleibt die absolute Anzahl von Genen, die falsch benannt sind, gleich und der relative Anteil (*FDR*) steigt wieder an.

Wir haben für unsere Auswertung denjenigen Wert für *delta* gewählt, bei dem die *FDR* in der 90. Perzentile minimal war.

Dargestellt werden positiv signifikante Gene und negativ signifikante Gene. Positiv signifikante Gene korrelieren positiv mit der sogenannten Zielvariablen. Für zwei Gruppen 1 und 2 bedeutet eine positive Korrelation, dass die betreffende Genexpression in 2 größer ist als in 1 (positiv signifikantes Gen). Umgekehrt bedeutet eine negative Korrelation, dass die Genexpression in 2 kleiner ist als in 1 (negativ signifikantes Gen).

Durch Delogarithmierung ergibt sich die ratio rot/grün, d.h. $cy5/cy3$. Ein Wert <1 bedeutet, dass $cy5$ stärker exprimiert ist. Bei der Fusion der korrespondierenden Arrays wird der Array beibehalten, bei dem der Tumor mit $cy5$ markiert ist, während der $cy3$ -markierte mit -1 multipliziert wurde. Das bedeutet, dass der $cy5$ -Wert für den Tumor steht. **Werte >1 bedeuten eine stärkere Expression im Tumor bei *one class response*.**

Für den Vergleich benigne versus maligne Tumoren ergab sich der folgende Graph in SAM (Abbildung 4):



Wir haben die folgenden Vergleichsgruppen gebildet:

1. Vergleich aller Primärtumoren versus Normalgewebe
2. Vergleich benigne Primärtumoren versus maligne Primärtumoren

Beim Vergleich aller Primärtumoren mit dem Standard (1.) wurden nur diejenigen Gene eingeschlossen, bei denen für wenigstens 5 von 11 Geweben Daten vorhanden waren. Es ergaben sich 5.673 Gene.

Beim Vergleich aller benignen Primärtumoren versus alle malignen Primärtumoren wurden alle Gene eingeschlossen, bei denen für wenigstens 4 von 11 Geweben Daten vorhanden waren. Es ergaben sich 5.150 Gene.

Vergleich aller Primärtumoren versus Normalgewebe

Der Vergleich aller Primärtumoren gegenüber dem Normalgewebe erbrachte 45 differentiell exprimierte Gene. Dabei waren 5 Gene im Tumorgewebe stärker exprimiert als im Normalgewebe, während 40 Gene im Tumorgewebe schwächer exprimiert waren als im Normalgewebe.

Vergleich benigne Primärtumoren versus maligne Primärtumoren

Um Unterschiede zwischen benignen und malignen Tumoren zu finden wurden 2 Gruppen gebildet:

Gruppe 1 (benigne):	5177, 5685, 6258, 7094, 7160, 7293, 5148, 7313
Gruppe 2 (maligne):	7088, 5194, 5627

Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Das einzige Gen, das, allerdings mit sehr schwacher Signifikanz, in den malignen Tumoren vermehrt exprimiert war, war das ***Stathmin 1***-Gen.

Das Stathmin 1-Gen liegt auf Chromosom 1p35.3. Die Funktion dieses auch als Oncoprotein 18 bekannten Proteins wird im Diskussionsteil dargestellt.

Gen Name	Gen ID	Name	Chromosom
CCNI	770888	Cyclin I	4q13.3
EIF4E	665774	Eukaryotic translation initiation factor 4E [ESTs, weakly similar to translation initiation factor eIF4E [Arabidopsis thaliana]]	4q21-q25
IDN3	626230	IDN3 protein	5p13.1
ATP6V1G1	950688	ATPase, H+-transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G isoform 1	9q33.1
PRKAR1A		protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)	17q23-q24
Gen Name	Gen ID	Name	Chromosom
NRAS	774478	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	1p13.2
FABP3	491559	fatty acid binding protein 3, muscle and heart (mammary-derived growth inhibitor)	1p33-p32
NUDC	384013	nuclear distribution gene C homolog (A.nidulans)	1p35-p34
DJ-1	2467229	RNA-binding protein regulatory subunit	1p36.33-p36.12
SSR2	2571913	signal sequence receptor, beta (translocon-associated protein beta)	1q21-q23
TIC	768264	SEC7 homolog	2q13
BIN1	788107	bridging integrator 1	2q14
UBE1L	250883	ubiquitin-activating enzyme E1-like	3p21
OSR1	200916	oxidative-stress responsive 1	3p22-p21.3
HCLS1	767183	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	3q13
MRPS18B	812988	mitochondrial ribosomal protein S18B	6p21.3
MSCP	814129	likely ortholog of mouse mitochondrial solute carrier protein	8p12
GPT	1456424	glutamic-pyruvate transaminase (alanine aminotransferase)	8q24.3
FBP1	433253	fructose-1,6-bisphosphatase 1	9q22.3
PILB	503215	pilin-like transcription factor	10p12
ATP5C1	845519	ATP synthase, H+-transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	10q22-23
SNCG		synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	10q23.2-q23.3
ABLIM1	753692	actin binding LIM protein 1	10q25
ECHS1	745542	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	10q26.2-q26.3
DNAJC4	782725	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4	11q13
DOC-1R	810429	tumor suppressor deleted in oral cancer-related 1	11q13
BAD	795729	BCL2-antagonist of cell death	11q13.1

Gen Name	Gen ID	Name	Chromosom
CD163	727292	CD163 antigen	12p13.3
NPC2	854644	Niemann-Pick disease, type C2	14q24.3
CIB1	841679	calcium and integrin binding 1 (calmyrin)	15q25.3-q26
APRT	897774	adenine phosphoribosyltransferase	16q24
TAF15	1474955	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68 kD	17q11.1-q11.2
STAT5A	2504881	signal transducer and activator of transcription 5A	17q11.2
DUSP14	565493	dual specificity phosphatase	17q12
KRT16	1486533	keratin 16 (focal non-epidermolytic palmoplantar keratoderma)	17q12-q21
IFI35	1422723	interferon-induced protein 35	17q21
PDK2	49860	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2	17q23.3
770588	770588	Homo sapiens, clone IMAGE:4477095, mRNA	19
APBA3	303196	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 3 (X11-like 2)	19p13.3
ECH1	769537	enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	19q13.1
TYROBP	148469	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	19q13.1
WISP2	2490795	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	20q12-q13.1
MRPL40	878525	mitochondrial ribosomal protein L40	22q11.21
TXN2	869442	thioredoxin 2	22q13.1
UXT	727305	ubiquitously-expressed transcript	Xp11.23-p11.22

Tabelle 1: 5 über- und 40 unterexprimierte Gene in Phäochromozytomen
Anordnung nach chromosomaler Lokalisation

<i>Gen Name</i>	<i>molekulare Funktion</i>	<i>biologischer Prozess</i>
CCNI	Cyclin	Regulatory subunit
EIF4E	Translation initiation factor 4E	
IDN3	Unknown	
ATP6V1G1	lysosomal H ⁺ transporting ATPase, membrane traffic	
PRKAR1A	cAMP-dependent protein kinase, regulator	

<i>Gen Name</i>	<i>molekulare Funktion</i>	<i>biologischer Prozess</i>
NRAS	GTPase	Oncogenesis, Regulation of cell cycle, Cell shape and cell size control
FABP3	Tumor suppressor, Lipid transporter, Fatty acid binding, Lipid binding	Negative regulation of cell proliferation, Lipid binding
NUDC	Cell cycle control	Cell proliferation, Regulation of cell cycle, Development
DJ-1	Oncogen	RAS protein signal transduction
SSR2	Signal sequence receptor	Co-translational membrane targeting
TIC	Unknown	
BIN1	Tumor suppressor	Cell proliferation, Regulation of cell cycle, Non-selective vesicle transport
UBE1L	Enzyme activator, Ubiquitin conjugating enzyme	Protein modification
OSR1	Protein serine/threonine kinase	Response to oxidative stress response, Protein amino acid phosphorylation
HCLS1	DNA binding, Transcription factor	Intracellular signalling cascade, Regulation of transcription, DANN-dependent
MRPS18B	protein synthesis in mitochondria	
MSCP	Unknown	
GPT	Transaminase	
FBP1	Fructose-2,6-bisphosphate 2-phosphatase	Fructose metabolism
PILB	Transcription factor	
ATP5C1	Hydrogen-transporting two-sector ATPase, Transporter	Energy pathways
SNCG		Oncogenesis, Signal transduction
ABLIM1	Actin binding	Histogenesis and organogenesis, Vision
ECHS1	Enoyl-CoA hydratase	Energy pathways, Fatty acid beta-oxidation

<i>Gen Name</i>	<i>molekulare Funktion</i>	<i>biologischer Prozess</i>
DNAJC4	Heat shock protein	
DOC-1R	Tumor suppressor	
BAD		Apoptotic program
CD163	Scavenger receptor	Antimicrobial humoral response
NPC2	lysosomal cholesterol binding glycoprotein	
CIB1	Protein binding, Cell adhesion molecule	Cell adhesion, Double-strand break repair
APRT	Adenin phosphoribosyltransferase	
TAF15	RNA polymerase II transcription factor, single-stranded DNA binding, Single stranded RNA binding	
STAT5A	Transcription factor	JAK-STAT cascade, immune response, Transcription regulation from Pol II promoter
DUSP14	unknown	
KRT16	Cytoskeletal structural protein	Cell shape and cell size control, cell proliferation, epidermal differentiation
IFI35	Transcription factor binding	
PK2	Protein kinase, Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) kinase	Glucose metabolism
770588	may be involved in transcriptional regulation	
APBA3	unknown	
ECH1	Enoyl-CoA hydratase	Energy pathways, Fatty acid beta-oxidation
TYROBP	Receptor signalling protein	Signal transduction, Cellular defense response, Intracellular signalling cascade
WISP2		Oncogenesis, Signal transduction, Cell-cell-signalling
MRPL40		Embryogenesis and Morphogenesis
TXN2	Thioredoxin	
UXT	androgen receptor coactivator (i.e. transcription factor)	

Tabelle 2: 5 über- und 40 unterexprimierte Gene in Phäochromozytomen
Molekulare Funktion und biologische Prozesse

Gen Name	Zellwachstum und - transformation, Zellzykluskontrolle und Apoptose	Zytokine, Proteinkinasen, Signal-Transduktion, Zelloberflächen-Rezeptoren und verwandte Proteine	Zelladhäsions-, Basalmembran- und extrazelluläre Matrixproteine
CCNI		XXX	
EIF4E		XXX	
IDN3			
ATP6V1G1			
PRKAR1A		XXX	
Gen Name	Zellwachstum und - transformation, Zellzykluskontrolle und Apoptose	Zytokine, Proteinkinasen, Signal-Transduktion, Zelloberflächen-Rezeptoren und verwandte Proteine	Zelladhäsions, Basalmembran und extrazelluläre Matrixproteine
NRAS	XXX		
FABP3	XXX		
NUDC	XXX		
DJ-1		XXX	
SSR2		XXX	
TIC			
BIN1	XXX		
UBE1L			
OSR1		XXX	
HCLS1		XXX	
MRPS18B			
MSCP			
GPT			
FBP1			
PILB		XXX	
ATP5C1			
SNCG		XXX	
ABLIM1	XXX		

Gen Name	Zellwachstum und -transformation, Zellzykluskontrolle und Apoptose	Zytokine, Proteinkinasen, Signal-Transduktion, Zelloberflächen-Rezeptoren und verwandte Proteine	Zelladhäsions, Basalmembran und extrazelluläre Matrixproteine
ECHS1			
DNAJC4			
DOC-1R	XXX		
BAD	XXX		
CD163			
NPC2			
CIB1			XXX
APRT			
TAF15		XXX	
STAT5A		XXX	
DUSP14			
KRT16	XXX		
IFI35		XXX	
PDK2		XXX	
770588		XXX	
APBA3			
ECH1			
TYROBP		XXX	
WISP2		XXX	
MRPL40	XXX		
TXN2			
UXT		XXX	

Tabelle 3: 5 über- und 40 unterexprimierte Gene in Phäochromozytomen
Zuordnung zu 3 Funktionsgruppen

Significance Table for values of Delta

Input Parameters

Imputation Engine	10-Nearest Neighbor Imputer
Data Type	One class Response
Number of Permutations	300
Blocked Permutation?	FALSCH
RNG Seed	1234567

Computed Quantities

Computed Exchangeability Factor S0	0,018730233
S0 percentile	0
Computed Pi0Hat	0,614936248

Significance Table

Delta	No. of Genes falsely called		# of Genes Called	FDR (%)	
	Median	90th percentile		Median	90th percentile
1,09165E-05	1914,604007	2142,499381	4077	46,96109903	52,55088008
2,69158E-05	1914,604007	2142,499381	4077	46,96109903	52,55088008
5,17564E-05	1914,604007	2142,499381	4077	46,96109903	52,55088008
0,000134503	1914,604007	2142,499381	4077	46,96109903	52,55088008
0,000256324	1914,604007	2142,499381	4077	46,96109903	52,55088008
0,000374157	1914,604007	2142,499381	4077	46,96109903	52,55088008
0,000666764	1914,604007	2142,499381	4077	46,96109903	52,55088008
0,000881467	1905,379964	2135,673588	4063	46,89588884	52,56395738
0,004772041	1888,776685	2124,66623	4044	46,70565492	52,53872971
0,006077497	1884,164663	2122,944408	4040	46,63773918	52,54812891
0,007374513	1876,170492	2115,073224	4031	46,54354978	52,47018665
0,009377169	1873,095811	2112,982441	4030	46,47880423	52,43132607
0,009841541	1871,251002	2109,90776	4027	46,46761862	52,39403426
0,012126856	1855,570128	2091,890128	4010	46,27356926	52,1668361
0,014572025	1850,343169	2083,526995	4003	46,2239113	52,04913801
0,016260266	1840,811658	2072,458142	3991	46,1240706	51,92829221
0,017618662	1840,811658	2072,458142	3991	46,1240706	51,92829221
0,019915622	1822,056102	2056,4698	3969	45,90718322	51,81329805
0,023256187	1810,98725	2046,077377	3959	45,74355265	51,68167156
0,028601202	1798,995993	2035,43898	3949	45,55573544	51,54314966
0,031298075	1791,924226	2028,859162	3945	45,42266732	51,42862261
0,036132128	1783,315118	2022,586812	3937	45,2962946	51,37380778
0,041533274	1770,708925	2015,392058	3923	45,13660274	51,37374607
0,04676166	1757,487796	2005,491585	3915	44,89113144	51,22583869
0,051066266	1750,723497	1993,992277	3908	44,79845182	51,02334383
0,056261009	1739,039709	1975,482696	3898	44,61364055	50,67939189
0,061467594	1723,97377	1959,617341	3879	44,44376825	50,51862183
0,068581597	1708,600364	1948,486995	3870	44,14988021	50,34850115
0,072838886	1696,916576	1942,952568	3859	43,97296127	50,34860244
0,07871128	1680,620765	1931,699235	3841	43,75477128	50,29157081
0,083100354	1660,635337	1913,558616	3817	43,50629649	50,13252857
0,091476931	1648,951548	1896,770856	3796	43,43918726	49,96762002
0,098356685	1632,655738	1877,215883	3776	43,23770492	49,71440369
0,112380639	1612,67031	1855,877596	3765	42,83320876	49,29289763

