

**Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)**

Bedeutung des Exonuklease-1 Gens für familiär auftretende Magen- und Kolonkarzinome

Julia Schips

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 01.03.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.07.2005 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungen.....	3
2.	Einleitung.....	4
2.1	Kolonkarzinom.....	4
2.1.1	Epidemiologie.....	4
2.1.2	Klassifikation.....	4
2.2	Das HNPCC-Syndrom.....	6
2.2.1	Definition des HNPCC.....	6
2.2.2	Klinik und Prognose.....	6
2.2.3	Histopathologie der HNPCC assoziierten Karzinome.....	10
2.2.4	Molekulargenetik.....	11
2.2.4.1	Mikrosatelliteninstabilität.....	12
2.2.4.2	DNA-Mismatch-Reparatur.....	13
2.3	Magen-Karzinom.....	15
2.3.1	Epidemiologie.....	15
2.3.2	Klassifikation.....	15
2.3.3	Klinik und Prognose.....	16
2.3.4	Magenkarzinom im Rahmen hereditärer Tumorerkrankungen.....	17
2.4	Exonuklease 1.....	18
2.5	LOH (loss of heterozygosity).....	20
3.	Aufgabenstellung.....	21
4.	Material und Methoden.....	22
4.1	Geräte.....	22
4.2	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	23
4.3	Puffer und Lösungen.....	24
4.4	Patientenkollektiv.....	25
4.5	DNA-Extraktion.....	28
4.5.1	Isolierung aus Blut.....	28
4.5.2	Isolation aus Paraffinschnitten.....	30
4.5.3	Photometrische Bestimmung der DNA-Menge und Verdünnung zur Gebrauchslösung.....	31
4.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	32
4.7	Gelelektrophorese.....	35
4.8	DHPLC (denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie).....	36
4.9	DNA-Sequenzierung.....	39

5.	Ergebnisse.....	43
5.1	Etablierung.....	43
5.1.1	PCR.....	43
5.1.2	DHPLC.....	45
5.2	Analysenergebnisse.....	50
5.2.1	DHPLC.....	50
5.2.2	Sequenzierung.....	53
5.2.3	LOH-Analyse.....	58
6.	Diskussion.....	60
6.1	Etablierung der Analysenbedingungen.....	60
6.2	Analysenergebnisse.....	65
7.	Zusammenfassung.....	69
8.	Literaturverzeichnis.....	71

1. Abkürzungen

A	Adenosin
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APC	Adenomatosis polyposa coli
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CA	Karzinom
C	Cytidin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	Carcino-embryonales Antigen
CSGE	Conformation sensitive gel electrophoresis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dest.	destilliert
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosid-Tiphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EXO 1	Exonuklease 1
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
G	Guanosin
g	Gramm
h	Stunde
HEX 1	humanes Exonuklease 1 Gen
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
konz.	konzentriert
LOH	Loss of heterozygosity (Allelverlust)
µl	Mikroliter
M	Mol
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	MilliMol
MMR	Mismatch-Reparatur
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
PCR	Polymerasekettenreaktion
PTT	Protein truncation test
sec	Sekunden
SSCP	single strand conformation polymorphism
T	Thymidin
TEAA	Triethylamoniumacetat
TBE	Tris-Borat/EDTA
Tris	Tris(hydroxamethyl)amoniummethan
u.a.	unter anderem

2.Einleitung

2.1 Kolonkarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Mit einer Häufigkeit von 12 % bei der männlichen und 14 % bei der weiblichen Bevölkerung ist das kolorektale Karzinom in Deutschland das zweithäufigste Malignom. Jährlich können bei Frauen 27700 Neuerkrankungen am Kolonkarzinom und 22800 bei Männern verzeichnet werden (Becker N., 2001:49-63).

