

CHIRURGISCHE ALLGEMEINE

ZEITUNG FÜR KLINIK UND PRAXIS

Elektronischer Sonderdruck
für Prof. Dr. med. Björn Brücher

Biotechnologie und Krebs

Teil 2: Epigenetik, Proteomik

CHAZ (2016) 17: 125–130
© Kaden Verlag, Heidelberg

Diese PDF-Datei darf nur für nichtkommerzielle Zwecke
verwendet werden und nicht in privaten, sozialen und
wissenschaftlichen Plattformen eingestellt werden.

www.chirurgische-allgemeine.de



Björn L.D.M. Brücher¹⁻⁴, Yan Li⁵, Philipp Schnabel⁶, Martin Daumer^{1, 2, 7}, Timothy J. Wallace³, Rainer Kube⁴, Bruno Zilberstein⁸, Scott Steele^{9, 10}, Jan Voskuil¹¹, Ijaz S. Jamall^{1, 2, 12}

Biotechnologie und Krebs

Teil 2: Epigenetik, Proteomik

Um Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen weiter zu verbessern, ist es entscheidend, bereits vorhandenes Wissen in Patienten- und Tumor-spezifische Ansätze zu integrieren. Dabei sollen zukünftig molekularbiologische Informationen einen multimodalen Diagnose- und Therapieansatz ermöglichen, um Patienten zu identifizieren, die nach den festgelegten Tumor-Variablen therapiert werden sollten – die sogenannte personalisierte Diagnose und Therapie. Andere Patienten sollten – gemäß der individualisierten Diagnose und Therapie – standardisierte Modifikationen einer multimodalen Therapie erhalten, um durch das optimale Ansprechen auf eine Tumortherapie die jeweilige Prognose zu verbessern. Nachfolgend werden wesentliche Methoden und Daten zur Epigenetik und zur Proteomik vorgestellt.

Haupthindernis für durchzuführende Sequenzierungs-Analysen sind epigenetische Veränderungen, die für das Verständnis der Krebsentstehung und den Progress eines Krebsleidens von großer Bedeutung zu sein scheinen. Per definitionem sind epigenetische Veränderungen mitotisch und meiotisch vererbare Änderungen der Genexpression, die nicht durch Veränderungen in der primären DNA-Sequenz verursacht werden. Dies bedeutet, dass (1) Zelleigenschaften (Phänotyp) an Tochterzellen weiter vererbt werden ohne dass diese in der DNA-Sequenz (Genotyp) vorhanden sind und (2) diese Veränderungen an den Chromosomen Abschnitte oder ganze Chromosomen verändern und dadurch in ihrer Aktivität beeinflussen. Mittlerweile nimmt man an, dass Änderungen der Lebensweise (Ernährung, regelmäßige sportliche Aktivität/Inaktivität, etc.) regelrechte epigenetische Muster verursachen. Die in der aktuellen Literatur beschriebenen epigenetischen Modifikationen umfassen allgemein Histon-Varianten,

posttranslationale Modifikationen von Aminosäuren (am Amino-terminalen Ende von Histonen), und Veränderungen im Methylierungsstatus von Zytosin-Basen (C) im Zusammenhang mit CpG-Dinukleotiden innerhalb der DNA selbst. Methylierung von Clustern von CpGs als „CpG-Inseln“ in Promotoren von Genen wurden mit sogenannten vererbaren Genstilllegungen (Gen-Silencing) assoziiert, bei dem die Genexpression durch Hemmung der Transkription (transkriptionales Gen-Silencing) oder der Translation (post-transkriptionales Gen-Silencing) gemindert wird [98].

Methylierung und De-Methylierungsvorgänge sind dynamische Prozesse

Die Bedeutung epigenetischer Faktoren wurde für mehrere Krebsarten einschließlich des Speiseröhrenkrebses bereits nachgewiesen [99–101]. Methylierung und De-Methylierungsvorgänge sind allerdings dynamische Prozesse. Es wurde bereits versucht einen sogenannten „Methylierungs-Fingerabdruck“ (Methylation Fingerprint) nicht nur mit Krankheiten, sondern auch unterschiedlichen Krankheitsstadien zu korrelieren. Je nach Stufen der Tumorprogression hat es bislang den Anschein, dass gewisse Subgruppen – wie etwa bei den Erkrankungsstadien von Adenokarzinomen der Speiseröhre – mit speziellen epigenetischen Veränderungen einhergehen können. Dies könnte auf einen stufenweisen Verlust mehrerer Schutz-

¹ Theodor-Billroth-Akademie®, Deutschland – USA; ² INCORE, International Consortium of Research Excellence der Theodor-Billroth-Akademie®, Deutschland – USA; ³ Bon Secours Cancer Institute Richmond, VA, USA; ⁴ Chirurgische Klinik, Carl-Thiem-Klinikum Cottbus; ⁵ Proteogenomics Research Institute for Systems Medicine San Diego, CA, USA; ⁶ Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Homburg/Saar; ⁷ Sylvia Lawry Center for MS Research München; ⁸ Chirurgische Klinik, Universität Sao Paulo, Brasilien; ⁹ Case Western Reserve University Cleveland, OH, USA; ¹⁰ Chirurgische Klinik, Madigan Army Medical Center Tacoma, WA, USA; ¹¹ Everest Biotech Ltd., Upper Heyford, Oxford, Großbritannien; ¹² Risk-Based Decisions Inc., Sacramento, CA, USA

barrieren gegen CpG-Insel-Hypermethylierungen hinweisen. Andererseits übernehmen Hyper- und Hypo-Methylierungen unterschiedliche Rollen in der Zelle, so dass anzunehmen ist, dass der *Methylation Fingerprint* von Krebszellen wesentlich komplexer ist: Hypomethylierungen bedingen in der Regel Genominstabilität und große genetische Neuordnungen wie auch Silencing verschiedener Tumorsuppressor-Gene [102]. Aberrante Hypermethylierung tritt an verschiedenen Orten auf, was vermuten lässt, dass eine umfassende Deregulierung der Methylierung eine Kontrolle im Rahmen der Tumorentstehung von Adenokarzinomen der Speiseröhre einnehmen könnte; bis dato konnte noch keine Korrelation einer Tumorgruppe mit einem spezifischen CpG-Insel-Methylator-Phänotyp eruiert werden [103]. Es wurden schon Untersuchungen getätigt, um Methylierungsmuster der DNA wie etwa p16-Promotor-Methylierung im Blut von Krebspatienten von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (ESCC) zu untersuchen [104]. Nachgewiesen wurde, dass das SFRP1-Gen (frizzled-related protein 1) mittels Hypermethylierung bei ESSC über den Wnt-Signalweg herunterreguliert ist [105], wie auch die COX-2-Promotor-Region in einigen ESSC-Zelllinien [106].