0,1227302	1597,296903	1838,659381	3753	42,56053566	48,99172344
0,128669324	1578,541348	1819,596357	3725	42,37694894	48,84822435
0,136381785	1560,400729	1800,717814	3706	42,10471475	48,58925565
0,144236261	1540,722769	1782,761676	3680	41,86746654	48,44461075
0,164774145	1514,587978	1761,79235	3663	41,34829315	48,09697924
0,180510143	1488,453188	1742,175883	3641	40,88034023	47,84882954
0,195392952	1467,237887	1724,957668	3619	40,54263297	47,66393115
0,200788228	1451,864481	1708,661858	3595	40,38566011	47,52884167
0,218095051	1426,344627	1684,986812	3568	39,97602653	47,22496671
0,228744425	1406,666667	1663,033588	3541	39,72512473	46,96508298
0,23918913	1387,911111	1645,569399	3514	39,49661671	46,82895273
0,257298009	1358,701639	1622,447796	3464	39,22348843	46,83740751
0,283540475	1328,262295	1589,241239	3425	38,78138088	46,40120405
0,308575395	1300,282696	1555,235264	3386	38,40173349	45,93134271
0,336494301	1275,992714	1537,894062	3345	38,14626948	45,97590619
0,378711898	1234,177049	1498,107687	3286	37,55864422	45,59061737
0,484520663	811,1009107	1074,72408	2747	29,52678962	39,12355588
0,570966818	487,6444444	725,2558106	2199	22,17573645	32,98116465
0,61056256	385,2575592	594,0284153	1984	19,41822375	29,94094835
0,633333332	320,0743169	515,5010565	1811	17,67389933	28,46499484
0,657933168	267,8047359	449,3954098	1674	15,99789342	26,84560393
0,671717798	239,2102004	419,6939891	1589	15,0541347	26,41245998
0,687056766	198,0094718	357,2779599	1447	13,68413765	24,69094402
0,709200373	166,340255	302,1796721	1347	12,34894247	22,43353171
0,722106325	149,1220401	277,951184	1276	11,68668026	21,78300815
0,734207176	126,3693989	239,3946812	1176	10,74569719	20,35669058
0,755071489	109,4586521	206,6800729	1098	9,968911848	18,82332175
0,764100092	98,69726776	190,8762113	1035	9,535967899	18,44214602
0,784510103	83,01639344	166,7707104	963	8,620601604	17,31783078
0,799585737	73,4848816	153,3036066	920	7,987487131	16,6634355
0,809874514	63,95336976	135,9624044	848	7,541670963	16,0333024
0,820962898	55,65173042	120,5275046	785	7,08939241	15,35382224
0,830394329	50,11730419	110,8115118	747	6,7091438	14,83420507
0,840850093	42,12313297	95,93005464	683	6,167369395	14,04539599
0,847192214	40,58579235	92,30193078	669	6,066635628	13,79700012
0,863338612	31,97668488	75,63715847	593	5,392358327	12,75500143
0,889166439	27,0571949	66,536102	554	4,883970199	12,01012672
0,89323852	24,90491803	60,3252459	514	4,845314792	11,73642916
0,900539024	23,36757741	56,75861566	500	4,673515483	11,35172313
0,904902198	20,90783242	48,64145719	452	4,625626642	10,76138434
0,932923908	15,98834244	38,74098361	402	3,977199612	9,637060599
0,942472719	14,1435337	35,72779599	384	3,6832119	9,30411354
0,971666541	11,06885246	27,67213115	338	3,27480842	8,18702105
1,009448272	8,609107468	22,93712204	310	2,777131441	7,399071626
1,02078435	8,609107468	20,53887067	296	2,908482253	6,93880766
1,028515987	7,99417122	20,3543898	291	2,747137876	6,99463567
1,064206841	5,53442623	14,20502732	230	2,406272274	6,176098836
1,083826278	4,919489982	12,9136612	219	2,246342457	5,896648951
1,100533724	3,689617486	10,51540984	185	1,99438783	5,684005317
1,116797876	3,074681239	9,285537341	179	1,717699016	5,187451028
1,151995102	2,459744991	7,440728597	145	1,696375856	5,131536964
1,212260471	1,844808743	5,53442623	129	1,430084297	4,290252891

1,288924465	1,229872495	4,304553734	111	1,107993239	3,877976337
1,362962007	0,614936248	3,074681239	97	0,633954895	3,169774473
1,392015535	0,614936248	3,074681239	95	0,647301313	3,236506567
1,487178338	0,614936248	1,844808743	68	0,904318011	2,712954034
1,620764538	0,614936248	1,229872495	56	1,098100442	2,196200885
1,721472643	0,614936248	0,614936248	45	1,366524995	1,366524995
1,844129347	0,614936248	0,614936248	36	1,708156244	1,708156244
1,886288588	0,614936248	0,614936248	32	1,921675774	1,921675774
1,909534907	0,614936248	0,614936248	27	2,277541658	2,277541658
1,993174307	0,614936248	0,614936248	17	3,617272045	3,617272045
2,050775874	0,614936248	0,614936248	17	3,617272045	3,617272045
2,08893807	0,614936248	0,614936248	15	4,099574985	4,099574985
2,106647644	0,614936248	0,614936248	12	5,124468731	5,124468731
2,528446918	0,614936248	0,614936248	1	61,49362477	61,49362477
3,03450726	0,614936248	0,614936248	ONA	NA	

Tabelle: Signifikanztabelle für *delta*-Werte für den **Vergleich alle Tumoren versus Normalgewebe**. Rot markierte Zeile: akzeptierte Gene mit minimaler Absolutzahl falsch positiv genannter Gene (Spalte 3) und minimaler prozentualer Falschdetektionsrate (Spalte 6) in der 90. Perzentile.

Von 45 als signifikant unterschiedlich exprimiert genannten Genen sind nur 0,61 Gene (1,36 %) fälschlich benannt.

Auflistung der betreffenden Gene in der folgenden Tabelle:

Rote beschriftete Gene sind im Tumor überexprimiert.

Grün beschriftete Gene sind im Tumor unterexprimiert.

Die Bezeichnung der Gene und ihrer Funktion erfolgte gemäß Internet-Recherche

<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/SMD/source/sourceSearch>

Significant Genes List

Input Parameters

Imputation Engine	10-Nearest Neighbor Imputer
Data Type	One class Response
Number of Permutations	300
Blocked Permutation?	FALSCH
RNG Seed	1234567
Delta	1,72147
(Upper Cutoff, Lower Cutoff)	(4,52690, -3,85340)

Computed Quantities

Computed Exchangeability Factor S0	0,018730233
S0 percentile	0
False Significant Number (Median, 90 percentile)	(0,61494, 0,61494)
False Discovery Rate (Median, 90 percentile)	(1,36652, 1,36652)
Pi0Hat	0,61494

5 Positive Significant Genes

Row	Gene Name	Gene ID	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	q-value (%)
913	ATP6J	950688	6,493425694	0,495630246	0,076328008	0,6339549
1178	IDN3	626230	5,137952837	0,430903089	0,083866688	0,6339549
436665774		665774	5,061644698	0,335712662	0,066324818	0,6339549
1258	PRKAR1A	854760	4,582269212	0,5467929	0,119327974	0,6339549
1765	CCNI	770888	4,526897012	0,429587776	0,094896742	0,6339549

40 Negative Significant Genes

Row	Gene Name	Gene ID	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	q-value (%)
892	APRT	897774	-5,443016946	-0,551408121	0,101305604	0,6339549
622	DNAJC4	782725	-5,052464401	-0,498812829	0,098726639	0,6339549
959	KRT16	1486533	-4,992389676	-0,566725075	0,113517796	0,6339549
821	ATP5C1	845519	-4,901117442	-1,05347779	0,214946449	0,6339549
844	TXN2	869442	-4,81229097	-0,726914121	0,151053651	0,6339549
1845	DOC-1R	810429	-4,776022627	-0,482579864	0,101042206	0,6339549

209UBE1L	250883	-4,752630338	-0,324124439	0,068198959	0,6339549
1030DJ-1	2467229	-4,715060211	-0,66793885	0,141660725	0,6339549
1285IFI35	1422723	-4,694668954	-0,473141342	0,100782685	0,6339549
2391STAT5A	2504881	-4,678923372	-0,580899273	0,124152337	0,6339549
3319NPC2	854644	-4,650831773	-0,715875124	0,153924106	0,6339549
342FBP1	433253	-4,607441254	-0,457700096	0,099339323	0,6339549
4363TAF15	1474955	-4,530086506	-0,660647581	0,145835533	0,6339549
1797BIN1	788107	-4,529991933	-0,707219258	0,156119319	0,6339549
1808BAD	795729	-4,427265884	-0,386768288	0,087360529	0,6339549
806SIP2-28	841679	-4,321282697	-0,675131292	0,156234003	0,6339549
1661565493	565493	-4,273824622	-0,487975367	0,114177677	0,6339549
949GPT	1456424	-4,269978608	-0,320207008	0,074990307	0,6339549
4954SNCG	771303	-4,267048114	-1,277680554	0,29942961	0,6339549
3300ECHS1	745542	-4,24633183	-0,387651041	0,091290803	0,6339549
1336770588	770588	-4,242986414	-0,238981555	0,056323903	0,6339549
3521HCLS1	767183	-4,221865658	-0,423566127	0,100326766	0,6339549
395PILB	503215	-4,20846626	-0,321422854	0,076375295	0,6339549
5202NRAS	774478	-4,193131417	-0,16292956	0,038856297	0,6339549
4776ECH1	769537	-4,178799164	-0,698824188	0,167230862	0,6339549
2653FABP3	491559	-4,156052523	-0,503414856	0,121128127	0,6339549
1551APBA3	303196	-4,113154019	-0,228415817	0,055533008	0,6339549
570TIC	768264	-4,113151276	-0,286276722	0,069600339	0,6339549
481CD163	727292	-4,109905603	-0,618075177	0,150386709	0,6339549
1708UXT	727305	-4,083911872	-0,393891096	0,09644946	0,6339549
857NLVCF	878525	-4,069071363	-0,448737553	0,110280089	0,6339549
3023NUDC	384013	-4,038013468	-0,520426833	0,128881896	0,6339549
152OSR1	200916	-4,036553557	-0,378311689	0,093721459	0,6339549
4694TYROBP	148469	-4,009243615	-0,533581307	0,133087774	0,6339549
721MRPS18B	812988	-3,993695668	-0,276389613	0,069206478	0,6339549
738LOC51312	814129	-3,987623034	-0,430358044	0,107923452	0,6339549
2711ABLIM	753692	-3,963742912	-0,728748739	0,183853685	0,6339549
2090SSR2	2571913	-3,961678256	-0,569993225	0,143876708	0,6339549
1380PDK2	49860	-3,950465641	-0,50505859	0,127847863	0,6339549
2081WISP2	2490795	-3,853396528	-0,447824254	0,116215461	0,6339549

Significance Table for values of Delta

Input Parameters

Imputation Engine	10-Nearest Neighbor Imputer
Data Type	Two Class, unpaired data
Data in log scale?	WAHR
Number of Permutations	300
Blocked Permutation?	FALSCH
Fold Change	
RNG Seed	1234567

Computed Quantities

Computed Exchangeability Factor S0	0,085575102
S0 percentile	0,05
Computed Pi0Hat	0,979023444

Significance Table

Delta	No. of Genes falsely called		# of Genes Called	FDR (%)	
	Median	90th percentile		Median	90th percentile
0,000221572	2522,943416	2856,594606	2866	88,03012618	99,67182854
0,000577593	2522,943416	2856,594606	2866	88,03012618	99,67182854
0,002368293	2518,537811	2855,419778	2863	87,96848797	99,73523499
0,003590313	2518,537811	2855,419778	2863	87,96848797	99,73523499
0,008084715	2518,537811	2855,419778	2863	87,96848797	99,73523499
0,010535851	2518,537811	2855,419778	2863	87,96848797	99,73523499
0,012754516	2516,579764	2854,440754	2862	87,93080936	99,73587542
0,014673098	2516,579764	2854,440754	2862	87,93080936	99,73587542
0,016073146	2516,579764	2854,440754	2862	87,93080936	99,73587542
0,018611842	2516,579764	2854,440754	2862	87,93080936	99,73587542
0,020436447	2516,579764	2854,440754	2862	87,93080936	99,73587542
0,024356866	2516,579764	2854,440754	2862	87,93080936	99,73587542
0,027128056	2516,579764	2854,440754	2862	87,93080936	99,73587542
0,031470702	2516,579764	2854,440754	2862	87,93080936	99,73587542
0,03540136	2516,579764	2854,440754	2862	87,93080936	99,73587542
0,050398111	2516,579764	2854,440754	2862	87,93080936	99,73587542
0,062589575	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,070287649	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,077461312	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,079002169	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,079740935	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,08032426	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,080810439	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,081029973	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,081389456	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,081628506	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,081862986	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,082109309	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,08232705	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,082548369	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,082844144	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,083144606	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825