Eine genetische Prädisposition wird für 5-10 % aller kolorektalen Karzinome (Al-Taie O., 2001:530) diskutiert und allein 1-3 % aller kolorektalen Karzinome zählen zum erblichen Dickdarmkrebs ohne Polyposis (HNPCC-Syndrom) (Meckling J.-P., 1994:1625-1630; Ponz de Leon M., 1993:3493-3501). Damit ist das HNPCC-Syndrom die häufigste Ursache eines erblichen Dickdarmkarzinoms (Lamberti C., 1996:1398).

Das Durchschnittsalter der Patienten mit der Diagnose eines HNPCC liegt bei 44,4 Jahren im Vergleich zum Durchschnittsalter von 62,7 Jahren bei Kolon-CA Patienten ohne die Diagnose eines HNPCC (Meckling J.-P., 1994:1626).

2.1.2 Klassifikation

Morphologisch lässt sich das kolorektale Karzinom in ein ulzeröses (55-60 %), polypöses (25 %), plattenartiges (15-20 %) und szirrhöses (1 %) Erscheinungsbild einteilen (Dürig M., 2001:410).

Die Klassifikation nach Dukes wird in der Literatur noch häufig erwähnt, ist jedoch in der Klinik mittlerweile durch die gebräuchlichere TNM-Stadieneinteilung abgelöst worden.

Dukes A: Frühkarzinom, Tumorwachstum auf Darmwand beschränkt,
5-Jahresüberlebensrate: 90 %

Dukes B: Alle Darmwandschichten bis Submukosa infiltriert, kein Lymphknotenbefall,
5-Jahresüberlebensrate: 50 %

Dukes C: Befall der regionären Lymphknoten, 5-Jahresüberlebensrate: 20-30 %

Dukes D: Fernmetastasen, 5-Jahresüberlebensrate: <1 %

TNM-Klassifikation:

Tumor	Lymphknoten
<i>TX</i> : Primärtumor nicht beurteilbar	<i>NX</i> : regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
<i>TO</i> : kein Anhalt für Primärtumor	<i>NO</i> : keine regionären Lymphknotenmetastasen
<i>Tis</i> : Carcinoma in situ	
<i>T1</i> : Tumor infiltriert Submukosa	<i>N1</i> : Metastasen in 1-3 perikolischen oder perirektalen Lymphknoten
<i>T2</i> : Tumor infiltriert Muscularis propria	<i>N2</i> : Metastasen in 4 oder mehr perikolischen oder Perirektalen Lymphknoten
<i>T3</i> : Tumor infiltriert in die Subserosa oder in perikolisches oder perirektales Gewebe	Metastasen
<i>T4</i> : Tumor infiltriert in benachbarte Organe oder Strukturen	<i>MX</i> : Fernmetastasen nicht beurteilbar
	<i>MO</i> : keine Fernmetastasen
	<i>M1</i> : Fernmetastasen
	Differenzierung
	<i>GX</i> : Differenzierungsgrad nicht beurteilbar
	<i>G1</i> : gut differenziert
	<i>G2</i> : mäßig differenziert
	<i>G3</i> : schlecht differenziert
	<i>G4</i> : undifferenziert

(Dürrig M., 2001:411)

2.2 Das HNPCC-Syndrom

2.2.1 Definition

Das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) oder auch Lynch-Syndrom ist eine autosomal dominante Tumorerkrankung, die durch das Auftreten von nicht polypösen Karzinomen vorwiegend des proximalen Kolons und Rektums, aber auch des Magens und extraintestinalen Lokalisationen wie des Endometriums, hepatobiliären Systems, Ovars und des Urogenitalsystems charakterisiert ist. Neben der frühen Erstmanifestation, meist vor dem 50. Lebensjahr, und der familiären Häufung des kolorektalen Karzinoms treten sowohl synchron als auch metachron Zweitumoren auf (Vasen H., 1994:1613).

Das HNPCC-Syndrom oder auch Lynch-Syndrom wird unterteilt in Lynch-1, bei Vorliegen ausschließlich kolorektaler Karzinome, und Lynch-2, bei Auftreten zusätzlicher extrakolischer Malignome (Lynch H.T., 1988:372-377; Watson P. and Lynch H.T., 1994:1635).