Eine nähere Charakterisierung des Rab25-Gens soll helfen, es als prognostischen Biomarker zu verwenden

Sogenanntes *Endocytic Recycling* ist eine koordinierte endozytische Aufnahme zur Kontrolle der Zusammensetzung der Plasmamembran. Das Rab25-Gen wurde mit dem Endocytic Recycling von Integrinen (wesentlicher Bestandteil von Zellmembranen) in Verbindung gebracht; hier wurde aufgezeigt, dass eine Suppression der Invasion und Angiogenese in einer Kohorte von ESCC-Tumorproben signifikant herunterreguliert war; weiterhin korrelierte die Genexpression von Rab25 mit einem schlechteren Gesamtüberleben, was in Kontrollen von ESCC-Zelllinien im Vergleich zu gepoolten normalen Gewebeproben ebenfalls nachweisbar war [107]. Eine Demethylierungs-Behandlung zusammen mit genomischen Sequenzierungsanalysen sowohl in ESCC-Zelllinien, als auch in klinischen Tumorgewebeproben, zeigte eine Herunterregulierung von Rab25 [107]. Aus diesem Grund nimmt man an, dass eine nähere Charakterisierung von Rab25 hilfreich sein könnte, um es als prognostischen Biomarker zu verwenden, um mögliche prädiktive Response-Vorhersagen und/oder als neue Targeted-Therapie entwickeln zu können. Eine effektive Multi-Targeted-Therapie ist bis dato noch nicht möglich; zudem ist dies dadurch erschwert, dass Krebszellen molekular und zellulär Mechanismen generieren, und sich oftmals dadurch zu aggressiveren Tumorphänotypen wandeln [108]. Trotz solch vielversprechender Ergebnisse muss man Vorsicht bei der Interpretation walten lassen: Beispielsweise verwendeten diese Untersuchungen typischerweise eine von bestimmten Laboratorien speziell entwickelte PCR, um eine

Hyper- oder Hypomethylierung der DNA zu erfassen. Dies bedeutet, dass die Überprüfung solcher Ergebnisse nicht einfach anderswo Anwendung finden können. Kritisch hinterfragt werden muss auch die Herkunft der mit diesem Verfahren detektierten DNA. Bis dato gibt es keinen Hinweis, ob diese von normalen sterbenden Zellen, von Krebszellen oder von beiden stammt.

Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien und/oder Metastasierung weisen tendenziell deutlich größere Mengen an zellfreier DNA auf

Das Auftreten von Veränderungen von zellfreier DNA in Plasma oder Serum, wie auch eine Erhöhung der Spiegel zellfreier DNA ist nicht mit einer bestimmten Tumorstelle, einem speziellen Tumortyp oder mit einem bestimmten Grading verbunden. Dies bedeutet, dass erhebliche weitere Forschungen notwendig sein werden, um Aussagen zu einer möglichen biologischen und tumorbiologischen Wertigkeit zellfreier DNA zu erhalten. Bislang belegt ist der Trend, dass Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien und/oder einer Metastasierung deutlich größere Mengen an zellfreier DNA aufweisen; weiterhin zeigten einige Untersuchungen, dass die Tumorsektion und damit die Verringerung der Tumormasse einhergeht mit verminderten DNA-Mengen im Serum [109]. Diese Ergebnisse stammen aus kleinen Patientenkollektiven und bedürfen ebenfalls weiterer Untersuchungen auch hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit [110].

Man nimmt an, dass jede Krebszelle ein eigenes Muster aktiver Gene und Proteine hat

Ein vielversprechendes Thema auf dem Gebiet der Biomarker in der Krebsforschung ist die Erarbeitung sogenannter Krebsprofile (Cancer Profiling). Dieser Bereich wächst rasant, da man sich Einfluss auf die Gesundheitsversorgung erhofft. In der Annahme, dass jede Krebszelle ein eigenes Muster aktiver Gene und Proteine hat, erhofft man sich so, ein Tumorprofil hinsichtlich verschiedener einzelner und/oder kombinierter Biomarker in einer Gewebeprobe erarbeiten zu können – einerseits um eine Diagnose zu erleichtern, andererseits um validere Informationen für die jeweilige Krebstherapie zu erhalten [111–113]. Wichtig ist es zu erforschen, welche Endprodukte einer veränderten Genexpression zu welchen zu veränderten Proteinen führen und auf welche Weise dies geschieht.

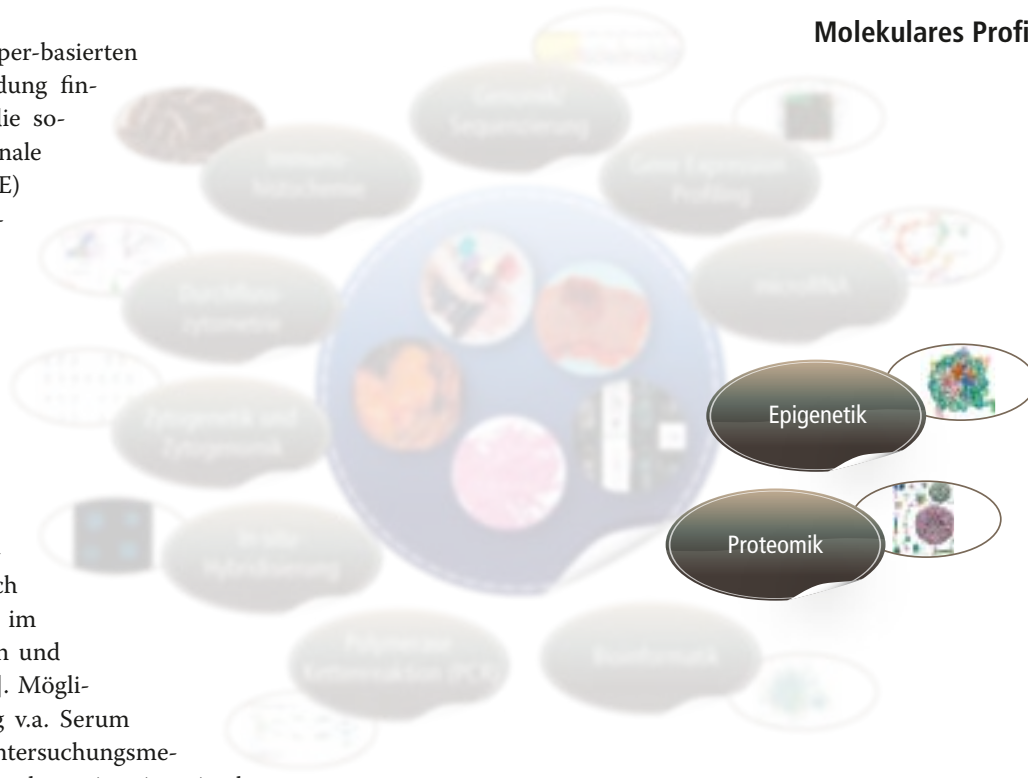
Fortschritte in der Massenspektroskopie (MS) ermöglichen es mittlerweile groß angelegte Untersuchungen des Proteoms durchzuführen. Damit sollen Proteine im Allgemeinen sowie spezifische Marker-Proteine in Geweben und Flüssigkeiten identifiziert werden. Derzeit kommen mehrere Plattformen und Technologien zur Anwendung, einschließlich der MS-

Molekulares Profiling

basierten und Antikörper-basierten Analyse. Häufig Anwendung finden in der Proteomik die sogenannte zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) und die Flüssigkeitschromatographie (LC) in Kombination mit der Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS/MS), hinzu kommen Microarrays und Immunhistochemie. Hier wird versucht, unterschiedliche Expressionen von Proteinen in Normalgewebe im Vergleich zu Krebsgewebe sowie im Proteom zu identifizieren und zu vergleichen [114–116]. Möglicherweise sind zukünftig v.a. Serum und Plasma bessere Untersuchungsmedien, weil diese leichter und weniger invasiv als Tumorgewebeproben gewonnen werden können – insbesondere im Hinblick auf Untersuchungen zum Ansprechen auf eine tumorspezifische Therapie [117, 118]. Weiterhin wurden spezifische Zelllinien entwickelt und analysiert, um so unterschiedlich exprimierte Proteine auch in vitro untersuchen zu können, da dies möglicherweise einfacher und schneller Ergebnisse für krebspezifische Biomarker zulässt [119, 120].