0,083452312	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,083710459	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,083999701	2514,132205	2853,559633	2861	87,87599459	99,73993825
0,084320448	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,084736741	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,085301128	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,085798697	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,086194481	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,086504622	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,08687203	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,087198471	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,087605284	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,088040563	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,088460202	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,088939364	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,089429261	2510,705623	2851,601586	2858	87,84834231	99,77612269
0,089912023	2508,747576	2849,64354	2857	87,8105557	99,74251101
0,090496073	2462,243963	2798,440613	2803	87,8431667	99,83733905
0,092013972	2122,522827	2456,565627	2451	86,59823857	100,2270758
0,093706343	2102,942359	2432,873259	2433	86,434129	99,99479076
0,09478214	1476,856866	1778,200282	1789	82,55208864	99,39632655
0,09643366	1427,905694	1732,871497	1744	81,87532647	99,36189774
0,098135002	1396,576943	1703,500793	1712	81,57575604	99,50355101
0,100798459	1376,996475	1681,962277	1698	81,09519874	99,05549337
0,102734484	1366,716728	1673,248969	1692	80,77522035	98,89178303
0,103771191	1365,737705	1671,388824	1691	80,76509195	98,84026164
0,104446638	1354,478935	1662,87132	1683	80,48003181	98,80400002
0,105562658	1316,786533	1626,745355	1644	80,09650442	98,95044474
0,107908195	1135,667195	1432,311299	1454	78,10640959	98,50834244
0,108914468	1116,576238	1415,667901	1439	77,5939012	98,37858934
0,110516523	1035,806804	1326,968377	1343	77,12634432	98,80628269
0,112362086	1027,974617	1320,311017	1338	76,82919407	98,67795345
0,114279299	1003,49903	1288,29695	1308	76,72010937	98,49365065
0,115020198	990,7717257	1282,129103	1300	76,21320967	98,6253156
0,11580157	978,0444209	1266,073118	1282	76,29051645	98,75765353
0,116215493	960,4219989	1239,149974	1257	76,40588695	98,57995016
0,11658287	942,7995769	1215,457606	1236	76,27828292	98,33799403
0,11694524	942,7995769	1215,457606	1236	76,27828292	98,33799403
0,11731296	931,0512956	1195,58343	1217	76,50380408	98,24021613
0,117625924	924,1981315	1187,849145	1211	76,31693902	98,08828613
0,118113758	924,1981315	1187,849145	1211	76,31693902	98,08828613
0,118520451	896,2959633	1162,394536	1177	76,15088898	98,75909393
0,11884361	896,2959633	1162,394536	1177	76,15088898	98,75909393
0,119172376	896,2959633	1162,394536	1177	76,15088898	98,75909393
0,119459226	890,9113344	1159,163758	1171	76,08124119	98,98921931
0,119686804	885,5267054	1154,268641	1169	75,75078746	98,73983241
0,119935911	885,5267054	1154,268641	1169	75,75078746	98,73983241
0,120145452	885,5267054	1154,268641	1169	75,75078746	98,73983241
0,120356823	885,5267054	1154,268641	1169	75,75078746	98,73983241
0,120580583	885,5267054	1154,268641	1169	75,75078746	98,73983241
0,120744285	885,5267054	1154,268641	1169	75,75078746	98,73983241
0,120951097	885,5267054	1154,268641	1169	75,75078746	98,73983241

0,121263794	885,5267054	1154,268641	1169	75,75078746	98,73983241
0,121569339	885,5267054	1154,268641	1169	75,75078746	98,73983241
0,121901747	840,9811387	1090,632117	1106	76,03807764	98,61049883
0,122344246	832,1699277	1078,883836	1096	75,92791311	98,43830618
0,12292415	824,3377402	1067,135554	1090	75,62731561	97,90234444
0,123735391	824,3377402	1067,135554	1090	75,62731561	97,90234444
0,131663596	3,916093778	14,78325401	9	43,51215308	164,2583779
0,143148195	3,916093778	14,78325401	9	43,51215308	164,2583779
0,149456909	3,916093778	14,78325401	9	43,51215308	164,2583779
0,158527978	3,916093778	14,78325401	9	43,51215308	164,2583779
0,163895997	3,916093778	14,78325401	9	43,51215308	164,2583779
0,168989739	3,916093778	14,78325401	9	43,51215308	164,2583779
0,171327335	3,916093778	14,78325401	9	43,51215308	164,2583779
0,17624069	3,916093778	14,78325401	9	43,51215308	164,2583779
0,360517899	0,979023444	2,937070333	2	48,95117222	146,8535167
1,093788278	0,979023444	0,979023444	1	97,90234444	97,90234444
1,68574582	0,979023444	0,979023444	ONA	NA	

Tabelle: Signifikanztabelle für *delta*-Werte für den **Vergleich maligne versus benigne Phäochromozytome**.

Die Tabelle zeigt keine akzeptablen Signifikanzunterschiede. Selbst wenn man nur ein einzelnes Gen (*Stathmin*) akzeptiert, ist dies zu 97,9 % falsch positiv (siehe rot markierte Zeile).

Significant Genes List

Input Parameters

Imputation Engine	10-Nearest Neighbor Imputer
Data Type	Two Class, unpaired data
Data in log scale?	WAHR
Number of Permutations	300
Blocked Permutation?	FALSCH
RNG Seed	1234567
(Delta, Fold Change)	(1,09379,)
(Upper Cutoff, Lower Cutoff)	(5,28740, -∞)

Computed Quantities

Computed Exchangeability Factor S0	0,085575102
S0 percentile	0,05
False Significant Number (Median, 90 percentile)	(0,97902, 0,97902)
False Discovery Rate (Median, 90 percentile)	(97,90234, 97,90234)
Pi0Hat	0,97902

1 Positive Significant Genes

Row	Gene Name	Gene ID	Score(d)	Numerator(r)	Denominator(s+s0)	Fold Change	q-value (%)
2386	STMN1	1476065	5,287403924	1,877369229	0,355064462	3,53567	43,51215308

3) RT-PCR

Trotz sehr schwacher Signifikanz war das **Stathmin-Gen** doch so interessant, dass es für eine nachfolgende erste Verifizierungsuntersuchung mittels semiquantitativer **RT-PCR** herangezogen wurde.

In ersten Schritt wurde aus 1 µg totaler RNA mittels unspezifischer sogenannter *random primer* pd(N)₆ cDNA hergestellt. Dies erfolgte gemäß den Anleitungen *First-strand cDNA Synthesis Kit* (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited), Seite 9.

Im zweiten Schritt wurde eine PCR mit spezifischen Stathmin-Primern durchgeführt.

Die Primersequenz lautete:

Forward primer: 5`-CAG AAT ACA CTG CCT ATC GCT TGT C-3`

Reverse primer 5`-TTT CTC AGC CAG CTG CTT CAA GAC C-3`

Die Primer wurden geordert bei der Firma *Thermo Biosciences GmbH*, 89077 Ulm, Deutschland.

Die PCR-Bedingungen sind im Folgenden dargestellt:

2 min 95 Grad Celsius zur Denaturierung des Enzyms

gefolgt von 32 Zyklen bei 95, 50 und 27 Grad Celsius für jeweils 20 sec.

32 Zyklen wurden gewählt, nachdem in Experimenten mit unterschiedlichen Zykluszahlen zwischen 26 und 36 Zyklen die Linearität der Produktquantität gesichert worden war, d.h. in diesem Bereich war das genetische Material limitierend für die Produktmenge und nicht die Enzymmenge.

Es entstanden PCR-Produkte mit einer Länge von 261 Basenpaaren. Um die Authentizität der PCR-Produkte zu kontrollieren wurden diese aus dem Gel extrahiert und mit den Restriktionsenzymen ECOR I und ECOR V behandelt. Es entstanden zwei Produkte mit dem erwarteten Länge of 136 and 125 Basenpaaren durch ECOR I, bzw. 212 und 49 Basenpaaren durch ECOR V.

Es erfolgte eine PCR aller Tumorproben und zweier normaler Nebennierenmarkproben. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1.5% Agarose Gel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt.

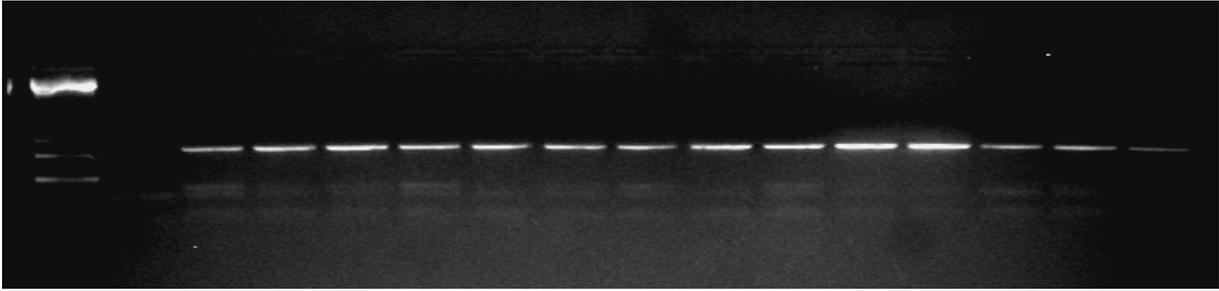


Abbildung 5: PCR-Produkte der Stathmin-Primer

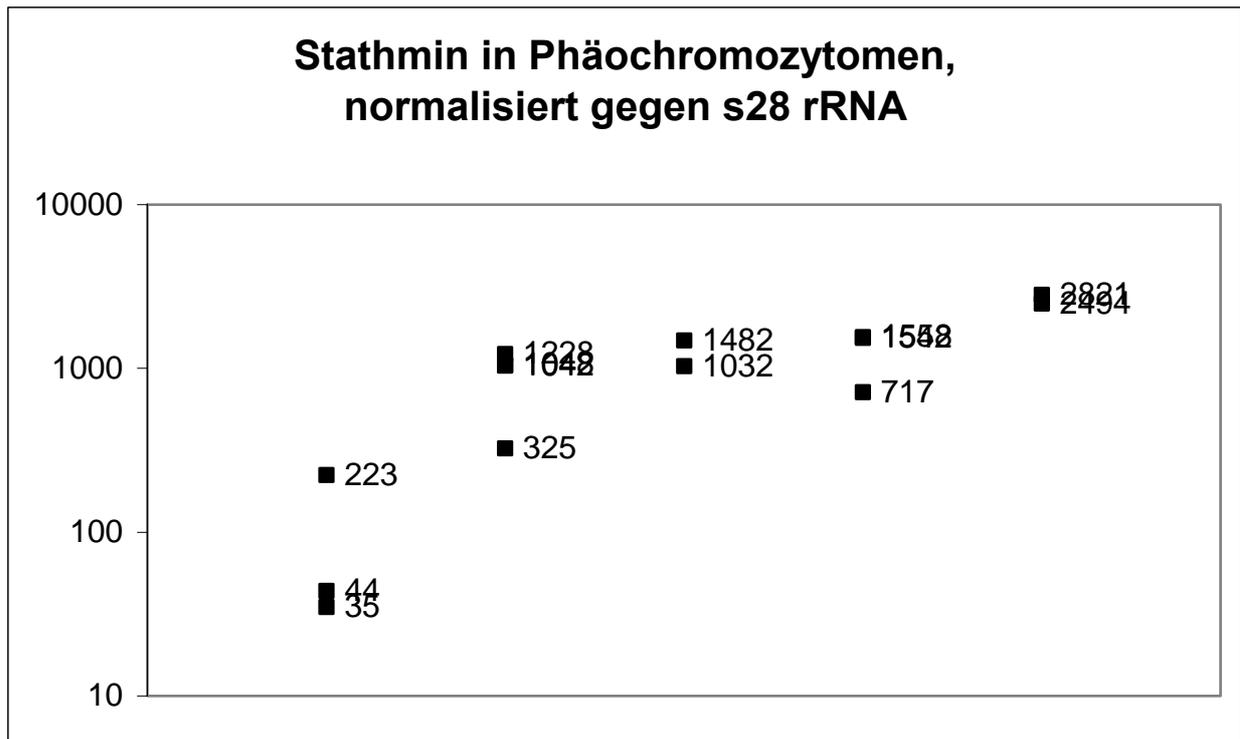
Die Intensität der daraus entstandenen Banden wurde mittels BioRad Device gemessen (*molecular analyst software*®).

Zum Vergleich wurde eine PCR mit nicht translaterter 28S r(ribosomal)RNA aus jeder Probe durchgeführt und die Intensität in gleicher Weise gemessen.



Abbildung 6: PCR-Produkte der S28-rRNA-Primer

Die für Stathmin gemessenen Werte wurden gegen die S28-Werte normalisiert.



normal	benigne	unklar	maligne	Metastasen
44 (NNM1)	325 (5685)	1482 (7094)	717 (7088)	2821 (Met1)
223 (NNM2)	1048 (6258)	1032 (5177)	1558 (5194)	2494 (Met2)
35 (NNM2)	1042 (7160)		1542 (5627)	
	1228 (7293)			

Diagramm und Tabelle: Aufteilung der Gewebe in 5 Gruppen:

1. Spalte: normales Nebennierenmarkgewebe (NNM1 und NNM2)
2. Spalte: benigne Tumoren (Tumoren 5685, 6258, 7160 und 7293)
3. Spalte: unklare Tumoren, Dignität zweifelhaft (Tumoren 7094 und 5177)
4. Spalte: maligne Tumoren (Tumoren 7088, 5194 und 5627)
5. Spalte: Metastasen von Gewebe Nr. 5627

Gewebe NNM1 war für die Arrayuntersuchungen verwendet worden. Bei NNM2 handelte es sich um normales Nebennierenmarkgewebe eines weiteren Patienten, das hier zur Kontrolle herangezogen wurde (siehe Material und Methoden).

Die im Diagramm und in der Tabelle angegebenen Werte sind relativ. Das bedeutet verglichen mit einem Wert von 44 für das Normalgewebe *NNM1* hat z.B. der Tumor mit der Nummer 7293 eine fast 28fach erhöhte *Stathmin*expression (1228 geteilt durch 44). In der Metastase Met1 ist die Expression 64mal höher als im Normalgewebe (2821 geteilt durch 44).

Es ist ersichtlich, dass die *Stathmin*expression in allen Tumoren höher ist, als in den beiden Normalgeweben. Bei der kleinen Anzahl der Tumoren und der Tatsache, dass die beiden Metastasen zwar von verschiedenen Zeitpunkten aber vom gleichen Patienten stammten, ist ein signifikanter Unterschied nicht zu berechnen.

Diskussion

1) Darstellung und Begründung der Patientenauswahl

In der vorliegenden Arbeit wurden 13 Tumorgewebe von 11 Phäochromozytom-Patienten mittels der DNA-Microarray-Technologie untersucht.

In allen Fällen wurden die Tumoren klinisch, biochemisch und histologisch gesichert. Die Auswahl der Patienten deckt das breite Spektrum ab, das diese Tumoren auszeichnet. Eingeschlossen wurden Patienten beiderlei Geschlechts mit einer weiten Altersverteilung zwischen 22 und 63 Jahren. Eingeschlossen wurden syndromische Tumoren nicht-verwandter Patienten und sporadische Tumoren ohne anamnestischen oder klinischen Anhalt für Heredität.

Die Operationen erfolgten in einem auf endokrine Chirurgie spezialisierten Zentrum. In allen Fällen wurde im Ersteingriff eine Adrenalectomie durchgeführt. Der jeweilige Zugangsweg zur Nebenniere reflektiert dabei die Hinwendung von den sogenannten konventionellen zu den endoskopischen, in diesem Fall laparoskopischen Verfahren. Aufbewahrung und wissenschaftliche Aufarbeitung des Gewebes erfolgte gemäß den Richtlinien der Universität Uppsala.

Nicht der in der in der Literatur angegebenen Verteilung entspricht in unserer Auswahl das Verhältnis benigner zu malignen Tumoren. Während üblicherweise 9 benigne Phäochromozytome auf 1 malignes gezählt werden, war die Verteilung in unserer Studie 8 zu 3. Diese Verteilung war beabsichtigt und entsprang dem Wunsch, nicht nur Unterschiede zwischen Phäochromozytomen generell und Normalgewebe darzustellen, sondern auch möglichst Unterschiede zwischen benignen und malignen Formen aufzudecken. Allerdings erfüllte in unserer Untersuchung nur ein einziger Tumor (**5627**) das Malignitätskriterium der Lymphknotenmetastasierung. Idealerweise wären weitere derartige Tumoren in die Studie einbezogen worden. Hierzu geeignetes Gewebe war allerdings weder an der Universität Uppsala noch an der Universität Düsseldorf verfügbar.