2.2.2 Klinik und Prognose

Die klinischen Symptome eines HNPCC äußern sich wie bei den meisten kolorektalen Karzinomen in erster Linie durch wechselndes Stuhlverhalten, Frischblutauflagerungen auf dem Stuhl, postprandiale Schmerzen, Abdominalkrämpfe, Obstruktion und palpable Resistenz. Der meist daraufhin durchgeführte oder auch routinemäßige Hämoccult-Test auf Blut im Stuhl zeigt ein positives Ergebnis.

Erhärtet wird die Diagnose durch Erhebung einer auffallenden Familienanamnese, rektale Austastung und natürlich apparative Untersuchungen wie CT, Röntgenkontrastmittelaufnahmen, Sonographie und in erster Linie Koloskopie mit Biopsie. Erst der histologische Befund kann die endgültige Diagnose eines Karzinoms verifizieren.

Der größte Teil (60 %) der HNPCC-Tumoren ist proximal der linken Kolonflexur lokalisiert (Jass J.R., 2000:63).

Die klinische Diagnose eines HNPCC-Syndroms wird aufgrund der folgenden familienanamnestischen Kriterien, den *Amsterdam-Kriterien 1* von 1991 (Vasen H.F., 1991: 424-425) gestellt:

Mindestens drei Personen in einer Familie mit kolorektalem Karzinom und Erfüllung aller folgenden Kriterien:

- Einer der drei Patienten ist ein Verwandter 1.Grades der beiden anderen Erkrankten
- Mindestens zwei aufeinander folgende Generationen sind betroffen
- Mindestens ein Betroffener ist jünger als 50 Jahre zum Zeitpunkt der Karzinommanifestation
- Eine familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) ist ausgeschlossen
- Die Tumoren sind histopathologisch gesichert

Um die ebenfalls zum HNPCC-Syndrom gehörenden extraintestinalen Tumoren mit zu erfassen, wurden 1999 die *Amsterdamkriterien 2* hinzugefügt (Vasen H.F., 1999:1453-1456):

Mindestens drei Personen in einer Familie mit einem kolorektalen Karzinom und einem HNPCC-assoziiertem Tumor, das heißt Karzinom des Kolo/Rektums, des Endometriums, des Dünndarms, des hepatobiliären Systems, des Urogenitaltrakts oder des Ovars, und Erfüllung aller folgenden Kriterien:

- Einer der drei Patienten ist ein Verwandter 1.Grades der beiden anderen Erkrankten
- Mindestens zwei aufeinander folgende Generationen sind betroffen
- Mindestens ein Betroffener ist jünger als 50 Jahre zum Zeitpunkt der Karzinommanifestation
- Eine familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) ist ausgeschlossen
- Die Tumoren sind histopathologisch gesichert

Um Patienten zu erkennen, die z.B. aufgrund einer nicht bekannten Familienanamnese oder einer sehr kleinen Familie über die Amsterdamkriterien nicht erkannt werden können, wurden 1997 die *Bethesda-Kriterien* (Rodriguez-Bigas MA, 1997:1758-1762) erstellt. Diese besagen, dass eine Indikation zu einer molekulargenetischen Analyse besteht, wenn:

- Amsterdamkriterien 1 und/oder 2 erfüllt werden
- synchrone und/oder metachrone Tumoren aus dem HNPCC-Spektrum vorhanden sind
- ein kolorektales Karzinom beim Patienten und bei einem Verwandten 1.Grades ein HNPCC-Tumor vor dem 45.Lebensjahr oder ein kolorektales Adenom vor dem 45.Lebensjahr vorhanden sind
- ein kolorektales Karzinom oder Endometriumkarzinom vor dem 45.Lebensjahr beim Patienten vorhanden ist
- ein rechtsseitiges, wenig differenziertes kolorektales Karzinom vor dem 45.Lebensjahr vorhanden ist
- ein kolorektales Karzinom vom Siegelringzelltyp vor dem 45.Lebensjahr vorhanden ist
- ein kolorektales Adenom vor dem 45.Lebensjahr vorhanden ist