Mittlerweile wurden Hunderte von Proteinen bei verschiedenen Tumorentitäten und Zelllinien identifiziert

Hinsichtlich des Proteoms bei Tumorerkrankungen des oberen GI-Traktes wurde schon 2002 eine 2DE-Datenbank für gesundes menschliches Magengewebe etabliert [121]; die Autoren stellten mittels feinsten Zerkleinerung von Gewebepartikeln einen biologisch aktiven Gewebebrei (Homogenat), wie auch lösliche Fraktionen her, so dass mehr als 600 Proteinspots durch 2DE bestimmbar waren. 2010 identifizierte eine andere Arbeitsgruppe 134 Proteine mit Hilfe von 2DE und in Kombination mit LC-MS/MS-Plattformen aus normaler gastroduodenaler Flüssigkeit [122]. Solche Untersuchungen könnten wertvolle Ressourcen für die Entdeckung krankheitsspezifischer Proteine bieten, gerade wenn Normal- und Tumorgewebe vergleichend analysiert werden. Weiterhin kommen seit einem Jahrzehnt sogenannte Hochdurchsatz- und groß angelegte Proteomik-Technologien zur Anwendung, um spezifische Marker identifizieren zu können. Mittlerweile wurden Hunderte von Proteinen bei verschiedenen Tumorentitäten und Zelllinien identifiziert [114, 123–125].



Eine Vielzahl von ESCC-Proben wurde mit 2DE sowie kombiniert mit MS-Plattformen analysiert und mit Normalgewebe verglichen; es zeigte sich eine Überexpression in Tumorgewebeproben von TGM3 (Transglutaminase 3), Hsp70 (heat shock protein 70), TPM4-ALK Fusionsonkoproteins 2, Myosin-Leicht Polypeptid 6 Keratin (myosin light polypeptide 6 keratin) und Calreticulin I [115, 126]. Durch Antikörperbasierte Technologien konnte eine Überexpression von sich verklumpenden Proteinen, die nicht durch Benzimidazolen inhibierbar waren, mit folgenden Markern von Speiseröhrentumoren korreliert werden: BUBR1 (Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta), Mad2 (mitotic arrest deficient 2), NF-kappaB-Aktivierung Kinase, Caspase 10 ACTN (Actin-binding protein alpha-actinin 4), 67LR (67 kDa Laminin-Rezeptor), COX-2, p53, SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine), MSF (migration stimulating factor) und VEGF-C (Vascular endothelial growth factor C) [127–130].

Untersuchungen an Speiseröhrenkrebs-Zelllinien zeigten, dass nachfolgende Marker überexprimiert waren: Protein Hsp70, Peroxiredoxin-5, MLC-3 (non-muscle myosin light polypeptide 6), Keratin 1, Anxa4 (annexin A4), Keratin 8, tropomyosin 3, STIP1 (stress-induced-phosphoprotein 1), Albumin, Mortalin (=hsp70 protein 9B), SLC44A3 (solute carrier family 44 member 3), hnRNP L (heterogene nuclear ribonucleoprotein L), EIF4A2 (eukaryotic translation initiation factor 4A isoform 2), TPI (triosephosphate isomerase1), PRX1 (peroxiredoxin 1), FTCD (forminotransferase cyclodeaminase form), fibrinogen gamma-A chain precursor, kinesin-like DNA binding protein, lamin A/C, cyclophilin A (CypA) und der Transkriptionsfaktor MTSG1 [131–133].

Die chronische Inflammation ist wohl eine der wesentlichen Faktoren bei der Karzinogenese von Tumoren

Fasst man die Ergebnisse zusammen, zeigt sich, dass unterschiedliche Proteine in Tumoren des oberen GI-Traktes unterschiedlich exprimiert werden. Nur zwei Proteine, das apoC-I und apoC-III wurden erhöht im Serum von Patienten mit Magenkarzinom nachgewiesen [134]. Interessant ist, dass Serum Amyloid A (SAA), das normalerweise bei inflammatorischen Prozessen auffindbar ist, im Plasma von Ratten nachzuweisen war, nachdem diesen eine Magenkarzinom-Zelllinie SC-M1 injiziert wurde [135]. Auch dies verstärkt die These, dass die chronische Inflammation wohl eine der wesentlichen Faktoren bei der Karzinogenese von Tumoren darstellt [14, 15].

Groß angelegte Profiluntersuchungen zu möglichen Targets in der Proteomik sind im Gange, um ein leistungsfähiges Werkzeug zur Nutzung neuer Marker zu entwickeln. Verschiedene Arbeitsgruppen wenden unterschiedliche Technologien an, um ein Mapping neuer oberer GI-Trakt-Marker zu generieren. Später werden diese Ergebnisse unterschiedlicher Gruppen sich einem Abgleich unterziehen müssen, um solche Marker, die kaum eine Zuordnung zulassen, eliminieren zu können. Wie beschrieben, wurden eine Reihe hochregulierter Proteine bei Krebsarten identifiziert: Beim ESCC wurde ACTN4 und 67LR in den UICC-Stadien I bis III nachgewiesen; gerade ACTN4 war eher mit fortgeschrittenen Tumorstadien sowie einer Lymphknotenmetastasierung korreliert, wohingegen 67LR nicht vom Lymphknotenstatus abhängig zu sein scheint [128]. Der damalige Vorschlag beide Proteine/Marker (ACTN4 und 67LR) als mögliche Zusatzinformation für eine ESCC-Tumorklassifikationen zu nutzen, mag verfrüht erscheinen, ist jedoch nicht abwegig. Hier ist zu erwähnen, dass eine Überexprimierung von VEGF-C bei Adenokarzinomen des gastroösophagealen Übergangs stark mit fortgeschrittenen Tumorstadien und Lymphknotenmetastasierung korreliert und somit ein potentielle Biomarker einer lymphatischen Metastasierung sein könnte [130]. Ein wesentlicher Kritikpunkt am Einsatz quantitativer Assays ist die Tatsache, dass es keine weltweit gültigen Kriterien gibt – gerade wenn solche Assays nicht ELISA-basiert sind [119].

An der Oberfläche von humanen Ösophaguskrebs-Endothelzellen (HECEC = surface of human esophageal cancer endothelial cells) wurde MFS (migration-stimulating factor) identifiziert; die Anwendung eines MFS-Antikörpers resultierte in einer Unterdrückung von Migration und Adhäsion von HECEC auf einer Fibronectin-Matrix; ein Bio-Verteilungs-Assay deutete darauf hin, dass dieser Antikörper spezifisch mit humanisierten Blutgefäßen reagiert und das Tumorstadium durch Blockade einer Tumor-assoziierten Angiogenese hemmt, so dass anzunehmen ist, dass MSF eventuell Potential als anti-angiogenetisches Target beim Speiseröhrenkrebs hat [129].