Die pathohistologische Aufarbeitung der Präparate erfolgte in allen Fällen durch einen auf dem Gebiet der Endokrin-Pathologie äußerst erfahrenen Pathologen (Prof. Lars Grimelius). Die aus der Literatur bekannten Schwierigkeiten bei der Dignitätsbeurteilung von Phäochromozytomen finden sich in seiner Beurteilung der

Primärpräparate und auch der Präparate aus Rezidiveingriffen wieder. Bei 6 Tumoren fanden sich keine Malignitätshinweise, sie wurden als benigne eingestuft. Eine Beurteilung die durch ein unauffälliges Follow up nachträglich bestätigt wird. Bei 5 Tumoren ergaben sich ungewöhnliche Befunde. Zwei dieser Tumoren sind im weiteren Verlauf nicht rezidiert. Bei den anderen 3 Tumoren entwickelten sich in der Folge jeweils hormonaktive Lokalrezidive und in einem Fall auch multiple Lymphknotenmetastasen.

Aus der für die Anwendung der Microarray-Technologie notwendigen Wahl eines geeigneten Vergleichsstandards ergeben sich bei unserer Untersuchung besondere Schwierigkeiten. Während bei Leukämie-Studien in der Hämato-Onkologie Normalgewebe aus peripheren Leukozyten praktisch unbegrenzt generiert werden kann, steht insbesondere dem endokrinen Chirurgen gleiches nicht zur Verfügung. Ein vom Pathologen diagnostiziertes, bei einer Schilddrüsenoperation akzidentell entferntes normales Epithelkörperchen ist wegen seiner Paraffinfixierung für eine Arrayuntersuchung nicht mehr geeignet. Eine absichtliche Resektion oder Biopsie einer Nebenschilddrüse oder Nebenniere bei einem Gesunden zum Zwecke der Standardbildung wäre aber unethisch. Bei der Arrayuntersuchung gastrointestinaler Karzinoide oder Inselzelltumoren des Pankreas ist repräsentatives Normalgewebe, d.h. die einzelne neuroendokrine Zelle bzw. Insel, schon theoretisch kaum verfügbar. Der in unserer Studie gewählte Standard bestand aus der RNA einer einzelnen normalen Nebenniere. Alternativ hierzu wäre auch ein Pool aus dem normalem Nebennierenmark mehrerer Patienten möglich und denkbar gewesen. Die Bildung eines solchen Pools hat grundsätzlich immer den Vorteil, dass innerhalb des Pools die Genexpression mehrerer Gewebe gemittelt ist und somit nicht von einer einzelnen Probe abhängt, deren Qualität oder besser gesagt „Normalität“ ja kaum vorab überprüfbar ist. Andererseits ist eine Poolbildung auch wesentlich aufwändiger und hinsichtlich des Materialverbrauchs ungleich teurer als die Verwendung einer Einzelprobe. Im Falle einer Versuchswiederholung oder Einbeziehung weiterer Tumorproben muss nämlich dann auch der identische Vergleichspool wiederhergestellt werden. Hierbei muss jede im Pool enthaltene RNA-Probe einzeln in cDNA umgesetzt werden. Somit ist auch die Reproduzierbarkeit eines Pools grundsätzlich schwieriger als die einer Einzelprobe. Aus ganz praktischen Gesichtspunkten muss hinzugefügt werden, dass es auch an einer Universitätsklinik nicht sehr viele

Patienten gibt, bei denen es gerechtfertigt und notwendig ist, ein gesundes Organ zu opfern. Im vorliegenden Fall handelte es sich um einen Patienten bei dem im Rahmen einer Nephrektomie die gesunde Nebenniere nicht erhalten werden konnte.

Bei der Untersuchung des Stathmin-Gens mittels RT-PCR wurde das Gewebe eines weiteren Patienten, bei dem eine gesunde Nebenniere geopfert werden musste, in die Untersuchung einbezogen. Dieses Gewebe war nicht für die Array-Untersuchungen verwendet worden. Die Stathmin-Expression dieses zweiten Normalgewebes ist der des ersten Normalgewebes vergleichbar und deutlich niedriger als in allen Tumoren und Metastasen.

Eine weitere Rechtfertigung unserer Wahl ist, dass beim Vergleich von Subgruppen untereinander der Standard weniger von Bedeutung ist, als beim Vergleich einer Gruppe gegen ihren Standard. Wir gingen desweiteren ohnehin davon aus, interessante Array-Ergebnisse mittels RT-PCR zu verifizieren, ähnlich wie dies in nahezu allen Publikationen ebenfalls erfolgt war.

2) Begründung der Methode

Die Aktualität der Microarray-Technologie ergibt sich aufgrund zweier Entwicklungen:

1. Die Einteilung und Klassifizierung von Tumoren erfolgt klassischerweise nach lichtmikroskopischen Kriterien, in vielen Fällen auch ergänzt durch immunhistologische Färbetechniken. Diese Klassifizierung ist bei bestimmten Tumoren aber nicht ausreichend, zuverlässige Aussagen über das biologische Verhalten zu machen und die Notwendigkeit weiterer Nachsorge- und Therapiemaßnahmen zu begründen oder auszuschließen [70]. Beispiele hierfür sind akute Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphome [4, 5], Mammakarzinome [108], Prostatakarzinome [91] und Melanome [27].

Bei den genannten Tumoren handelt es sich in jedem Fall um Malignome, die grundsätzlich einer Nachsorge bedürfen. Bei neuroendokrinen Tumoren kann dagegen in vielen Fällen vom makroskopischen und vom mikroskopischen Aspekt her allein noch nicht einmal vorhergesagt werden, ob ein Tumor benigne oder maligne ist. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Phäochromozytome sind hierfür ein typisches Beispiel. *„Aufgrund pathomorphologischer Befunde können*

maligne Phäochromozytome, die etwa 10 % aller Phäochromozytome ausmachen, nicht von benignen Phäochromozytomen unterschieden werden. Nur lymphogene oder hämatogene Metastasen sind beweisend für Malignität. (Rothmund [98])“. Obwohl heute eine Vielzahl von Erkenntnissen über genetische Veränderungen bei Phäochromozytomen vorliegen (siehe Einleitung), sind entscheidende Pathomechanismen dieser Tumoren doch noch immer unbekannt.

Auch die sehr wichtige Korrelation klinischer Verlaufsformen und Metastasierungsmuster mit Serummarkern, wie z.B. CEA (Carcino-embryonales Antigen), CA 19-9, Calcitonin, NSE (Neuron-spezifische Enolase) oder Chromogranin A kann die Komplexität der Tumorentstehung und –progression, insbesondere bei neuroendokrinen Tumoren, nur unzureichend wiedergeben.

Das individuelle Ansprechen auf adjuvante Therapiemaßnahmen ist ebenfalls kaum vorhersehbar. In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr **2000** kommen Arnold und Mitarbeiter [8] zu dem Schluss, dass bei neuroendokrinen gastro-entero-pankreatischen Tumoren mit Ausnahme des Insulinoms und des Gastrinoms bis zu 50 % der Patienten von einer Somatostatin-Therapie profitieren. Was diese 50 % von den 50 % Non-Respondern unterscheidet, die einer durchaus nicht nebenwirkungsarmen, in jedem Falle aber sehr kostenreichen Behandlung unnötigerweise unterzogen würden, ist nicht bekannt. Mit den bisherigen diagnostischen Methoden lassen sich die verantwortlichen Unterschiede dieser beiden Patientengruppen jedenfalls nicht erfassen.

Wichtige Fortschritte, gerade auf dem Gebiet der neuroendokrinen Tumoren, sind durch die Integration molekularbiologischer Erkenntnisse und Techniken in den klinischen Alltag erzielt worden.

Das Paradebeispiel für eine solche gelungene Integration ist das Syndrom der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN 2), das auf einer aktivierenden Mutation im sogenannten *RET*(REarranged in Transfection)-Protoonkogen beruht [35, 88]: Die zugehörige Molekulardiagnostik ist heute weitgehend standardisiert; die Bedeutung des Familienscreenings unstrittig und die Kenntnis der jeweils vorliegenden Mutation erlaubt eine altersabgestufte Indikationsstellung zur prophylaktischen Thyreoidektomie bei asymptomatischen Genträgern [19].

Am Beispiel des ebenfalls durch den Defekt eines einzelnen Gens verursachten Syndroms der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN 1) werden aber auch die Grenzen einer auf die reine DNA-Diagnostik beschränkten Betrachtungsweise

deutlich. Die Erkrankung beruht auf einer inaktivierenden Mutation in einem Tumorsuppressorgen auf Chromosom 11q13 [24]. Das dadurch veränderte sogenannte *Menin*-Protein ist in seiner Struktur einzigartig und in seiner Funktion unbekannt. Interaktionspartner wie *JunD* [1] werden mühsam und in der Regel einzeln entschlüsselt, ohne dass sich daraus bisher ein Gesamtbild im Sinne funktioneller Gruppen ergeben hätte. Bei mittlerweile über 250 bekannten verschiedenen *Menin*-Mutationen ist keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation erkennbar und somit die individuelle phänotypische Ausprägung nicht einmal innerhalb ein und derselben Familie vorhersagbar. Dementsprechend eingeschränkt und kontrovers sind bisherige Empfehlungen zu Screening und Therapie [19].

Aus dem oben gesagten wird ersichtlich, dass sowohl für ein tieferes Grundlagenverständnis der Tumorgenese und -progression, als auch für ganz praktische klinische Anwendungen die gleichzeitige Betrachtung mehrerer Gene und, noch wichtiger, deren Aktivität notwendig ist. Einen solchen Ansatz bietet die DNA-Microarray-Technologie.

2. Im Februar 2001 wurde zeitgleich in den Magazinen *Nature* [55] und *Science* [110] die Sequenz des menschlichen Genoms veröffentlicht. Sie war von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen (International Human Genome Sequencing Consortium und Celera Genomics) entschlüsselt worden. Die Gesamtzahl aller Gene des Menschen wurde danach auf etwa 30.000 - 40.000 geschätzt, was nur etwa der doppelten Anzahl im Vergleich zu Würmern oder Fliegen entspricht. Wenn auch die genaue Anzahl auch heute noch unbekannt ist, so wurden damit doch frühere Schätzungen, die von bis zu 140.000 Genen ausgingen, deutlich nach unten korrigiert [7].

Passend dazu zeigten Mural und Mitarbeiter [78] im Mai 2002 in *Science*, dass sich das Erbgut von Menschen und Mäusen nur sehr geringfügig unterscheidet. Die Analyse von Chromosom 16 ergab für beide Spezies einen Unterschied von nicht einmal 3 Prozent aller Gene: Bei den insgesamt 731 Nagergen auf Chromosom 16 fanden sich nur 14 Gene ohne humanen Doppelgänger und umgekehrt nur 21 menschliche Gene ohne Entsprechung bei der Maus.

Damit wurde deutlich, dass der komplexere biologische Organisationsgrad des Menschen im Vergleich zu anderen Organismen nicht allein auf der reinen Anzahl

seiner Gene beruhen kann, sondern dass vielmehr auch eine andere Nutzung dieser Gene, mithin die Genaktivität, eine wesentliche Rolle spielen muss.

In einer kürzlich ebenfalls in Science veröffentlichten Studie [39] konnten Enard und Mitarbeiter auch einen Beleg für diese These erbringen. Bei der Untersuchung der Transkriptome aus Leukozyten, Leber und Hirnkortex konnten sie spezies-spezifische Gen-Expressionsmuster im Vergleich Mensch, Schimpanse, Orang-Utan und Makakenaffe identifizieren. Diese Unterschiede waren besonders stark im Hirngewebe ausgeprägt und deutlich größer, als es die genetische Verwandtschaft der genannten Spezies auf DNA-Ebene hätte erwarten lassen. Mensch und Schimpanse sind in Bezug auf ihre genomische DNA zu 98,7 % identisch.

Das entscheidende Werkzeug bei dieser und ähnlichen Untersuchungen war die DNA-Microarray-Technologie.

Eine besonders schöne Analogie für das Verhältnis der DNA-Sequenz zur RNA-Expression stammt von Brazma [20]. Er vergleicht die DNA-Sequenz mit der anatomischen Struktur von Organen und die RNA-Expression mit ihrer physiologischen Funktion. Das Verständnis der physiologischen Funktion beruht auf der Kenntnis der Anatomie und ohne die Kenntnis der physiologischen Funktion ist die Betrachtung der reinen Anatomie nicht sehr sinnvoll.

Was können Microarrays leisten ?

Microarrays dienen der vergleichenden Erfassung der Genaktivität in zwei verschiedenen RNA-Proben. Die Fragestellungen und Untersuchungsmöglichkeiten sind dabei höchst vielfältig. Untersucht werden können z.B.:

Tumorgewebe versus Normalgewebe

Primärtumor versus Lymphknoten- oder Fernmetastase

Ersttumor versus metachrones Rezidiv

Tumorgewebe vor versus nach adjuvanter / neoadjuvanter Therapie

Die gewonnenen Daten können in vielfacher Weise zu unserem Verständnis der molekularen Grundlagen der Tumorentstehung und –progression beitragen:

1. Durch Einzelanalyse über- oder unterregulierter Gene im Gewebevergleich können neue, bis dahin noch nicht bekannte Onkogene oder

Tumorsuppressorgene identifiziert werden. Ein im Vergleich zum Normalgewebe im Tumor stärker aktiviertes Gen kann dabei Hinweis für ein (aktiviertes) Onkogen; ein vermindert exprimiertes Gen kann einem möglichen (ausgeschalteten) Tumorsuppressor entsprechen [31, 41].

Beispiel: RhoC bei Melanomen [27]

2. Die Erkennung charakteristischer „Muster“ durch sogenanntes hierarchisches Clustern (*hierarchical clustering*) erlaubt die Unterscheidung neuer Tumorsubtypen, die vom lichtmikroskopischen Aspekt her identisch sind [4, 5]. Die Klassifizierung solcher neuen Subtypen ermöglicht eine differenziertere Anwendung bereits bekannter oder zukünftig zu entwickelnder Therapieschemata.
3. Der Genvergleich kann die Zuordnung eines Tumors zu seinem Ursprungsgewebe ermöglichen. Dies ist insbesondere bei lymphatischen Erkrankungen von Interesse [44, 84].
4. Über eine rein diagnostische Funktion hinaus können Arrayuntersuchungen in Zukunft möglicherweise auch Zielmoleküle (*targets*) für neue pharmakologische Ansätze anzeigen.