Eine revidierte Fassung der *Bethesda-Kriterien (Revised Bethesda Guidelines)* wurde 2002 erstellt. Nach dieser wird eine Untersuchung auf Mikrosatelliteninstabilität bei Patienten mit kolorektalen Tumoren in folgenden Situationen empfohlen:

1. Diagnose unter dem 50. Lebensjahr
2. Vorliegen von synchronen, metachronen kolorektalen oder HNPCC-assoziierten Tumoren, unabhängig vom Alter
3. Diagnose eines kolorektalen Karzinoms mit MSI-H Histologie bei einem Patienten < 60 Jahre
4. Der Patient hat einen oder mehrere Verwandte ersten Grades mit einem HNPCC-assoziierten Tumor, davon einer unter dem 50. Lebensjahr diagnostiziert
5. Patient hat zwei oder mehrere erst- oder zweitgradige Verwandte mit der Diagnose eines HNPCC-assoziierten Tumors, unabhängig vom Alter

(Umar A., 2004:261-268)

Werden die *Amsterdam-Kriterien* (siehe oben) vollständig erfüllt, so spricht man von einem HNPCC, treffen die *Amsterdam-Kriterien* nur teilweise zu, so hat der Patient eine „atypische“ HNPCC-Form oder einen Verdacht auf einen HNPCC.

Differentialdiagnostisch muss bei familiärer Häufung von kolorektalen Tumoren immer auch an verschiedene andere erbliche Syndrome gedacht werden. Dazu gehört in erster Linie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), welche sich durch eine größere Anzahl von Adenomen gegenüber dem HNPCC auszeichnet. Die abgeschwächte Variante der FAP mit hauptsächlich abgeflachten Adenomen (AFAP) lässt sich weniger leicht vom HNPCC unterscheiden, wobei hier die molekulargenetische Diagnostik mit dem Nachweis von Keimbahnmutationen im APC-Gen von besonderer Bedeutung ist (Lynch H.T., 1996:38; Lynch H.T., 1993:1535-1549).

Des Weiteren müssen die hamatomatösen familiären Polyposis-Syndrome, wie das Peutz-Jeghers-Syndrom ausgeschlossen werden, wobei hier differentialdiagnostisch eine Pigmentierung der Kutis und Mukosa zur Polyposis hinzukommt. Auch die juvenile Polyposis gehört zu dieser Gruppe.

Schließlich kommen noch Morbus Crohn und auch Colitis ulcerosa als Ausschlußdiagnosen in Betracht, welche nach langjährigem Verlauf dieselbe Prädisposition besitzen (Dürig M., 2001:391-431; Riede U.-N., 1999:732).

Prognostisch bedeutsam ist die Tatsache, dass für einen Träger eines molekulargenetisch gesicherten HNPCC-Syndroms das Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln, bei 82% liegt. Ein metachrones Zweitkarzinom des Kolons entwickeln 2 % pro Jahr, 8 % ein

synchrones Zweitkarzinom und 60% der weiblichen Trägerinnen werden im Laufe ihres Lebens mit der Diagnose eines Endometriumkarzinoms konfrontiert (Al-Taie O., 2001:533). Es gibt Anhaltspunkte für eine bessere Prognose von HNPCC-assoziierten und sporadischen MSI-positiven kolorektalen Karzinomen gegenüber sporadischen kolorektalen Karzinomen (Albano W.A., 1982:360-363; Al-Taie O., 2001:533; Lynch H.T., 1996:40). Eine wesentliche prognostische Rolle spielt die Tumorausbreitung zum Zeitpunkt des Therapiebeginns mit eventuell bereits erfolgter Metastasierung.

Zur 5-Jahresüberlebensrate siehe 2.1.2, Dukes Klassifikation.