Hsp70 ist sowohl in untersuchtem Tumorgewebe wie auch kultivierten Tumorzellen überexprimiert

Ein anderer prognostischer Marker könnte TGM3 (Transglutaminase 3) sein, gerade beim Auftreten von Rezidiven des ESCC [126]. Einen weiteren prognostisch relevanten Marker könnte ERCC1 (excision repair cross complementing group 1) bei der multimodalen Therapie von ESCC bilden [136]. Bemerkenswert ist, dass durch verschiedene Arbeitsgruppen aufgezeigt werden konnte, dass die Chaperone der Gruppe Hsp70 sowohl in untersuchtem Tumorgewebe wie auch kultivierten Tumorzellen überexprimiert ist [115, 132, 133]. Chaperone sind Proteine, die neu synthetisierte Proteine unterstützen, ihre korrekte Konformation zu entfalten und damit auch ihre Funktionsweise; Hsp70 nimmt eine wichtige Rolle bei der Bildung und dem Recycling von nukleo-zytoplasmatischen Transportrezeptoren ein, und zwar über eine direkte Interaktion mit dem Kernporenkomplex. Dadurch wirkt es direkt regulativ auf den Proteintransport zwischen Zellkern und Zytoplasma. Es gibt hierzu Berichte zur Überexpression bei Speiseröhrentumoren [115, 132, 133]. Weil Hsp70 auch bei der Progression von ESCC eine wichtige Rolle spielt, kann dies einen entsprechenden Einfluss auf transportierende Makromoleküle zwischen Zellkern und Zytoplasma haben und ebenso im Rahmen der Karzinogenese bei Speiseröhrenkrebs als möglicher Biomarker fungieren [115].

Juan et al. untersuchten separat fünf humane Krebs-Zelllinien in Mäusen (SC-M1, HONE-1, CC-M1, OECM1, GBM 8401) [135]; nach Inkubation wurde Plasma gewonnen, analysiert und verglichen mit Kontroll-Mäusen (Injektionen mit Phosphat-gepuffert Kochsalzlösung): Es zeigten sich auch hier Erhöhungen von Akute-Phase-Proteine im Plasma der Krebsmäuse. Ein Unterschied war, dass der Marker SAA bei einer Magenkarzinom-Zelllinie (SC-M1) überexprimiert war, mit der Annahme, dass dieses Protein ein möglicher spezifischer Biomarker für Patienten mit Magenkarzinom darstellen könnte [135].

Beim Speiseröhrenkrebs sind die Proteine, Periplakin und Clusterin im Vergleich zu Normalgewebe fast komplett herunterreguliert

Die signifikante Zunahme neuentdeckter Proteine und deren Namensgebungen ist per se schon eine Herausforderung. Man findet nicht nur eine Heraufregulation, sondern auch eine Herunterregulierung von Proteinen beim Speiseröhrenkrebs, wie beispielsweise PSMA3 (subunit alpha type-3 of proteasome), CAPNS1 (calpain small subunit 1), eIF5A-1 (eukaryotic translation initiation factor 5A1), S100-A8 protein (ein Kalzium und Zink bindendes Protein), ANXA1 (annexin A1), ANXA2 (annexin A2), regulatory subunit of dehydrogenase 1calpain, Glutamat, HDAC10 (histone deacetylase

10 isoform beta), ERP60 (disulfide-isomerase ER-60 precursor), TMBeta (beta-tropomyosin), MYL2 (myosin light chain 2) (und seiner Isoforme), MLC-2, RLC regulatory light chain myosin, myosin regulatory light chain 2) und PRCDX2 (peroxyredoxin 2) [115, 131-133].

Beim Speiseröhrenkrebs wurde deutlich, dass zwei Proteine, Periplakin (Bestandteil von Desmosomen und der Epidermis) und Clusterin (wichtig zur Protein-Faltung), im Vergleich zu Normalgewebe fast komplett herunterreguliert sind [137, 138]. Berücksichtigt werden muss indes, dass beide Publikationen nicht über quantifizierte Daten berichten, sondern aufgrund von Western-Blot- und Immunhistochemie-Untersuchungen Schlussfolgerungen ziehen. Vermutlich wäre mit einer Bestimmung von quantifizierbaren Werten – und der Untersuchung des Normalgewebes – die Wertigkeit eines Markers und damit der wissenschaftliche Nutzen einer solchen Untersuchung höherrangig.

Von großer Bedeutung ist weiterhin, wo genau solche Marker in Über- und/oder Unter-Expriemierung gefunden werden

Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Werte von Periplakin sich verschoben haben – weg von der Zell-Zell-Grenze von normalen epithelialen Zellen hin zum Zytoplasma epithelialer Zellen von Krebszellen der Speiseröhre bei Frühkarzinomen, sie verschwanden jedoch nahezu komplett bei fortgeschrittenen Tumoren [137]. Auch wenn man bereits jetzt hofft, dieses Protein als diagnostischen Marker für eine Krebsklassifikation nutzen zu können, sind dazu Definitionen der Wertigkeit entsprechender Proteine auch seitens ihrer Halbwertszeiten und anderer Einflussgrößen zu fordern. Mehrere Gruppen haben unterschiedliche potentielle Biomarker an Tumoren des oberen GI-Traktes untersucht. Es ist von hoher Relevanz, dass zur Evaluation folgende Punkte Berücksichtigung finden:

- Die Spezifität des Auftretens dieser Proteine.
- Die Verfügbarkeit eines möglichen Medikamentes und der Zugang dazu.
- Identifizierung und Quantifizierung eines definierten klinischen Nutzens.
- Eine weltweite Standardisierung verschiedener diagnostischer Methoden sowie der zu untersuchenden Biorepositoren.

Ausschließliche Folgeuntersuchungen und/oder Validierungsüberprüfungen – wie in der Wissenschaft üblich – werden hier nicht ausreichen. Wie teilweise bereits durchgeführt, müssen zudem verschiedene Immunoassays die Anwesenheit von potentiellen Biomarkern an subzellulären Orten in unterschiedlichen Krebs-Geweben nachweisen. Dies wurde bei hochregulierten Proteinen, wie ACTN4, 67LR, VEGF_C, BubR1, Mad2, SAA, TGM3 und MSF durchgeführt; die beiden Letzteren wurden schon einer Funktionsanalyse unterzogen [126–129, 135]. Herunterregulierte Proteine beim

Speiseröhrenkrebs und/oder entsprechenden Zelllinien sind ANXA1, Keratin 8, ANXA2 und Periplakin [131, 133, 137]. Funktionsanalysen hierzu stehen noch aus.

Eine wesentliche potentielle Störgröße bei Untersuchungen von Serum/Plasma sind beispielsweise Verunreinigungen oder Konzentrationsverminderungen

Aufgrund der Verfügbarkeit und der Kosten wurde nicht jedes Protein/jeder Proteinmarker getestet – geschweige denn validiert und/oder klassifiziert. Dies bedeutet, dass in Folgeschritten eine (Tumor-)biologische Relevanz erst noch erarbeitet werden muss. Eine ebenfalls sehr große Herausforderung für die Identifikation eines Proteins als potentieller Biomarker in einem groß angelegten Protein-Profilung sind einzelne Aminosäuren-Mutationen und/oder kleine Insertionen und/oder Deletionen im kodierenden Gen. Selbstverständlich sind Methoden, wie ELISA, Western Blotting und Immunhistochemie hoch spezifisch für eine Analyse von Protein-Protein-Interaktionen, doch Mutationen, Insertionen und Deletionen sind nicht so einfach detektierbar. Dies bedeutet wiederum, dass eine enorme Anzahl von Antikörpern erzeugt werden muss und jede einzelne Kombinationsmöglichkeit von Mutationen, jede Konversion solcher Mutationen in ihrer 2D- und auch 3D-Struktur sowie die Epitop-Struktur aufgedeckt werden sollten.