Die Möglichkeiten der Array-Technologie sind aber keineswegs nur auf Tumoren beschränkt. Nahezu alle Zellen eines Organismus besitzen die gleiche Erbinformation (Ausnahme Erythrozyten, Ei- und Samenzellen), nutzen aber jeweils einen anderen Teil dieser Information für höchst unterschiedliche Aufgaben, wie ein Vergleich von Leber-, Mucosa- und Hirnzellen zeigt. Zudem ist die Aktivität unterschiedlicher Gene auch von den Umgebungsbedingungen, vom Zell-Zyklus und dem Lebensalter eines Organismus abhängig. Denkbar und sinnvoll kann demnach auch die Untersuchung von Zellen des Immunsystems z.B. bei Infektionen, Sepsis oder Autoimmunerkrankungen sein oder die Untersuchung der Reaktionen unterschiedlicher Zelltypen bei Stoffwechsellumstellungen aller Art, Schock- oder Hungerzuständen, Hitze oder Kälteeinwirkung. Auf die Möglichkeiten eines Speziesvergleiches [39] wurde bereits hingewiesen.

Microarrays zeigen in all diesen Beispielen an,
 welche Gene überhaupt aktiviert sind,
 welche Gene gar nicht aktiviert sind,

welche Gene gegenüber einem Vergleichsstandard vermehrt aktiviert sind (*up regulation*) und
 welche Gene gegenüber einem Vergleichsstandard vermindert aktiviert sind (*down regulation*).

Durch die simultane Ansicht mehrerer Tausend Gene gleichzeitig können Funktionsgruppen gemeinsam regulierter Gene, sogenannte Cluster, identifiziert werden. Eine mittels Computerprogramm gewonnene hierarchische Anordnung dieser Cluster (*hierarchical clustering*) zu typischen Mustern ist die wahrscheinlich eleganteste Form der Array-Analyse. In der Korrelation mit den klinischen Verlaufsformen ergibt sich unter Umständen eine Signatur des Tumors, die der Lichtmikroskopie verborgen bleibt. Man spricht hierbei, wohl in Analogie zur Kriminalistik, vom *molecular* oder *transcriptional profiling* [41, 57, 58, 70]. Etwas malerischer ist der Begriff des *molecular portrait* eines Tumors.

Nur am Rande soll darauf hingewiesen werden, dass mittels dieser Technik nicht nur RNA- sondern auch DNA-Analysen selbst möglich sind, etwa wenn es um das Auffinden von Polymorphismen oder Genmutationen geht (*genotyping*). Mögliche Zielsetzungen sind aber auch das Auffinden von genetischen Unterschieden zwischen unterschiedlich resistenten Bakterien- oder Virenstämmen oder eine Analyse der genetischen Varianz zwischen verschiedenen Völkern oder Bevölkerungsgruppen.

Was können Microarrays nicht leisten ?

Microarrayuntersuchungen sind grundsätzlich vergleichende Untersuchungen, deren Interpretierbarkeit und Sinnhaftigkeit stets vom gewählten Vergleichsstandard abhängt. Absolutangaben zur Genaktivität sind nur bei solchen Genen zu erhalten, die im Moment der RNA-Gewinnung von der Zelle gar nicht aktiviert wurden (nämlich Null-Aktivität). Selbstverständlich sind nur solche Gene ablesbar, die der Array auch enthält. Da bislang noch kein Array zur Verfügung steht, der das gesamte menschliche Genom beinhaltet, ist jede Arbeitsgruppe darauf angewiesen, die für die jeweilige Fragestellung geeignetsten Arrays herauszusuchen, oder selbst zusammenzustellen. Auf diese Weise wurden z.B. ein *Lymphochip*, ein *Apoptosechip* und ein *Mousechip* [4, 5] konstruiert. Die unterschiedliche Auswahl der untersuchten

Gene und der verwendeten Standards macht eine Vergleichbarkeit verschiedener Studien derzeit schwierig.

Nicht erkennbar ist, *warum* ein Gen über- oder unterexprimiert ist. Gen-Mutationen, Allelverluste (*loss of heterozygosity*, LOH) und sogar ganze Chromosomenverluste oder Amplifikationen sind nicht ohne Zusatzuntersuchungen zu verifizieren oder auszuschließen.

Da es sich bei der Microarray-Technologie auch noch um eine relativ junge Technologie handelt sind viele Experimente notwendig, die weniger dem biologischen Verständnis, als vielmehr der Entwicklung der Array-Technologie selbst dienen. Solche Experimente sind zeitaufwändig, teuer und für einen klinischen Wissenschaftler unter Umständen wenig attraktiv [90, 95].

Das in unserer Untersuchung verwendete Tyramid-Detektionssystem wird in der Literatur als besonders sensitiv beschrieben, auch schwächere Signale und damit kleinere Veränderungen der Expressionsverhältnisse zu erkennen. Heiskanen und Mitarbeiter [49] identifizierten mittels dieser Methode erstmalig die Amplifikation des Gens ZNF 133 (Zink Finger Gen, Onkogen, Chromosom 20p) in einer Neuroblastom-Zelllinie (Microarray mit 1.400 Genen). Die Tyramid-basierte Signalamplifizierung ermöglichte dabei eine 1000fache Signalverstärkung. Dennoch sind Arrayergebnisse nur sehr bedingt quantitativ auszuwerten. Aus der Intensität der Laserdetektion kann nicht eins zu eins auf die Genexpression rückgeschlossen werden.

Grundsätzlich anzumerken ist, dass die für Arrayuntersuchungen benötigte RNA im Gewebe relativ instabil ist und im Gegensatz zur DNA rasch degeneriert, d.h. von RNasen abgebaut wird [59, 71, 100]. Somit sind für den Kliniker, z.B. den Operateur, eine höhere Aufmerksamkeit und ein größerer organisatorischer Aufwand notwendig. Nur Gewebe, das nach der Entnahme im OP ohne Zeitverzug tiefgefroren wird (-80 ° Celsius), kommt überhaupt für Arrayuntersuchungen in Frage. Diese Art der Aufbewahrung ist heute aber selbst in Universitätskliniken keineswegs Standard. Paraffinfixiertes Gewebe ist für Microarray-Untersuchungen nicht geeignet.

Ein guten Überblick über diese methodischen Probleme und Vorschläge zur Standardisierung findet sich bei Brazma et al. [20].

3) Arrayuntersuchungen bei neuroendokrinen Tumoren

Bislang gibt es nur wenige Publikationen über Microarray-Untersuchungen von neuroendokrinen Tumoren. Beim **8. Internationalen Workshop über Multiple Endokrine Neoplasie**, der vom 15.-18. Juni 2002 in Grand Rapids, Michigan, USA, stattfand, wurden im Kongressband aber eine Reihe von Abstracts veröffentlicht, die sich mit diesem Thema auseinandersetzen.

So berichteten **Dilley** und Mitarbeiter [33] über eine Arrayuntersuchung an 8 Inselzelltumoren von 6 MEN1-Patienten. Es handelte sich dabei um 4 Insulinome, 2 Gastrinome, ein VIPom und ein PPom. Vergleichsstandard war isoliertes Inselzellgewebe, das ursprünglich für Transplantationen vorgesehen, dann aber nicht benutzt worden war. Identifiziert wurden 166 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene, davon 60 Gene in den Tumoren überexprimiert und 166 Gene unterexprimiert. Genauere Angaben, um welche Gene es sich dabei handelte, wurden im Abstract nicht gemacht.

Aldred und Mitarbeiter [2] berichteten über Microarray-Untersuchungen bei follikulären Schilddrüsenkarzinomen und gutartigen Schilddrüsenveränderungen. Hierbei zeigten sich, ähnlich wie bei Dilley (und auch in unserer Untersuchung), in den Tumoren mehr herunter- als heraufregulierte Gene. Vier Gene betreffen die *TGF-beta/BMP signal pathways*. Diese *pathways* waren bereits aus dem Vergleich mit dem Cowden-Syndrom als wichtig für die Entstehung auch sporadischer follikulärer Schilddrüsenkarzinome vermutet worden.

Haven und Mitarbeiter [48] untersuchten in einer Studie die Genexpression von 7 Nebenschilddrüsenadenomen und 12 Hyperplasien per Microarray. Referenzmaterial war ein von der Firma *Stratagene* produzierter *Universal Human Reference Total RNA-Kit*. Es wurden zwei Cluster bestehend aus 30 Genen identifiziert, die zwischen den Adenomen und 3 tertiären Hyperplasien einerseits und den übrigen Tumoren andererseits unterschied. Über die Gene selbst wurde im Abstract keine Angabe gemacht.

4) Analyse der differentiell exprimierten Gene

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Arrayuntersuchungen ergaben beim Vergleich aller Phäochromozytome mit dem Normalgewebe 45 Gene, die eine signifikant unterschiedliche Expression zeigten. Der Nachweis einer *mathematisch* signifikanten Über- oder Unterexpression eines Gens mittels *SAM* bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass das entsprechende Gen auch *biologisch* signifikant ist. Denkbar ist z.B., dass ein Gen bei der Deletion oder Amplifikation eines ganzen Chromosomenabschnittes lediglich mit-deletiert bzw. -amplifiziert wird und sein Proteinprodukt biologisch in Bezug auf die Tumorpropagation gar keine wesentliche Rolle spielt, während das eigentlich für die Erkrankung verantwortliche Gen in der Nachbarschaft möglicherweise überhaupt nicht durch den Array erfasst wurde.

Ebenfalls denkbar sind protektive, kompensatorische oder gegenregulatorische Prozesse innerhalb einer Tumorzelle, die zu (hochinteressanten) Genexpressionsunterschieden führen können, die aber nicht der Tumorpropagation, sondern im Gegenteil seiner Eindämmung dienen und leicht missverstanden werden können. Dass Arrays immer eine Momentaufnahme im Leben einer Zelle darstellen, ist Vor- und Nachteil gleichzeitig und wurde bereits dargestellt.

Eine Einteilung und nähere Analyse der 45 differentiell exprimierten Gene kann auf zweierlei Weise erfolgen:

1. nach chromosomaler Lokalisation
2. nach Funktion

Einteilung nach chromosomaler Lokalisation

Vergleich aller Tumoren versus Standard

Die Liste der 40 im Tumor *unterexprimierten* Gene zeigt eine Häufung bestimmter Chromosomenabschnitte. Am häufigsten betroffen sind die Regionen Chromosom **17q11.1-23.3** (6x), **1p13.2-36.12** (4x), **10q22-26.3** (4x) und **11q13** (3x). Jeweils zweimal betroffen sind die Regionen Chromosom **2q13-14**, **3p21-22**, **14**, **19q13.1** und **22q11.21-13.1**.

Von den 5 im Tumor *überexprimierten* Genen liegen immerhin zwei auf Chromosom **4q**. Ein weiteres *überexprimiertes* Gen, nämlich *PRKAR1A*, das eine Proteinkinase

codiert, liegt auf Chromosom **17q23-24** und damit in unmittelbarer Nachbarschaft zu den o.g. sechs herunterregulierten Genen.

Diese Expressionsunterschiede korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen anderer Untersuchungsmethoden. Mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) zeigten Edström Elder und Mitarbeiter [36] bei 32 von 34 untersuchten Phäochromozytomen und Paragangliomen Veränderungen in der Anzahl bestimmter Chromosomenabschnitte, wobei Verluste doppelt so häufig waren wie zusätzlich aquirierte Kopien. Die meisten Verluste (82% aller Tumoren) fanden sich auf dem kurzen Arm von **Chromosom 1 (1cen-p31)**. Desweiteren waren die Chromosomen **3q, 11p, 3p, 4q, 11q** und **2q** betroffen. Eine Vermehrung fand sich auf den Chromosomen **19p, 19q, 17q, 11q** und **16p**. Ein Zusammenhang zwischen Art und Ausmaß dieser Veränderungen und klinischen Parametern wie Größe, Hormonausschüttung oder Malignität fand sich in dieser Untersuchung nicht.

DNA-Veränderungen der oben genannten Art liegen hochwahrscheinlich auch in den von uns untersuchten Tumoren vor und mögen die Grundlage für die Über- oder Unterexpression der betreffenden Gene sein.

Eine besondere Rolle in der Pathogenese sporadischer Phäochromozytome wird von einigen Autoren der Region **1p** zugeschrieben [14, 15, 36, 72]. Speziell die zentromerische Region von 1p steht dabei im Verdacht, ein oder mehrere wichtige Tumorsuppressorgene zu beinhalten. In einer LOH-Studie von Edström Elder [36] werden auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 drei Regionen angegeben, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ein wichtiges Tumorsuppressorgen beinhalten. Diese Regionen sind: **1p36.2-pter, 1p23** und **1cen-p13**. Die Übereinstimmung dieser Daten mit den hier dargestellten Ergebnissen ist frappant: Auf unserer Liste der 45 signifikanten Gene finden sich vier Gene auf dem kurzen Arm von Chromosom 1, die eine verminderte Expression gegenüber dem Normalgewebe zeigen: *NRAS*, *FABP3*, *NUDC* und *DJ-1*. Von diesen 4 Genen die allesamt entweder mit der Zellzykluskontrolle (*NRAS*, *FABP3* und *NUDC*) oder mit der Signaltransduktion (*DJ-1*) in Verbindung stehen, liegt nur *NUDC* nicht innerhalb einer der drei Regionen.

In einer Untersuchung von Bender [14] war der kurze Arm von **Chromosom 1** auch als möglicher Träger eines mit Malignität assoziierten Gens verdächtigt worden. Auch das *heraufregulierte* Stathmin-Gen liegt auf Chromosom **1p36.1-p35**. Bei der Untersuchung von Bender handelte es sich aber um eine LOH-Studie, d.h. es wurde eher ein *herunterreguliertes* Gen vermutet.

Noch einmal muss betont werden, dass einem deletierten oder amplifizierten Gen nicht automatisch eine wesentliche Rolle in der Tumorentstehung und –propagation zukommt. Die hohe Anzahl von Genen, denen physiologisch eine Rolle bei der Steuerung der Zellteilung, Signaltransduktion und Apoptose zukommt, weist aber darauf hin, dass die mittels der Arrayuntersuchung gefundenen Gene sehr interessante Kandidaten für weitere Studien sind.

Einteilung nach Funktion

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Gene nach ihrer Funktion einzuteilen, sofern diese bereits bekannt ist. Wir haben in Anlehnung an eine Arbeit von Huang [54] die folgende Einteilung in drei Funktionsgruppen vorgenommen, die unterschiedliche Pathomechanismen für Tumorentstehung und -propagation abdecken:

- Gruppe 1: Zellwachstum, Transformation, Zell-Zykluskontrolle, Apoptose
- Gruppe 2: Zytokine, Proteinkinasen, Signal Transduktion, Zell-Oberflächen-Rezeptoren
- Gruppe 3: Zell-Adhäsion, Basalmembran-Proteine und Extrazellulär-Matrix-Proteine

Drei von fünf heraufregulierten Genen (*CCNI*, *EIF4* und *PRKAR1A*) lassen sich in Gruppe 2 einordnen. Bei einem weiteren Gen (*IDN3*) ist die Funktion noch nicht bekannt.