Im Rahmen der Vorsorge und Therapie wird über eine prophylaktische subtotale Kolektomie diskutiert, die dem Betroffenen angeboten werden kann. In jedem Fall beinhalten die Vorsorgemaßnahmen eine jedes zweite Jahr durchzuführende Koloskopie ab dem 20.-25. Lebensjahr und jährlich ab dem 30.Lebensjahr. Auch sollte bei weiblichen Patienten eine regelmäßige und umfassende gynäkologische Vorsorgeuntersuchung stattfinden (Lynch H.T.,1996:41).

Die Therapie des erblichen kolorektalen Karzinoms und der assoziierten Malignome wird entsprechend der üblichen Richtlinien durchgeführt, das heißt in erster Linie chirurgisch durch möglichst sphinktererhaltende Resektionsverfahren. Bei weit distaler Lokalisation eines Rektumkarzinoms lässt sich die Anlage eines Anus praeter oft nicht vermeiden. Darüberhinaus können sowohl die Durchführung einer neoadjuvanten als auch einer adjuvanten Chemotherapie indiziert sein. In der Nachsorge wird heutzutage der Tumormarker CEA eingesetzt.

Außerdem muss im Zuge der Nachsorge an die hohe Wahrscheinlichkeit von Zweitkarzinomen gedacht werden, sodass diese durch zuverlässige und regelmäßige Untersuchungen frühzeitig erkannt werden können. Hier ist ein intensives Vorsorgeprogramm von großer Bedeutung.

2.2.3 Histopathologie der HNPCC assoziierten Karzinome

Allgemein zeigt sich wie bei allen Karzinomen in der Histologie eine Zell- und Kernpolymorphie, Kernpolychromasie, Verschiebung der Kern-Plasma-Relation und eine Nukleolenvergrößerung aufgrund des erhöhten Proliferationsstoffwechsels.

Histopathologisch scheint das HNPCC-assoziierte kolorektale Karzinom zumeist ein schleimproduzierender, also muzinöser und schlecht differenzierter Tumor zu sein (Jass J.R., 1994:1633).

Jass unterteilt die HNPCC-Tumoren in drei Gruppen:

- 1.) Proximal lokalisierte schleimbildende Karzinome, welche gut abgrenzbar und mittelmäßig differenziert sind
- 2.) Proximal lokalisierte und schlecht differenzierte Adenokarzinome
- 3.) Adenokarzinome mit lymphozytärer Infiltration des Umgebungsgewebes

(Jass J.R., 2000:63-64)

Dies zeigt die große Spannbreite des histologischen Bildes der HNPCC-Tumoren.

Das oben erwähnte Crohn-ähnliche intra-und peritumorale lymphoide Infiltrat konnte bei 40% der mikrosatelliteninstabilen HNPCC-Tumoren identifiziert werden (Rüschoff J., 1998:269-278). Es bestätigte sich jedoch in einer weiteren Studie nicht als typisch (Jass J.R., 1994:1631-1634).

Immunhistochemisch lässt sich der Verlust der Expression von Reparaturproteinen wie etwa MSH2 oder MLH1 nachweisen.

Die selten auftretenden Adenome bei HNPCC-Patienten sind meist villös, mit einem hohen Grad an Dysplasie ausgestattet und treten bereits in jungem Alter auf. Dies wird als Zeichen der frühzeitigen Tendenz zu einer malignen Entwicklung interpretiert (Jass J.R., 1994:1634) und man geht im Falle des HNPCC von einer Initiierung und schnelleren Entwicklung der Adenom-Karzinom-Sequenz aus.

2.2.4 Molekulargenetik

Bereits in mehreren Untersuchungen konnte ein Zusammenhang des HNPCC-Syndroms mit Keimbahnmutationen in DNA-Mismatch-Reparaturgenen festgestellt werden (siehe auch 2.2.4.2).