Einfach und klinisch praktikabel gewinnbares Material sind Serum und Plasma. Wesentliche Herausforderung sind hier die für eine Quantifizierung fast aller Protein-Biomarker extrem niedrigen Konzentrationen im Verhältnis von etwa $1:10^7$, d. h. ng/ml von Krebs verwandter Proteine versus mg/ml an Albumin [139, 140]. Auch wenn mittlerweile bekannt ist, dass ungefähr 99 Prozent der Proteinmasse in Proben aus im Wesentlichen 20 Proteinen besteht, ist es wichtig, für die Entdeckung zukünftiger Protein-Marker im Serum/Plasma mit Hilfe von Hochdurchsatz-Proteomik-Technologien Störgrößen zu eliminieren. Eine wesentliche potentielle Störgröße sind beispielsweise Verunreinigungen oder Konzentrationsverminderungen, so dass zuvor eine Proteinseparation erfolgen sollte, um eine geringere Wertigkeit solcher Analysen auszuschließen.

Ein weiterer biologisch relevanter Faktor ist, unter welchen Bedingungen, wann und/oder wie Marker-Proteine in die interzelluläre oder Blutzirkulation gelangen; von Bedeutung ist zudem, ebenso welchen biologischen Prozessen diese unterworfen sind, die je nach Lokalisation möglicherweise unterschiedliche Halbwertszeiten der Marker bedingen; wenn beispielsweise eine Halbwertszeit extrem kurz wäre, wäre der Nachweis im Serum fast unmöglich [141].

Die Suche nach neuen Biomarkern ist sicherlich ein wichtiger Schritt zur Verbesserung der Krebsfrüherkennung und Grundlage für zukünftige Therapien. Das Human Proteom Projekt mit seinem großangelegten Protein-Profilung wird hier sicherlich von hoher Bedeutung sein. Bereits heute ha-

ben verschiedene internationale Laboratorien mittlerweile mehr als 3020 Proteine entdeckt [142–144]. Auf welche Weise die Proteomik auf unser Verständnis der Krebsentstehung und seines Fortschreitens nehmen wird, hängt zukünftig viel eher davon ab, möglichst präzise Fragestellungen und Anforderungen zu entwickeln, als – wie bis dato meist üblich – davon, eine ganz bestimmte Nadel im Heuhaufen zu suchen; zumal das Aussehen einer solchen Nadel unbekannt ist. |||

Literatur Das Literaturverzeichnis zum Beitrag finden Sie unter www.chirurgische-allgemeine.de

Prof. Dr. med. Björn Brücher
Chirurgische Klinik, Carl-Thiem-Klinikum
Thiemstraße 111, 03048 Cottbus
✉ b-bruecher@gmx.de

Unterstützung. Das Manuskript wurde unterstützt durch die Theodor-Billroth-Akademie® (TBA®) und INCORE (International Consortium of Research Excellence) der TBA®.

Hervorheben möchten wir die zu Beginn dieses Projektes vorhandene Unterstützung durch Dr. Vlado Antonic, PhD, University of Maryland, USA, bei der primären Sichtung der Literatur; aufgrund eines Stellenwechsels war ihm leider keine weitere Mitarbeit möglich. Ebenso zu erwähnen sind Vlado Matveev, Ray Perkins und Peter Shimon. Zudem trugen fortlaufende wissenschaftliche Diskussionen von mehr als 2900 Mitgliedern der Theodor-Billroth-Academy®-Webgroup in LinkedIn zu einer differenzierten Sichtweise der komplexen Thematik bei.

Verwendete Abkürzungen

2DE	two-dimensional gel electrophoresis	LINE-1	long interspersed element 1
67LR	67 kDa laminin receptor	LnCap	cell line: epithelial prostate cancer cell line
A3B	apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B (=APOBEC3B)	LPs	luminal progenitors
ACTN4	activator protein-1, alpha-actinin 4	LTRs	long terminal transposable retroposons
AEG	adenocarcinoma of the esophago-gastral junction	LINE	long interspersed elements
AJCC	American Joint Cancer Committee	Mad2	mitotic arrest deficient-like 1
APOBEC3B	apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B (= A3B)	miR	micro RNA (=miRNA)
B-cell ALL	acute lymphoblastic B-cell leukemia	miRNA	micro RNA (=miR)
BCs	basal cells	MCF-7L	human breast cancer adenocarcinoma cell line
BRCA1	breast cancer 1, early onset	MS	mass spectrometry
BRCA2	breast cancer 2, early onset	MSF	migration-stimulating factor
BubR1	benzimidazoles 1 homolog beta	NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
C	cytosine bases	NOD-SCID	non-obese diabetic – severe combined immunodeficiency mice; immunodeficient mice with lack of mature T-cells, B-cells and natural killer (NK) cells
CpGs	CpG dinucleotides	ONVs	somatic oligonucleotide variations
CpG-islands	methylation of clusters of CpGs	p21	protein 21, cyclin-dependent kinase inhibitor 1 or CDK-interacting protein 1
CD9	cell surface glycoprotein encoded by CD9 gene	p53	Tumor protein p53 (= TP53)
COX-2	cyclooxygenase-2 (=Prostaglandin G/H synthetase 2)	PCR	polymerase chain reaction
CSCs	cancer stem cells	PDCD4	programmed cell death protein 4
Cyclin D1	G1/S-specific Cyclin D1	PGE2	COX-2 dependent prostaglandin E2
CypA	cyclophilin A	PIK3CA	phosphatidylinositol-45-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
dbSNP	single nucleotide polymorphism database	PIK3CA-YFP	PIK3CA yellow fluorescent protein
DNA	deoxyribonucleic acid	PKC	protein kinase C
DNVs	somatic di-nucleotide variations	PRX1	peroxiredoxin1
DSMZ	Leibnitz Institute DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures	PTK6	protein tyrosine kinase 6
ERCC1	excision repair cross complementing group 1	qRT-PCR	quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction
ERG	ETS related gene	Rab25	Ras related protein Rab-25
ESCC	esophageal squamous cell carcinomas	RFLPs	restriction fragment length polymorphisms
ETS	E26 transformation-specific or E-twenty-six transcription factor family	SCs	stromal cells
ETV1	ETS translocation variant 1	SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results database
FTCD	forminotransferase cyclodeaminase form (FTCD)	SFRP1	Wnt modulator secreted frizzled-related protein 1
GI	gastrointestinal	SINDELs	small insertions and deletions
HECECs	human esophageal cancer endothelial cells	SINEs	short interspersed elements
hnRNP L	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	SNPs	single-nucleotide polymorphisms
HSCs	hematopoietic stem cells	SPARC	secret protein acidic and rich in cysteine
Hsp70	heat shock protein 70	SSNVs	somatic single nucleotide variations
IC50	half maximal inhibitory concentration	TCF/LEF	transcription family group binding to DNA
IHC	immunohistochemistry	TGM3	transglutaminase 3
IKKB	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta (= IκK-beta)	TMbeta	beta-tropomyosin
IκK	inhibitor of κK kinase	TNF	tumor necrosis factor
IL-1B	Interleukin 1 beta	TNVs	somatic tri-nucleotide variations
JAK-3	Janus-activated kinase	TP53	Tumor protein p53 (= p53)
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene	TP53-GFP	p53 green fluorescent protein
LAQ824	a small molecule histone deacetylase inhibitor	TPI	triosephosphate isomerase1
LC	liquid chromatography	TPM4-ALK	TPM4-ALK fusion oncoprotein 2
LC/MS/MS	tandem mass spectrometry	VCaP	cell line: vertebral cancer of the prostate
LCs	luminal cells	VEGF-C	vascular endothelial growth factor C
		Wnt	beta-catenin signaling pathway