Bei den 40 herunterregulierten Genen finden sich 9 Gene mit Zugehörigkeit zu Gruppe 1, 14 Gene zu Gruppe 2 und nur 1 Gen zu Gruppe 3.

Insgesamt lassen sich von 45 differentiell exprimierten Genen 27 Gene einer der drei Gruppen zuzuordnen. Berücksichtigt man, dass von 5 Genen zwar die Struktur, aber nichts über die Funktion bekannt ist, so ergibt sich, dass 27 von 40 (bekannten) Genen (67,5 %) mit einer Tumorentwicklung in Verbindung gebracht werden können.

Malignität im Besonderen

Ein wichtiger Aspekt, der mit der vorliegenden Untersuchung beleuchtet werden sollte, betrifft die Fähigkeit bestimmter Phäochromozytome lokal invasiv zu wachsen und zu metastasieren; Eigenschaften, die diesen Tumoren lichtmikroskopisch primär nicht anzusehen sind.

Der interessanteste Kandidat für diese Frage war das Gen **Stathmin**. Zwar weist die Signifikanzanalyse nur eine schwache Signifikanz auf; die theoretische Bedeutung dieses Gens und die Tatsache, dass es (in einer anderen eigenen, hier aber nicht

näher dargestellten Untersuchungsreihe) in zwei Nebenschilddrüsenkarzinomen im Vergleich zu 5 Nebenschilddrüsenadenomen ebenfalls überexprimiert war, rechtfertigten jedoch eine genauere Überprüfung.

5) Stathmin

Das Stathmin-Gen liegt auf Chromosom **1p36.1-p35**. Es kodiert das Protein Stathmin oder Oncoprotein 18 (Op18). Dieses ist ein kleines ubiquitär vorkommendes zytosolisches Phosphoprotein. Es besteht aus 149 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 19 kDa. Seine Struktur ist unter den Wirbeltieren in hohem Maße konserviert. Seine Funktion besteht wahrscheinlich darin, als eine Art Relais (das griechische Wort *σταθμός* bedeutet soviel wie „Standort“ und „Station“ [65]) verschiedene Zell-Signalwege zu integrieren. Insbesondere ist Stathmin durch eine Interaktion mit Tubulin an der Zytoskelett-Organisation beteiligt; es bewirkt eine Destabilisierung von Microtubuli in vivo und in vitro [6, 23, 29]. Microtubuli, die zu den Zellorganellen gehören, sind Polymere aus globulären Tubulin-Untereinheiten, die zu zylindrischen Rohren mit einem Durchmesser von 24 nm angeordnet sind. Ihre Länge variiert zwischen Bruchteilen eines Mikrometers und mehreren hundert Mikrometern [71]. Sie sind im Zytosol einer Zelle lokalisiert und bilden die Grundlage für zahlreiche zelluläre Bewegungsformen, den intrazellulären Transport von Membranvesikeln und das axonale Wachstum von Nervenzellen. Sie sind auch verantwortlich für die Ausbildung des Spindelapparates zur parallelen Anordnung der Chromosomen und ihre Trennung bei Meiose und Mitose. Insbesondere diese letztgenannte Funktion spielt eine kritische Rolle bei der Zell-Zyklus-Kontrolle. Man unterscheidet zwischen Proteinen, die den Spindelapparat stabilisieren, sogenannten *microtubule-associated proteins* (MAPs), und Proteinen, die den Spindelapparat (z.B. durch Depolymerisation) destabilisieren. Zu diesen gehört u.a. Stathmin. Eine Phosphorylierung von Stathmin schaltet seine mikrotubuli-depolymerisierende Aktivität aus. Eine besonders starke Phosphorylierung von Stathmin wird während der Mitose beobachtet. Sie ist offenbar notwendig für die Zell-Zyklusprogression. Eine Transfektion von Zellen mit nicht-phosphorylierbaren Stathmin-Mutanten führt jedenfalls zur Zell-Zyklusblockade [76]. Der Spindelapparat ist auch Angriffspunkt

einiger heute gebräuchlicher Chemotherapeutika wie z.B. Vincristin, Vinblastin und Taxol® (paclitaxel).

Eine Überexpression von Stathmin wurde bislang bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen, so u.a. bei Leukämien, Lymphomen, Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen und Neuroblastomen.

Eine Stathmin-Überexpression in einer Phäochromozytom-Zelllinie von Ratten (*rat PC12*) wurde **1998** von Takekoshi und Mitarbeitern beschrieben [104]. Die Arbeitsgruppe nutzte das Verfahren des *differential display* um Genexpressionsunterschiede in der Ratten-Zelllinie unter Behandlung mit NGF (*nerve growth factor*) darzustellen. Dabei stieg die Stathmin-Expression in den NGF-behandelten Zellen an; ein Ergebnis, das mittels Northern Blot und RT-PCR bestätigt werden konnte. Auch in konsekutiv untersuchten 5 humanen Phäochromozytomen war die Stathmin-Expression gegenüber normalem Nebennierenmarkgewebe signifikant erhöht.

Einen Hinweis darauf, dass die Stathminexpression auch direkt mit der Prognose korrelieren kann und möglicherweise geeignet ist, Tumorsubgruppen zu definieren, gaben Curmi und Mitarbeiter im Jahr **2000** [29]. Bei einer Untersuchung an 133 primären Mamma-Karzinomen konnten Sie bei 22% der Tumoren eine Überexpression von Stathmin auf mRNA- und Proteinebene zeigen. Diese Überexpression korrelierte mit einem histologischen Grad III nach Scarff-Bloom-Richardson und einem Verlust von Östrogen- oder Progesteronrezeptoren; mithin Parametern, die eine schlechte Prognose anzeigen.

Ebenfalls im Jahr **2000** zeigten Price und Mitarbeiter [89] mittels quantitativer Northern-Blot Analyse eine Überexpression von Stathmin in 12 malignen Ovarialtumoren verglichen mit 8 benignen Ovarialtumoren und 10 normalen Ovarialgewebeproben.

Bemerkenswerterweise ist Stathmin, ähnlich wie das Gen *RhoC* (siehe Einleitung) an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt. Eine Überexpression von *RhoC* geht mit einem gesteigerten Metastasierungspotential einher [27]. Im hier untersuchten Tumorgewebe aus Lymphknotenmetastasen war die Stathminexpression ca. doppelt so hoch wie in den benignen Tumoren. Da dieses Lymphknotenmetastasengewebe aber nur von einem einzelnen Patienten stammte, sind verallgemeinernde Schlussfolgerungen so nicht zulässig.

Überraschenderweise taucht das Stathmin 1-Gen in der Vergleichsliste aller Tumoren versus Standard nicht innerhalb der ersten 45 Gene auf, sondern erst an einer späteren Stelle bei niedrigerer Signifikanz, bzw. höherer Falschdetektionsrate. Man mag daraus schlussfolgern, dass die genannten 45 Gene in ihrer Expression noch deutlichere Unterschiede zum Normalgewebe zeigen als Stathmin 1. Dies zu beweisen bleibt weiteren RT-PCR-Bestätigungsreaktionen vorbehalten.

6) Diskussion weiterer interessanter Gene

Eine vollständige Ausleuchtung aller gefundenen Gene würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen und bliebe, ohne weitere Bestätigungsreaktionen, auch weitgehend spekulativ. Dennoch sollen einige Beispiele für eine sinnvolle und die Phantasie eines Wissenschaftlers anregende Betrachtungsweise angeführt werden:

Eine interessante Beobachtung ergibt sich daraus, dass in den Phäochromozytomen offenbar das Gen für die **cAMP-abhängige Proteinkinase Typ 1 α (PRKAR1A)** überexprimiert ist. Von dieser Proteinkinase weiß man, dass sie einerseits unter physiologischer Stimulation bei Zell-Proliferation überexprimiert ist. Andererseits ist sie aber auch bei Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen überexprimiert und dann auch mit einer schlechteren Prognose assoziiert [25, 106]. **PRKAR1A** ist auch in der Lage das Protein **BAD** zu phosphorylieren und damit zu inaktivieren. **BAD** wiederum ist ein Antagonist von **Bcl2**.

Bcl2 (B-cell leukemia/lymphoma 2) ist ein Onkogen, das die Eigenschaft hat, die Apoptose zu unterdrücken [47]. **Bcl2** ist bekanntermaßen in Phäochromozytomen überexprimiert [28, 30, 112].

Das in unserer Untersuchung gefundene heraufregulierte **PRKAR1A** und das herunterregulierte **BAD** könnten so synergistisch zu einer Hemmung der Apoptose in den Phäochromozytomzellen führen.

Andererseits ist bekannt, dass der sogenannte **Carney Complex**, ein seltenes Tumorsyndrom, in dessen Rahmen es auch zum Auftreten von Paragangliomen kommen kann, auf inaktivierenden Mutationen im **PRKAR1A**-Gen beruht [101]. Dabei werden in der Regel sogenannte *nonsense* Mutationen gefunden, bei denen ein trunkiertes, d.h. verkürztes Protein gebildet wird, das dann über keinerlei Funktion

mehr verfügt. Erst in allerjüngster Zeit konnte eine Mutation gefunden werden, bei der das veränderte Protein über eine nachweisbare stimulierende Aktivität auf den PKA *pathway* verfügt [46]. Dies bedeutet, dass auch eine Veränderung der PRKAR1A-Funktion, und nicht nur ihr kompletter Verlust, zu einer Tumorbildung führen kann.

Das Beispiel zeigt sehr deutlich die Möglichkeiten aber auch die Grenzen der Array-Technologie an. Der Array zeigt an, dass das **PRKAR1A**-Gen in der Pathogenese von Phäochromozytomen offenbar eine Rolle spielt. Jedenfalls ist das Gen verstärkt aktiviert und die Tumoren bilden mehr mRNA als das Normalgewebe. Dies kann bedeuten, dass es auch zu einer vermehrten Proteinexpression und damit zu einer Verstärkung des PKA *pathways* führt. Es kann im Gegenteil aber auch bedeuten, dass die Tumorzellen in Gegenwart einer inaktivierenden Mutation des einen Allels und eines LOH des anderen Allels überhaupt nicht in der Lage sind, ein intaktes PRKAR1A-Molekül zu bilden und statt dessen, gleichsam kompensatorisch, ein defektes, aber gleichwohl vom Array detektiertes mRNA-Molekül in größerer Menge produzieren. Um diese Frage zu klären, sind zusätzliche Untersuchungen erforderlich, wie z.B. eine Sequenzanalyse des PRKAR1A-Gens in den Tumoren oder eine LOH-Untersuchung. Auf jeden Fall entwickeln sich neue Fragestellungen und das ist keinesfalls das schlechteste.

Zwei weitere Beispiele:

Das in unserer Untersuchung herunterregulierte Gen **BIN1** (*bridging integrator 1*) codiert einen Tumorsuppressor, der auch in Prostatakarzinomen herunterreguliert ist und dadurch zu einer Hemmung der Apoptose führt [47].

Das in den Phäochromozytomen herunterregulierte Gen **DJ-1** ist ein Onkogen, das eine Rolle im *Ras*-Signal-Transduktionsweg spielt [79]. In einer kürzlich erschienenen Arbeit in *Science* [18] zeigten Bonifati und Mitarbeiter, dass Mutationen im **DJ-1**-Gen mit nachfolgendem Funktionsverlust zu einer Neurodegeneration und zum autosomal rezessiven *early-onset* Parkinsonismus führen. Ob sich an diesem Gen Zusammenhänge zwischen dem Pathomechanismus von Phäochromozytomen und der Parkinsonschen Erkrankung festmachen lassen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

7) Bewertung der eigenen Ergebnisse

Das ursprüngliche wissenschaftliche Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über molekulare Mechanismen bei der Entstehung von Phäochromozytomen zu gewinnen. Insbesondere sollten Unterschiede zwischen benignen und malignen Tumoren aufgezeigt werden. Das erstgenannte Ziel wurde dabei erreicht, das letztgenannte (zunächst) nicht.

Das hierarchische Clustern erbrachte kein sinnvoll interpretierbares Ergebnis. Hierfür können im wesentlichen drei Gründe verantwortlich sein: erstens ist es möglich, dass die Anzahl der untersuchten Proben nicht ausreichend groß war. Zweitens ist es möglich, dass die Qualität der Untersuchung für diese Fragestellung nicht ausreichend war: nicht jeder Array war in allen Bereichen eindeutig ablesbar, was immer auch einen partiellen Informationsverlust bedeutete. Immerhin: in einer Pilotstudie mit 5 Leukämie-Proben konnte mit den gleichen Arrays und der gleichen Methodik ein Clustern erzeugt werden, das zwischen einer akuten lymphatischen und einer akuten myeloischen Leukämie unterschied. Drittens ist es möglich, dass sich Phäochromozytome für ein solches Clustern nicht eignen, weil die Expressionsunterschiede zwischen benignen und malignen Formen nur auf sehr wenigen Genen beruhen. Möglicherweise treffen auch alle drei Gründe gleichzeitig zu.

Die Auswertung der Arrayergebnisse mittels *SAM* identifizierte 45 zwischen den Tumoren und dem Normalgewebe unterschiedlich exprimierte Gene, die in ihrer Funktion und Lokalisation sehr interessante Ansatzpunkte für nachfolgende Untersuchungen bieten. Die auffällige Häufung bestimmter chromosomaler Regionen wie z.B. **1p** korreliert dabei sehr gut mit bereits bekannten Ergebnissen anderer Untersuchungstechniken, wie z.B. LOH-Studien. Dennoch ist die Arrayuntersuchung nicht bloß eine LOH-Studie mit anderen Mitteln. Das *Stathmin*-Gen liegt ebenfalls in der Region **1p36.1-p35** und ist im Gegensatz zu den anderen dort lokalisierten Genen *heraufreguliert*, d.h. ein Verlust dieses Locus kann nicht angenommen werden.

Der Entstehung und Propagation von Phäochromozytomen liegen (wer hätte anderes erwartet ?) komplexe molekulare Ereignisse zugrunde. Die vorliegende Arbeit mag einen Beitrag dazu leisten, Teile dieses molekularen „Puzzlespiels“ näher zu beleuchten.

8) Ausblick

Auf dem Feld der Grundlagenforschung wird die Messung der Transkriptionsaktivität einer Zelle auf RNA-Ebene viele neue Fragen aufwerfen, zu deren Beantwortung neue Methoden entwickelt werden müssen. Die von der DNA codierten eigentlichen Funktionsmoleküle, die Proteine, sind in ihrem Zusammenspiel hochkomplex und unterliegen auch posttranslationalen Veränderungen wie Phosphorylierung, Sulphatierung und Glykosylierung [59, 71], die mit einem DNA-Array nicht erfasst werden können. Der nächste Schritt zur Aufklärung ihrer Funktionsweise besteht in der Entwicklung proteomischer Arrays, die in der Lage sind, diese Veränderungen und ihr Zusammenspiel zu detektieren. Die besondere Schwierigkeit hierbei ergibt sich daraus, dass sich Proteine nicht in gleicher Weise wie einzelsträngige Nukleinsäuren komplementär zueinander erkennen und binden. Proteomische Arrays müssen daher auf dem Funktionsprinzip der Antigen-Antikörperbindung beruhen, woraus sich viele neue technische Schwierigkeiten ergeben. Auch für andere komplexe Zellmoleküle wie Lipide und Kohlenhydratverbindungen sind in Zukunft array-basierte Analysemethoden denkbar (93).

Die hier vorgestellte DNA-Array-Technologie wird auf wissenschaftlichem Gebiet zweifellos noch zu einer Reihe weiterer und bedeutender Erkenntnisse beitragen. Sie wird zur Entdeckung neuer immunhistochemischer Marker und hoffentlich auch zur Entwicklung neuer Therapeutika führen. Insofern wird sie die klassische Lichtmikroskopie in der Tumordiagnostik nicht ersetzen sondern vielmehr bereichern. Hofmann, Ottmann und Hoelzer [53] listen in ihrer Arbeit „*Globale Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays*“ mehrere Probleme auf, die dem Eingang dieser Technologie in die tägliche Praxis bislang noch entgegenstehen:

So sind Ergebnisse aus Microarrayexperimenten stark von der Qualität der verwendeten RNA abhängig. Dies stellt in der Grundlagenforschung und möglicherweise auch in der Hämatologie kein wesentliches Problem dar, da frisches Gewebe bzw. Blut in ausreichender Menge zur Verfügung steht, bzw. direkt entnommen werden kann. In allen anderen klinischen Fächern ist die Entnahme einer Gewebeprobe ungleich schwieriger und z.T. überhaupt nur ein einziges mal möglich. Hier werden an Logistik und Qualität von Gewebetransport und Lagerung

hohe Anforderungen gestellt, die derzeit, zumindest im Routinebetrieb, noch nicht befriedigend gewährleistet sind.

Zwei weitere Probleme heutiger Microarrays sind in Ihrer Lösung möglicherweise eng miteinander verknüpft. Es sind dies zum einen die gewaltige Datenflut, die sich aus einem Arrayexperiment ergibt, und zum anderen die hohen Kosten dieser Experimente.

Die ersten von Schena, Shalon, Davis und Brown [94] vorgestellten Microarrays enthielten 48 Gene. Aufgrund zunehmend verbesserter technischer Möglichkeiten gingen die Bemühungen seither dahin, möglichst die Gesamt-Genexpression einer Zelle, das heißt das komplette Transkriptom, auf einmal zu erfassen. Dementsprechend enthalten neue Arrays eine immer größere Anzahl von mittlerweile bis zu 40.000 Genen. Dies ist von der Sache her faszinierend und ermöglicht hochinteressante Einblicke in den Zellstoffwechsel. Es führt aber auch zu einer exorbitanten Menge an Daten, deren Bewältigung ein ungelöstes Problem ist. Für den klinischen Wissenschaftler und noch mehr für den behandelnden Arzt wird daher in Zukunft eher der umgekehrte Weg, das heißt die Reduzierung und Beschränkung auf deutlich weniger, dafür aber krankheitsspezifische Gene von Bedeutung sein. In diesem Sinne sind so genannte „*Customized Chips*“ zu verstehen. Ein Beispiel dafür ist ein Chip, der nur 95 selektierte Gene beinhaltet, die prädiktiv für die Imatinib-Sensitivität bei Philadelphia-Chromosom-positiver akuter lymphatischer Leukämie sind [53]. Diese spezialisierten und gleichzeitig reduzierten Arrays wären dann in Ihrer Datenauswertung wesentlich einfacher zu handhaben und sollten in ihrer Produktion ungleich kostengünstiger herzustellen sein als die bisher verwendeten.

Literatur

- 1) Agarwal SK, Guru SC, Heppner C, Erdos MR, Collins RM, Park SY, Saggari S, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Marx SJ, Burns AL
Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription
Cell 96(1), 1999, 143-52
- 2) Aldred MA, Pease MEG, Kornacker K, Popkie A, Vu CH, Dralle H, Gimm O, Jhiang S, Plass C, Eng C
Microarray Analyses Reveal Transcriptional Downregulation of TGF-Beta or BMP-Related Genes in Follikular Thyroid Neoplasia
Abstract 67 in Eight International Workshop on Multiple Endocrine Neoplasia
Grand Rapids, Michigan, USA, June 15- June 18, 2002
- 3) Alezais MM, Peyron
Un groupe nouveau de tumeurs epithéliales: les paraganglions
C.R. Seances Soc. Biol. Paris 65, 1908, 745-7
- 4) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson Jr J., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM
Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling
Nature 403, 2000, 503-11
- 5) Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, van de Rijn M.
Towards a novel classification of human malignancies based on gene expression patterns.
J Pathol 195(1), 2001, 41-52
- 6) Andersen SSL, Ashford AJ, Tournebise R, Gavet O, Sobel A, Hyman AA, Karsenti E
Mitotic chromatin regulates phosphorylation of Stathmin/Op 18
Nature 389, 1997 640-3
- 7) Aparicio SAJR
How to count...human genes
Nature genetics 25, 2000, 129-30
- 8) Arnold R, Simon B, Wied M
Treatment of neuroendocrine GEP tumours with somatostatin analogues: a review
Digestion 62 Suppl 1, 2000, 84-91

- 9) Astuti D, Douglas F, Lennard TWJ, Aligianis IA, Woodward ER, Evans DGR, Eng C, Latif F, Maher ER
Germline SDHD mutation in familial pheochromocytoma
The Lancet 357, 2001, 1181-2
- 10) Astuti D, Latif F, Dallol A, Dahia PLM, Douglas F, George E, Sköldbberg F, Husebye ES, Eng C, Mahler ER
Gene Mutations in the Succinate Dehydrogenase Subunit SDHB Cause Susceptibility to Familial Pheochromocytoma and to Familial Paraganglioma
Am J Hum Genet 69(1), 2001, 49-54
- 11) Averbuch SD, Steakley CS, Young RC, Gelmann EP, Goldstein DS, Stull R, Keiser HR
Malignant pheochromocytoma: effective treatment with a combination of cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine
Ann Intern Med 109(4), 1988, 267-73
- 12) Bausch B, McWhinney S, Bohnert-Iwan B, Franke G, Peczkowska M, Schipper J, Januszewicz A, Eng C, Neumann HPH
Moleculargenetic and Clinical Investigation of Mutations in the SDHB Gene
Abstract 68 in Eight International Workshop on Multiple Endocrine Neoplasia
Grand Rapids, Michigan, USA, June 15- June 18, 2002
- 13) Bémurat L, Gosse P, Ballanger P, Tauzin-Fin P, Barat P, Lacombe D, Lemétayer P, Clementy J
Successful laparoscopic operation of bilateral pheochromocytoma in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome
J Hum Hypertens 16(4), 2002, 281-4
- 14) Bender BU, Gutsche M, Gläsker S, Müller B, Kirste G, Eng C, Neumann HPH
Differential Genetic Alterations in von Hippel-Lindau Syndrome-Associated and Sporadic Pheochromocytomas
J Clin Endocrinol Metab 85, 2000, 4568-74
- 15) Benn DE, Dwight T, Richardson AL, Delbridge L, Bambach CP, Stowasser M, Gordon RD, Marsh DJ, Robinson BG
Sporadic and Familial Pheochromocytomas Are Associated with Loss of at Least Two Discrete Intervals on Chromosome 1p
Cancer Res 60, 2000, 7048-51
- 16) Berns A
Gene expression in diagnosis
Nature 403, 2000, 491-2

- 17) Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, Sampas N, Dougherty E, Wang E, Marincola F, Gooden C, Lueders J, Glatfelter A, Pollock P, Carpten J, Gillanders E, Leja D, Dietrich K, Beaudry C, M. Berens M, Albert D, Sondak V, Hayward N, Trent J
Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling
Nature 406, 2000, 536-40
- 18) Bonifati V, Rizzu P, Van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, Van Dongen JW, Vanacore N, Van Swieten JC, Brice A, Meco G, Van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P
Mutations in the DJ-1 Gene Associated with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism.
Science 299(5604) 2003, 256-9
- 19) Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJM, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BAJ, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker RV, Thompson NW, Tomasetti P, Tonelli F, Wells Jr SA, Marx SJ
CONSENSUS: Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2
J Clinical Endocrinol Metab 86(12), 2001, 5658-71
- 20) Brazma A, Robinson A, Cameron G, Ashburner M
One-stop shop for microarray data
Is a universal, public DNA-microarray database a realistic goal ?
Nature 403, 2000, 699-700
- 21) Caldas C, Aparicio SAJ
The molecular outlook
Nature 415, 2002, 484-5
- 22) Carney JA, Sheps SG, Go VL, Gordon H
The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma
N Engl J Med 296(26), 1977, 1517-8
- 23) Cassimeris L
The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers
Current Opinion in Cell Biology 14, 2002, 18-24
- 24) Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR, Debelenko LV, Zhuang Z, Lubensky IA, Liotta L, Crabtree JS, Wang Y, Roe BA, Weisemann J, Boguski MS, Agarwal SK, Kester MB, Kim YS, Heppner C, Dong Q, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ
Positional Cloning of the Gene for Multiple Endocrine Neoplasia-Type 1
Science 276, 1997, 404-7

- 25) Cho-Chung YS, Pepe S, Clair T, Budillon A, Nesterova M
cAMP-dependent protein kinase: role in normal and malignant growth
Crit Rev Oncol Hematol 21, 1995, 33-61
- 26) Chu G, Narasimhan B, Tibshirani R, Tusher V
SAM "Significance Analysis of Microarrays"
Users guide and technical document
Stanford University
Stanford CA 94305
- 27) Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO
Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC
Nature 406, 2000, 532-5
- 28) Clarke MR, Weyant RJ, Watson CG, Carty SE
Prognostic markers in pheochromocytoma
Human Pathol 29(5), 1998, 522-6
- 29) Curmi PA, Noguès C, Lachkar S, Carelle N, Gonthier MP, Sobel A, Lidereau R, Bièche I
Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours
British Journal of Cancer 82(1), 2000, 142-50
- 30) de Krijger RR, van der Harst E, van der Ham F, Stijnen T, Dinjens WN, Koper JW, Bruining HA, Lamberts SW, Bosman FT
Prognostic value of p53, bcl-2, and c-erbB-2 protein expression in pheochromocytomas
J Pathol 188(1), 1999, 51-5
- 31) DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM
Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer
Nat Genet 14(4), 1996, 457-60, Kommentar in Nat Genet 14(4), 1996, 367-70
- 32) Desai KV, Xiao N, Wang W, Gangi L, Greene J, Powell JI, Dickson R, Furth P, Hunter K, Kucherlapati R, Simon R, Liu ET, Green JE
Initiating oncogenic event determines gene-expression patterns of human breast cancer models
Proc Natl Acad Sci USA, 99(10), 2002, 6967-72
- 33) Dilley WG, Kalyanaraman S, Laramie J, Lairmore TC
Gene expression Profiles in Islet Tumors from Patients with the MEN1 Syndrome
Abstract 7 in Eight International Workshop on Multiple Endocrine Neoplasia
Grand Rapids, Michigan, USA, June 15- June 18, 2002
- 34) Dluhy RG
Pheochromocytoma – Death Of An Axiom
N Engl J Med 346(19), 2002, 1486-8 (editorials)

- 35) Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, Howe JR, Moley JF, Goodfellow P, Wells SA
Mutations in the RET-Proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC
Hum Molec Genetics 2, 1993, 851-6
- 36) Edström E, Mahlamäki E, Nord B, Kjellmann M, Karhu R, Höög A, Goncharov N, Teh BT, Bäckdahl M, Larsson C
Comparative Genomic Hybridization reveals frequent losses of chromosomes 1p and 3q in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas suggesting a common genetic etiology
American Journal of Pathology 156(2), 2000, 651-9
- 37) Edstöm Elder E, Hjelm Skog AL, Höög A, Hamberger B
Benign and malignant pheochromocytoma and abdominal paraganglioma – diagnosis, clinical course and management
Elisabeth Edström Elder, Pheochromocytoma and abdominal paraganglioma – clinical and genetic aspects. Thesis, Stockholm 2002
- 38) Edström Elder E, Nord B, Carling T, Juhlin C, Bäckdahl M, Höög A, Larsson C
Loss of Heterozygosity on the Short Arm of Chromosome 1 in Pheochromocytoma and abdominal Paraganglioma
Elisabeth Edström Elder, Pheochromocytoma and abdominal paraganglioma – clinical and genetic aspects. Thesis, Stockholm 2002
- 39) Enard W, Khaitovich P, Klose J, Zöllner S, Heissig F, Giavalisco P, Nieselt-Struwe K, Muchmore E, Varki A, Ravid R, Doxiadis GM, Bontrop RE, Pääbo S
Intra- and Interspecific Variation in Primate Gene Expression Patterns
Science 296(5566), 2002, 340-3
- 40) Frankel F
Ein Fall von doppelseitigem, völlig latent verlaufendem Nebennierentumor und gleichzeitiger Nephritis mit Veränderungen am Circulationsapparat und Retinitis
Virchows Arch Pathol Anat Physiol 103, 1886, 244-63
- 41) Friend SH
How DNA microarrays and expression profiling will affect clinical practise
BMJ 13 Nov 319(7229), 1999, 1306-7
- 42) Gagner M, Lacroix A, Bolte E
Laparoscopic adrenalectomy in Cushing's syndrome and pheochromocytoma
Br J Surg 84, 1999, 94-7
- 43) Goldstein RE, O'Neill Jr JA, Holcomb 3rd GW, Morgan 3rd WM, Neblett 3rd WW, Oates JA, Brown N, Nadeau J, Smith B, Page DL, Abumrad NN, Scott Jr HW
Clinical experience over 48 years with pheochromocytoma
Ann Surg 229(6), 1999, 755-64 Diskussion 764-6

- 44) 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, 1999, 531-7
- 45) Graham JB
Pheochromocytoma and hypertension: An analysis of 207 cases
Int abstracts Surg 92, 1951, 105
- 46) Groussin L, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Jullian E, Delemer B, Zacharieva S, Pignatelli D, Carney JA, Luton JP, Bertagna X, Stratakis CA, Bertherat J
Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signalling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD
Am J Hum Genet 71(6), 2002, 1433-42
- 47) Gurumurthy S, Vasudevan KM, Rangnekar VM.
Regulation of apoptosis in prostate cancer.
Cancer Metastasis Rev 20(3-4), 2001, 225-43
- 48) Haven C, Howell V, Takahashi M, Robinson B, Delbridge L, Fleuren GJ, Nelson A, Marsh D, Morreau H, Teh BT
Gene Expression Profiling of Parathyroid Tumours
Abstract 17 in Eight International Workshop on Multiple Endocrine Neoplasia
Grand Rapids, Michigan, USA, June 15- June 18, 2002
- 49) Heiskanen MA, Bittner ML, Chen Y, Khan J, Adler KE, Trent JM, Meltzer PS
Detection of Gene Amplification by Genomic Hybridization to cDNA Microarrays
Cancer Reserarch 60, 2000, 799-802
- 50) Helman LJ, Cohen PS, Averbuch SD, Cooper MJ, Keiser HR, Israel MA
Neuropeptide Y expression distinguishes malignant from benign pheochromocytoma
J Clin Oncol 7, 1989, 720-5
- 51) Hoegerle S, Nitzsche E, Althoefer C, Ghanem N, Manz T, Brink I, Reincke M, Moser E, Neumann HPH
Pheochromocytomas: Detection with ¹⁸F DOPA Whole-Body PET - Initial results
Radiology 222, 2002, 507-12
- 52) Hoehner JC, Gestblom C, Hedborg F, Sandstedt B, Grimelius L, Olsen L, Pahlmann S
Developmental gene expression of sympathetic nervous system tumors reflects their histogenesis
Lab Invest 78(1), 1998, 29-45