Literatur zum Artikel

Biotechnologie und Krebs

- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013) Cancer statistics 2013. *CA Cancer J Clin* 63: 11–30
- Saedi B, Razmpa E, Sadeghi M, et al (2009) The epidemiology of laryngeal cancer in a country on the esophageal cancer belt. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 61: 213–217
- Tran GD, Sun XD, Abnet CC, et al (2005) Prospective study of risk factors for esophageal and gastric cancers in the Linxian general population trial cohort in China. *Int J Cancer* 113: 456–463
- Brücher BL, Kitajima M, Siewert JR (2014) Undervalued criteria in the evaluation of multimodal trials for upper GI cancers. *Cancer Invest* 32: 497–506
- Liu SZ, Wang B, Zhang F, et al (2013) Incidence, survival and prevalence of esophageal and gastric cancer in Linzhou City from 2003 to 2009. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 6031–6034
- Jemal A, Murray T, Ward E, et al (2005) Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 55: 10–30
- Solaymani-Dodaran M, Card TR, West J (2013) Cause-specific mortality of people with Barrett's esophagus compared with the general population: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 144: 1375–1383
- Lee JH, Kim KM, Cheong JH, et al (2012) Current management and future strategies of gastric cancer. *Yonsei Med J* 53: 248–257
- Marshall BJ (1985) The pathogenesis of non-ulcer dyspepsia. *Med J Aust* 143: 319
- Pisani P, Parkin DM, Muñoz N, et al (1997) Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6: 387–400
- Conlin VS, Curtis SB, Zhao Y, et al (2004) *Helicobacter pylori* infection targets adherens junction regulatory proteins and results in increased rates of migration in human gastric epithelial cells. *Infect Immun* 72: 5181–5192
- Dorward DW, Garon CF (1989) DNA-binding proteins in cells and membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 171: 4196–4201
- Aravindan N, Aravindan S, Pandian V, et al (2014) Acquired tumor cell radiation resistance at the treatment site is mediated through radiation-orchestrated intercellular communication. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 88: 677–685
- Brücher BLD, Jamall IS (2014) Epistemology of the origin of cancer: a new paradigm. *BMC Cancer* 14: 331
- Brücher BLD, Jamall IS (2014) Cell-cell communication in tumor microenvironment, carcinogenesis and anticancer treatment. *Cell Physiol Biochem* 34: 213–243
- Zhang Y, Pan KF, Zhang L, et al (2015) *Helicobacter pylori*, cyclooxygenase-2 and evolution of gastric lesions: results from an intervention trial in China. *Carcinogenesis* 36: 1572–1579
- Blattner WA (1999) Human retroviruses: their role in cancer. *Proc Assoc Am Physicians* 111: 563–572
- Parkin DM (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118: 3030–3044
- Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF (1996) The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14800–14803
- Brücher BLD, Lyman G, van Hillegersberg R, et al (2014) Imagine a world without cancer. *BMC Cancer* 14: 186
- Balogh LP (2015) Caging cancer. *Nanomedicine* 11: 867–869
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, et al (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 56: 341–361
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263–273
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491
- Bernard PS, Wittwer CT (2002) Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* 48: 1178–1185
- Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, et al (2006) An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res* 34: e42
- Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29: 23–39
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, et al (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6: 279–284
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al (2013) Cancer genome landscapes. *Science* 339: 1546–1558
- Tomasetti CB, Vogelstein B, Parmigiani G (2013) Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 1999–2004
- Martin-Lorenzo A, Hauer J, Vicente-Duenas C, et al (2015) Infection exposure is a causal factor in B-precursor acute lymphoblastic leukemia as a result of Pax5 inherited susceptibility. *Cancer Discov* 5: 1328–1343
- Nguyen LV, Makarem M, Carles A, et al (2014) Clonal analysis via barcoding reveals diverse growth and differentiation of transplanted mouse and human mammary stem cells. *Cell Stem Cell* 14: 253–263
- Harris R, Law E, Sieuwerts A, et al (2015) Tamoxifen resistance driven by the DNA cytosine deaminase APOBEC3B in recurrent estrogen receptor positive breast cancer. *San Antonio Breast Cancer Symposium (SABC)*; Abstract S4–07
- Ling S, Hu Z, Yang Z, et al (2015) Extremely high genetic diversity in a single tumor points to prevalence of non-Darwinian cell evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E6496–E6505
- Vu V, Verster AJ, Schertzberg M, et al (2015) Natural variation in gene expression modulates the severity of mutant phenotypes. *Cell* 162: 391–402
- Cvijovic I, Good BH, Jerison ER, et al (2015) Fate of a mutation in a fluctuating environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E5021–E5028
- Supek F, Lehner B (2015) Differential DNA mismatch repair underlies mutation rate variation across the human genome. *Nature* 521: 81–84
- Holstege H, Pfeiffer W, Sie D (2014) Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-yr-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis. *Genome Res* 24: 733–742
- Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, et al (2014) Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumor types. *Nature* 505: 495–501
- Rosenfeld S (2013) Are the somatic mutation and tissue organization field theories of carcinogenesis incompatible? *Cancer Inform* 12: 221–229
- Versteeg R (2014) Cancer: tumours outside the mutation box. *Nature* 506: 438–439
- Mack SC, Witt H, Piro RM, et al (2014) Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. *Nature* 506: 445–450
- Parker M, Mohankumar KM, PUNCHIHEWA C, et al (2014) C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF- κ B signalling in ependymoma. *Nature* 506: 451–455
- Huang CP, Cheng CM, Su HL, et al (2015) Syndecan-4 promotes epithelial tumor cells spreading and regulates the turnover of PKC α activity under mechanical stimulation on the elastomeric substrates. *Cell Physiol Biochem* 36: 1291–1304
- Beerenwinkel N, Antal T, Dingli D, et al (2007) Genetic progression and the waiting time to cancer. *PLoS Comput Biol* 3: e225
- Tuch BB, Laborde RR, Xu X, et al (2010) Tumor transcriptome sequencing reveals allelic expression imbalances associated with copy number alterations. *PLoS One* 5: e9317
- Pflueger D, Terry S, Sboner A, et al (2011) Discovery of non-ETS gene fusions in human prostate cancer using next-generation RNA sequencing. *Genome Res* 21: 56–67
- Ma S, Bao JY, Kwan PS, et al (2012) Identification of PTK6, via RNA sequencing analysis, as a suppressor of esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterology* 143: 675–686, e1–12
- Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, et al (2009) Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature* 458: 97–101