- 53) Hofmann WK, Ottmann OG, Hoelzer D
Globale Genexpressionsanalyse mit Mikroarrays
Deutsche Ärzteblatt 5 B, 2003, 243-6
- 54) Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H
Gene expression Profiling of Low-Grade Diffuse Astrocytomas by cDNA
Arrays
Cancer Res 60, 2000, 6868-74
- 55) International Human Genome Sequencing Consortium
Initial sequencing and analysis of the human genome
Nature 409, 2001, 860-921
- 56) John H, Ziegler WH, Hauri D, Jaeger P
Pheochromocytomas: can malignant potential be predicted ?
Urology 53(4), 1999, 679-83
- 57) Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, Berthold F,
Schwab M, Antonescu CR, Peterson C, Meltzer PS
Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression
profiling and artificial neural networks.
Nat Med 7(6), 2001, 673-9, Kommentar 658-9
- 58) Khan J, Saal LH, Bittner ML, Chen Y, Trent JM, Meltzer PS
Expression profiling in cancer using cDNA microarrays
Electrophoresis 20(2), 1999, 223-9
- 59) Knippers R
Molekulare Genetik 7. Auflage
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1997
- 60) Knudson AG
Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma
Proc Natl Acad Sci USA 68, 1971, 820-3
- 61) Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund M, Schraml P, Leighton S,
Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP
Tissue microarrays for high throughput molecular profiling of tumor specimens
Nature Med 4(7), 1998, 844-7
- 62) Kopf D, Goretzki PE, Lehnert H
Clinical management of malignant adrenal tumors
J Cancer Res Clin Oncol 127(3), 2001, 143-55
- 63) Kvale WF, Roth GM, Manger WM, Priestley JT
Pheochromocytoma
Circulation 14, 1956, 622

- 64) L'Abbé M, Tinel J, Doumer E
Crises solaires et hypertension paroxystique en rapport avec une tumeur surrénale
Bull.Soc.Méd.Hôp. 46, 1922, 982-90
- 65) Langenscheidts Grosswörterbuch Griechisch Deutsch
Langenscheidt Berlin München Wien Zürich
24. Auflage 1981
- 66) Langenscheidts Handwörterbuch Englisch
Langenscheidt Berlin München Wien Zürich
7. Auflage 1983
- 67) Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi P, Walther MM, Weng Y, Duan DS, Dean M, Glavac D, Richards FM, Crossey PA, Ferguson-Smith MA, Paslier D, Chumakov I, Cohen D, Chinault AC, Maher ER, Linehan WM, Zbar B, Lerman MI
Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene
Science 260, 1993, 1317-20
- 68) Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, Pallente M, Ensley JF, Koontongkaew S, Liotta LA, Emmert-Buck M, Gutkind JS
Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays
Oncogene 19, 2000, 3220-4
- 69) Lenz T, Gossmann J, Schulte KL, Salewski L, Geiger H
Diagnosis of pheochromocytoma
Clin Lab 48(1-2), 2002, 5-18
- 70) Liotta L, Petricoin E
Molecular Profiling of Human Cancer
Nature reviews 1(1), 2000, 48-56
- 71) Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J
Molekulare Zellbiologie 2. Auflage
Walter de Gruyter Berlin New York 1996
- 72) Lui WO, Chen J, Gläsker S, Bender BU, Madura C, Khoo SK, Kort E, Larsson C, Neumann HPH, Teh BT
Selective loss of chromosome 11 in pheochromocytomas associated with the VHL syndrome
Oncogene 21(7), 2002, 1117-22
- 73) Manasse P
Zur Histologie und Histogenese der primären Nierengeschwülste
Virchows Arch Pathol Anat 145, 1896, 113-57

- 74) Manger WM, Gifford Jr. RW
Clinical and Experimental Pheochromocytoma Second Edition
Blackwell Science 1996
- 75) Marks PA, Rifkind RR, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK
Histone Deacetylases and Cancer: Causes and Therapies
Nature reviews 1(3), 2001, 194-202
- 76) Mistry SJ, Atweh GF
Role of Stathmin in the Regulation of the Mitotic Spindle:
Potential Applications in Cancer Therapy
The Mount Sinai Journal of Medicine 69(5), 2002, 299-303
- 77) Mulligan LM, Kwok JBJ, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR,
Mole SE, Moore JK, Papi L, Ponder MA, Telenius H, Tunnacliffe A, Ponder
BAJ
Germ-line mutations of the RET-Proto-oncogene in multiple endocrine
neoplasia type 2a (MEN 2A)
Nature 363, 1993, 458-69
- 78) Mural RJ, Adams MD et al.
A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and
the human genome
Science 296(5573), 2002, 1661-71
- 79) Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H
DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation
with ras
Biochem Biophys Res Commun 231(2), 1997, 509-13
- 80) Neumann HPH, Bausch B, McWhinney SR, Bender BU, Gimm O, Franke G,
Schipper J, Klisch J, Althoefer C, Zerres K, Januszewicz A, Eng C
Germ-Line Mutations in Nonsyndromic Pheochromocytoma
N Engl J Med 346(19), 2002, 1459-66
- 81) Neumann HPH, Hoegerle S, Manz T, Brenner K, Iliopoulos O
How many pathways to pheochromocytoma ?
Sem Nephrol 22(2), 2002, 89-99
- 82) Oberndorfer S
Karzinomide Tumoren des Dünndarms
Frankf Z Pathol 1, 1907, 426-32
- 83) Oriola J, Anglada J, Ribas Y, Sala J, Halperin I, Rivera-Fillat F, del Pozo C
Characterization of a New Mutation in the SDHD Gene in a Family with
Paragangliomas that Showed Intrafamilial Phenotype Diversity
Abstract 75 in Eight International Workshop on Multiple Endocrine Neoplasia
Grand Rapids, Michigan, USA, June 15- June 18, 2002

- 84) Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van den Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Aksien LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borerresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D
Molecular portraits of human breast tumors
Nature 46, 2000, 747-52
- 85) Perrone EE, Theoharis C, Mucci NR, Hayasaka S, Taylor JMG, Cooney KG, Rubin MA
Tissue Microarray Assessment of Prostate Cancer Tumor Proliferation in African-American and White Men
J Natl Cancer Inst 92(11), 2000, 937-9
- 86) Pick L
Das Ganglioma embryonale sympathicum (Sympathoma embryonale), eine typische bösartige Geschwulstform des sympathischen Nervensystems
Berl. Klin. Wochenschr. 49, 1912, 16-22
- 87) Pommier RF, Vetto JT, Billingsly K, Woltering EA, Brennan MF
Comparison of adrenal and extraadrenal pheochromocytomas
Surgery 114(6), 1993, 1160-5, discussion 1165-6
- 88) Ponder BAJ
Mutations of the RET-Proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2
Cancer Surveys 25, 1995, 195-205
- 89) Price DK, Ball JR, Bahrani-Mostafavi Z, Vachris JC, Kaufmann JS, Naumann RW, Higgins RV, Hall JB
The phosphoprotein Op18/stathmin is differentially expressed in ovarian cancer
Cancer Invest 18(8), 2000, 722-30
- 90) Quackenbush J
Microarray data normalization and transformation
Nat Genet Supp 2, 2002, 496-501
- 91) Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JCF, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO
Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines
Nature Genetics 24, 2000, 227-35
- 92) Sanso G, Garcia Rudaz C, Levin G, Barontini M
Familial Pheochromocytoma Associated with a Novel Mutation in the vHL Gene
Abstract 76 in Eight International Workshop on Multiple Endocrine Neoplasia
Grand Rapids, Michigan, USA, June 15- June 18, 2002
- 93) Schena M, Heller RA, Theriault TT, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW
Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics
Trends in Biotechnology 16(7) 1998, 301-6

- 94) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO
Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray
Science 270, 1995, 469-70
- 95) Schuchhardt J, Beule D, Malik A, Wolski E, Eickhoff H, Lehrach H, Herzelt H
Normalization strategies for cDNA microarrays
Nucleic Acids Res 28(10), 2000, E47
- 96) Sgroi DC, Teng S, Robinson G, LeVangie R, Hudson Jr. JR, Elkahloun AG
In Vivo Gene Expression Profile Analysis of Human Breast Cancer Progression
Cancer Research 59, 1999, 5656-61
- 97) Shoemaker DD, Schadt EE, Armour CD, He YD, Garret-Engle P, McDonagh PD, Loerch PM, Leonardson A, Lum PY, Cavet G, Wu LF, Altschuler SJ, Edwards S, King J, Tsang JS, Schimmack G, Schelter JM, Koch J, M Ziman M, Marton MJ, Li B, Cundiff P, Ward T, Castle J, Krolewski M, Meyer MR, Mao M, Burchard J, Kidd MJ, Dai H, Phillips JW, Linsley PS, Stoughton R, Scherer S, Boguski MS
Experimental annotation of the human genome using microarray technology
Nature 409, 2001, 922-7
- 98) Siewert JR, Harder F, Rothmund M
Praxis der Viszeralchirurgie
Endokrine Chirurgie
Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2000
- 99) Solcia E KG, Sobin LH, Ed.
Histological typing of Endocrine tumors. International Histological Classification of Tumors
Berlin Springer 2000
- 100) Strachan T, Read AP
Human Molecular Genetics Second Edition
BIOS Scientific Publishers Ltd., 2000
- 101) Stratakis CA
Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit (PRKAR1A) in patients with the "complex of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity, and schwannomas" (Carney complex)
Ann N Y Acad Sci 968, 2002, 3-21
- 102) Sutton M, Sheps SG, Lie JI
Prevalence of clinically unsuspected pheochromocytoma: Review of a 50 year autopsy series
Mayo Clinic Proc 56, 1981, 354-60

- 103) Suwa H
Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas
Br J Cancer 77, 1998, 147-52
- 104) Takekoshi K, Nomura F, Isobe K, Motooka M, Nammoku T, Nakai T
Identification and initial characterization of stathmin by the differential display method in nerve growth factor-treated PC12 cells
Eur J Endocrinol 138(6), 1998, 707-12
- 105) Thompson LDR
Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases
Am J Surg Pathol 26(5), 2002, 551-66
- 106) Tortora G, Ciardiello F
Protein Kinase A Type I: A Target For Cancer Therapy
Clinical Cancer Research 8, 2002, 303-4
- 107) van Heerden JA, Sheps SG, Hamberger B, Sheedy 2nd PF, Poston JG, ReMine WH
Pheochromocytoma: current status and changing trends
Surgery 91(4), 1982, 367-73
- 108) van `t Veer L, Dal H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH
Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer
Nature Volume 415, 2002, 530-6
- 109) van` t Veer L, De Jong D
The microarray way to tailored cancer treatment
Nature medicine 8(1), 2002, 13-4
- 110) Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Cheryl A Evans CA et al.
The sequence of the human genome
Science 291, 2001, 1304-51
- 111) Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA et al.
Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus
Cell 62(1), 1990, 187-92
- 112) Wang DG, Johnston CF, Marley JJ, Phenix KV, Atkinson AB, Russell CF, Buchanan KD
Expression of the apoptosis-suppressing gene BCL-2 in pheochromocytoma is associated with the expression of C-MYC
J Clin Endocrinol Metab 82(6), 1997, 1949-52

Danksagung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde an der Universitätsklinik Uppsala durchgeführt. Dabei handelte es sich nicht um die Anwendung einer bereits etablierten Methode, sondern um eine neue Technologie, die dort interdisziplinär mit hohem Kostenaufwand erstmalig eingesetzt wurde. Dass man mir diese verantwortungsvolle und faszinierende Aufgabe für die endokrin-chirurgische Forschungsgruppe anvertraut hat, macht mich sehr stolz. Hierfür bedanke ich mich bei **Dr. Per Hellman** und **Professor Dr. Göran Åkerström**, die sehr viel Vertrauen in mich investiert und meinen Aufenthalt in Schweden unvergesslich gemacht haben.

Herr **Dr. Gunnar Westin** hat als Leiter des endokrin-chirurgischen Forschungslabors das Projekt im Wesentlichen konzipiert und mit großer Übersicht und viel Geduld geleitet. Zum Gelingen beigetragen haben außerdem die weiteren Mitarbeiter der Forschungsgruppe **Peyman Björklund**, **Peter Lillhager**, **Birgitta Bonderson** und **Ulrika Segersten**.

Viel Zeit habe ich verbracht mit den Mitarbeitern der Arrayplattform, bei denen die Arrayproduktion und Datenanalyse erfolgte. Mein besonderer Dank gilt hier **Marten Fryknäs**, mit dem ich in wochenlanger Kleinarbeit über 800.000 Daten mehrfach analysiert und überprüft habe. Auch den weiteren Mitarbeitern **Anders Isaksson**, **Ulrika Wickenberg**, **Malin Larsson**, **Jakob Karen** und dem Leiter der Arrayplattform **Professor Dr. Ulf Petterson** gebührt mein Dank.

Sie alle haben mir nicht nur die Welt der Microarrays nähergebracht, sondern auch mein Bild von Schweden in nachhaltiger Weise positiv geprägt.

Mein Aufenthalt in Schweden wäre nicht möglich gewesen ohne die großzügige Unterstützung und Empfehlung durch meinen Chef Herrn **Professor Dr. Hans-Dietrich Röher**, der die Arbeit aus klinischer Perspektive begleitet hat.

Herr **Professor Dr. Christian Ohmann** und Herr **Dr. Pablo Verde** haben den statistischen Teil überprüft und bei der Übertragung der Fachbegriffe ins Deutsche mitgeholfen.

Das abgebildete histologische Präparat eines Phäochromozytoms wurde von Herrn **Professor Dr. Lars Grimelius** persönlich ausgewählt und zur Verfügung gestellt. Die deutschen Bilderläuterungen stammen von Herrn **Dr. Stefan Braunstein**.

Frau **Professor Dr. Cornelia Dotzenrath** und Herr **Professor Dr. Peter Goretzki** waren mir Vorbild und haben mich aus der Ferne fortgesetzt motiviert.

Bei ihnen allen bedanke ich mich ganz herzlich.