50. Hu X, MacDonald DM, Huettnner PC, et al (2009) A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 114: 457–464
51. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854
52. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, et al (2007) Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 39: 673–677
53. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al (2005) Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37: 766–770
54. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2257–2261
55. Budhu A, Jia HL, Forgues M, et al (2008) Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 47: 897–907
56. Zhao Y, Jia HL, Zhou HJ, et al (2009) Identification of metastasis-related microRNAs of hepatocellular carcinoma in hepatocellular carcinoma cell lines by quantitative real time PCR. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 17: 526–530
57. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, et al (2007) Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 120: 1046–1054
58. Cheng H, Shi S, Cai X, et al (2012) microRNA signature for human pancreatic cancer invasion and metastasis. *Exp Ther Med* 4: 181–187
59. Brendle A, Lei H, Brandt A, et al (2008) Polymorphisms in predicted microRNA-binding sites in integrin genes and breast cancer: ITGB4 as prognostic marker. *Carcinogenesis* 29: 1394–1399
60. Sung H, Jeon S, Lee KM, et al (2012) Common genetic polymorphisms of microRNA biogenesis pathway genes and breast cancer survival. *BMC Cancer* 12: 195
61. He H, Jazdzewski K, Li W, et al (2005) The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 19075–19080
62. Calin GA, Pekarsky Y, Croce CM (2007) The role of microRNA and other non-coding RNA in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 20: 425–437
63. Feber A, Xi L, Luketich JD, et al (2008) MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 135: 255–260
64. Mishima T, Akagi I, Miyashita M, et al (2009) Study of MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Nippon Med Sch* 76: 43
65. Hu Y, Correa AM, Hoque A, et al (2011) Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer. *Int J Cancer* 128: 132–143
66. Shinozuka E, Miyashita M, Mizuguchi Y, et al (2013) SnoN/SKIL modulates proliferation through control of hsa-miR-720 transcription in esophageal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 430: 101–106
67. Mathé EA, Nguyen GH, Bowman ED, et al (2009) MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival. *Clin Cancer Res* 215: 6192–6200
68. Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, et al (2009) MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 15: 1915–1922.
69. Guo Y, Chen Z, Zhang L, et al (2008) Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 68: 26–33
70. Mori Y, Ishiguro H, Kuwabara Y, et al (2009) MicroRNA-21 induces cell proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2: 235–239
71. Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, et al (2000) Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 515–547
72. Agrawal GK, Jwa NS, Lebrun MH, et al (2010) Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics* 10: 799–827
73. Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, et al (2011) Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 105: 104–111
74. Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, et al (2012) Serum microRNA-21 is a novel biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 106: 188–192
75. Yu Y, Kanwar SS, Patel BB, et al (2012) MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGFbetaR2) in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 33: 68–76
76. Ng R, Song G, Roll GR, et al (2012) A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration. *J Clin Invest* 122: 1097–1108
77. Wang XC, Zhang ZB, Wang YY, et al (2013) Increased miRNA-22 expression sensitizes esophageal squamous cell carcinoma to irradiation. *J Radiat Res* 54: 401–408
78. Allawi HT, Dahlberg JE, Olson S, et al (2004) Quantitation of microRNAs using a modified Invader assay. *RNA* 10: 1153–1161
79. Neely LA, Patel S, Garver J, et al (2006) A single-molecule method for the quantitation of microRNA gene expression. *Nat Methods* 3: 41–46
80. Fassan M, Volinia S, Palatini J, et al (2011) MicroRNA expression profiling in human Barrett's carcinogenesis. *Int J Cancer* 129: 1661–1670
81. Nelson PT, Baldwin DA, Kloosterman WP, et al (2006) RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA* 12: 187–191
82. Li J, Li X, Li Y, et al (2013) Cell-specific detection of miR-375 downregulation for predicting the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma by miRNA in situ hybridization. *PLoS One* 8: e53582
83. Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3: e85
84. Krek A, Grün D, Poy MN, et al (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37: 495–500
85. Brodersen P, Voinnet O (2009) Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 141–148
86. Scott GK, Mattie MD, Berger CE, et al (2006) Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res* 66: 1277–1281
87. Da Cunha AB (1949) Genetic analysis of the polymorphism of color pattern in *Drosophila* polymorphia. *Evolution* 3: 239–251
88. National Center for Biotechnology Information, United States National Library of Medicine (2013) NCBI dbSNP build 138 for human: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mailman/pipermail/dbsnp-announce/2013q3/000133.html>
89. Xue Y, Wang Q, Long Q, et al (2009) Human Y chromosome base-substitution mutation rate measured by direct sequencing in a deep-rooting pedigree. *Curr Biol* 19: 1453–1457
90. Human Genome Project (2013) http://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/project/info.shtml
91. Ensemble database at the European Bioinformatics Institute (EBI) and Wellcome Trust Sanger (2013) http://useast.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=1
92. Watson JD, Baker TA, Bell SP, et al (2004) *Molecular biology of the gene*; 5th ed. Pearson/Benjamin Cummings San Francisco
93. Brouha B (2003) Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Nat Acad Sci* 100: 5280–5285
94. Bennett EA, Keller H, Mills RE, et al (2008) Active Alu retrotransposons in the human genome. *Genome Res* 18: 1875–1883
95. Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, et al (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Rev Genetics* 8: 973–982
96. Ju YS, Tubio JM, Mifsud W, et al (2015) Frequent somatic transfer of mitochondrial DNA into the nuclear genome of human cancer cells. *Genome Res* 25: 814–824
97. Projectmanagement (2013) Requirements management for big data projects. <http://www.projectmanagement.com/articles/279834/Requirements-Management-for-Big-Data-Projects>
98. Dupont C, Armant DR, Brenner CA (2009) Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med* 27: 351–357
99. Herman JG, Baylin SB (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349: 2042–2054
100. Nie K, Zhang T, Allawi H, et al (2010) Epigenetic down-regulation of the tumor suppressor gene PRDM1/Blimp-1 in diffuse large B cell lymphomas: a potential role of the microRNA let-7. *Am J Pathol* 177: 1470–1479
101. Kaz AM, Grady WM (2012) Epigenetic biomarkers in esophageal cancer. *Cancer Lett* 342: 193–199
102. Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31: 27–36.
103. Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, et al (2001) Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 61: 3410–3418

104. Hibi K, Taguchi M, Nakayama H, et al (2001) Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7: 3135–3138
105. Meng Y, Wang QG, Wang JX, et al (2011) Epigenetic inactivation of the SFRP1 gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Dig Dis Sci* 56: 3195–3203
106. Meng XY, Zhu ST, Zong Y, et al (2011) Promoter hypermethylation of cyclooxygenase-2 gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 24: 444–449
107. Tong M, Chan KW, Bao JY, et al (2012) Rab25 is a tumor suppressor gene with antiangiogenic and anti-invasive activities in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 72: 6024–6035
108. Xie L, Bourne PE (2015) Developing multi-target therapeutics to fine-tune the evolutionary dynamics of the cancer ecosystem. *Front Pharmacol* 6: 1–5
109. Banki F, Mason RJ, Oh D, et al (2007) Plasma DNA as a molecular marker for completeness of resection and recurrent disease in patients with esophageal cancer. *Arch Surg* 142: 533–538
110. Hauser S, Kogej M, Fechner G, et al (2012) Cell-free serum DNA in patients with bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *Anticancer Res* 32: 3119–3124
111. Martini M, Vecchione L, Siena S, et al (2011) Targeted therapies: how personal should we go? *Nat Rev Clin Oncol* 9: 87–97
112. Heng HH, Stevens JB, Bremer SW, et al (2011) Evolutionary mechanisms and diversity in cancer. *Adv Cancer Res* 112: 217–253
113. Stepanenko AA, Vassetzky YS, Kavsan VM (2013) Antagonistic functional duality of cancer genes. *Gene* 529: 199–207
114. Qi Y, Chiu JF, Wang L, et al (2005) Comparative proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma. *Proteomics* 5: 2960–2971
115. Jazii FR, Najafi Z, Malekzadeh R, et al (2006) Identification of squamous cell carcinoma associated proteins by proteomics and loss of beta tropomyosin expression in esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 12: 7104–7112
116. Schaaij-Visser TB, Graveland AP, Gauci S, et al (2009) Differential proteomics identifies protein biomarkers that predict local relapse of head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 15: 7666–7675
117. Wang LD, Wang DC, Zheng S, et al (2006) Serum proteomic profiles of the subjects with esophageal precancerous and cancerous lesions from Linzhou, an area with high incidence of esophageal cancer in Henan Province, Northern China. *Ai Zheng* 25: 549–554
118. Gourin CG, Zhi W, Adam BL (2009) Proteomic identification of serum biomarkers for head and neck cancer surveillance. *Laryngoscope* 119: 1291–1302
119. Voskuil J (2015) How difficult is the validation of clinical biomarkers? *F1000Res* 4: 101
120. Ferreira R, Oliveira P, Martins T, et al (2015) Comparative proteomic analyses of urine from rat urothelial carcinoma chemically induced by exposure to N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. *Mol Biosyst* 11: 11594–11602
121. Ha GH, Lee SU, Kang DG, et al (2002) Proteome analysis of human stomach tissue: separation of soluble proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and identification by mass spectrometry. *Electrophoresis* 23: 2513–2524
122. Paulo JA, Lee LS, Wu B, et al (2010) Proteomic analysis of endoscopically (endoscopic pancreatic function test) collected gastroduodenal fluid using in-gel tryptic digestion followed by LC-MS/MS. *Proteomics Clin Appl* 4: 715–725
123. Chung JY, Braunschweig T, Hu N, et al (2006) A multiplex tissue immunoblotting assay for proteomic profiling: a pilot study of the normal to tumor transition of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 1403–1408
124. Du XL, Hu H, Lin DC, et al (2007) Proteomic profiling of proteins dysregulated in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. *J Mol Med (Berl)* 85: 863–875
125. Kashyap MK, Harsha HC, Renuse S, et al (2010) SILAC-based quantitative proteomic approach to identify potential biomarkers from the esophageal squamous cell carcinoma secretome. *Cancer Biol Ther* 10: 796–810
126. Uemura N, Nakanishi Y, Kato H, et al (2009) Transglutaminase 3 as a prognostic biomarker in esophageal cancer revealed by proteomics. *Int J Cancer* 124: 2106–2115
127. Uemura N, Nakanishi Y, Kato H, et al (2009) Antibody-based proteomics for esophageal cancer: identification of proteins in the nuclear factor-kappaB pathway and mitotic checkpoint. *Cancer Sci* 100: 1612–1622
128. Fu L, Qin YR, Xie D, et al (2007) Identification of alpha-actinin 4 and 67 kDa laminin receptor as stage-specific markers in esophageal cancer via proteomic approaches. *Cancer* 110: 2672–2681
129. Hu H, Ran Y, Zhang Y, et al (2009) Antibody library-based tumor endothelial cells surface proteomic functional screen reveals migration-stimulating factor as an anti-angiogenic target. *Mol Cell Proteomics* 8: 816–826
130. Xie LX, Zhai TT, Yang LP, et al (2013) Lymphangiogenesis and prognostic significance of vascular endothelial growth factor C in gastro-oesophageal junction adenocarcinoma. *Int J Exp Pathol* 94: 39–46
131. Moghanibashi M, Jazii FR, Soheili ZS, et al (2012) Proteomics of a new esophageal cancer cell line established from Persian patient. *Gene* 500: 124–133
132. Moghanibashi M, Rastgar Jazii F, Soheili ZS, et al (2013) Esophageal cancer alters the expression of nuclear pore complex binding protein Hsc70 and eIF5A-1. *Funct Integr Genomics* 13: 253–260
133. Qi YJ, He QY, Ma YF, et al (2008) Proteomic identification of malignant transformation-related proteins in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cell Biochem* 104: 1625–1635
134. Cohen M, Yossef R, Erez T, et al (2011) Serum apolipoproteins C-I and C-III are reduced in stomach cancer patients: results from MALDI-based peptidome and immuno-based clinical assays. *PLoS One* 6(1): e14540
135. Juan HF, Chen JH, Hsu WT, et al (2004) Identification of tumor-associated plasma biomarkers using proteomic techniques: from mouse to human. *Proteomics* 4: 2766–2775
136. Metzger R, Bollschweiler E, Holscher AH, et al (2010) ERCC1: impact in multimodality treatment of upper gastrointestinal cancer. *Future Oncol* 6: 1735–1749
137. Nishimori T, Tomonaga T, Matsushita K, et al (2006) Proteomic analysis of primary esophageal squamous cell carcinoma reveals downregulation of a cell adhesion protein, periplakin. *Proteomics* 6: 1011–1018
138. Zhang LY, Ying WT, Mao YS, et al (2003) Loss of clusterin both in serum and tissue correlates with the tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via proteomics approaches. *World J Gastroenterol* 9: 650–654
139. Anderson NL, Anderson NG (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 1: 845–867
140. Hortin GL, Sviridov D, Anderson NL (2008) High-abundance polypeptides of the human plasma proteome comprising the top 4 logs of polypeptide abundance. *Clin Chem* 54: 1608–1616
141. Wang P, Whiteaker JR, Paulovich AG (2009) The evolving role of mass spectrometry in cancer biomarker discovery. *Cancer Biol Ther* 8: 1083–1094
142. Omenn GS, States DJ, Adamski M, et al (2005) Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics* 5: 3226–3245
143. Haab BB, Geierstanger BH, Michailidis G, et al (2005) Immunoassay and antibody microarray analysis of the HUPO Plasma Proteome Project reference specimens: systematic variation between sample types and calibration of mass spectrometry data. *Proteomics* 5: 3278–3291
144. Rai AJ, Gelfand CA, Haywood BC, et al (2005) HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics* 5: 3262–3277
145. Neimark J (2014) The dirty little secret in cancer research. 2nd Oct: <http://discovermagazine.com/2014/nov/20-trial-and-error>
146. Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12: 264–265
147. Jenkin HM, Hung SC (1967) Effect of vancomycin on the growth of psittacosis-chromia agents cultivated in eggs and cell culture. *Appl Microbiol* 15: 10–12
148. Dirks WG1, Drexler HG (2011) Online verification of human cell line identity by STR DNA typing. *Methods Mol Biol* 731: 45–55
149. Ando T, Ishiguro H, Kuwabara Y, et al (2008) Relationship between expression of 5-fluorouracil metabolic enzymes and 5-fluorouracil sensitivity in esophageal carcinoma cell lines. *Dis Esophagus* 21: 15–20
150. Domcke S, Sinha R, Levine DA, et al (2013) Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun* 4: 1–10
151. Van Noorden R (2015) Interdisciplinary research by the numbers. *Nature* 525: 306–307
152. Begley CG, Ellis LM (2012) Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 483: 531–533