Tabelle 1:

Häufigkeit von Keimbahnmutationen in den verschiedenen Mismatch-Reparatur-Genen bei HNPCC-Patienten (Peltomäki P., 2001:736)

MMR-Gen	Chromosomenlokation	Häufigkeit
MSH2	2p21	38 %
MLH1	3p21-23	49 %
PMS1	2q31-q33	0,3 %
PMS2	7p22	2 %
MSH6	2p21	9 %
MLH3	14q24.3	2 %
Summe		100,3 %

Peltomäki bezeichnete aufgrund dieses eindeutigen Zusammenhangs das HNPCC-Syndrom auch als Syndrom der defekten DNA-Mismatch-Reparatur (Peltomäki P, 2001:735-740).

Da jedoch nicht alle untersuchten Fälle von klinisch typischen HNPCC-Patienten Mutationen in den zuvor aufgeführten Reparaturgenen aufweisen und in atypischen Fällen, im Sinne der Definition (siehe 2.2.1), dies sogar selten der Fall ist, liegt die Vermutung nahe, dass weitere Gene involviert sein müssen.

Dem erst vor kurzem identifizierten Exo1 Gen (siehe 2.4) konnte eine Interaktion mit dem Mismatch-Gen MSH2 nachgewiesen werden (Schmutte C, 1998:4537-4542; Schmutte C, 2001:33011-33018). In einer Studie von Ying Wu fanden sich dann Keimbahnmutationen bei 14 HNPCC-Patienten, welche in den mehr als 200 Kontrollen nicht auftraten. Die Patienten erfüllten entweder die Kriterien eines atypischen oder typischen HNPCC-Syndroms. In der Mikrosatellitenanalyse (siehe 2.2.4.1) ergab sich bei sechs der Tumoren eine Instabilität.

2.2.4.1 Mikrosatelliteninstabilität

Unter Mikrosatelliten versteht man DNA-Abschnitte mit repetitiven Basensequenzen, welche sowohl an kodierenden als auch an nicht kodierenden Bereichen vorhanden sind. Sie treten über das gesamte Genom verteilt auf und verhalten sich polymorph (zwischen verschiedenen Individuen variabel), jedoch somatisch stabil (innerhalb eines Individuums gleich). Die Funktion dieser repetitiven Sequenzen ist bis heute noch nicht völlig geklärt.

Innerhalb von Mikrosatellitensequenzen kommt es vermehrt zu Fehlpaarungen während der DNA-Replikation, welche von einem intakten DNA-mismatch-Reparatursystem erkannt und repariert werden. Da im Rahmen der Tumorentstehung bei HNPCC-Patienten ein Funktionsverlust des Reparatursystems auftritt, finden sich nun vermehrt Deletionen und Insertionen in diesen Mikrosatellitenbereichen, es kommt zum Auftreten zusätzlicher Allele im Tumor, und man spricht daher von Mikrosatelliteninstabilität (MSI).

Ein Zusammenhang von HNPCC-Tumoren mit sowohl Mikrosatelliteninstabilitäten als auch Keimbahnmutationen in Genen des mismatch-repair-Komplexes (siehe 2.2.4.2) konnte bereits nachgewiesen werden (Aaltonen L.A., 1994:1645-1648; Bronner C.E., 1994:258-261; Fishel R., 1993:1027-1038). Dabei führt der mutationsbedingte Ausfall der DNA-Reparatur-Enzyme zu einer Verlängerung oder Verkürzung der repetitiven Sequenzen (Marra G., 1995:1114). Somit zeigt sich in der Mikrosatelliteninstabilität eine Art Mutatorphänotyp, da die vorhandenen Mutationen in den Reparaturgenen zu einem Anstieg der Mutationsrate im gesamten Genom und zu einer eventuellen Tumorentwicklung (abhängig davon, ob der betroffene DNA-Abschnitt kodierend ist) führen. In über 90 % der HNPCC-Tumoren können hochfrequente Mikrosatelliteninstabilitäten gefunden werden (Huang S.C., 2001:630). Im Zusammenhang mit humanem Kolonkarzinom ist dabei das TGF β II Gen (Transforming growth factor beta) von Bedeutung, das als starker Inhibitor des epithelialen Zellwachstums fungiert. In Zellreihen von Kolonkarzinomen mit Mikrosatelliteninstabilitäten konnten nämlich Mutationen der codierenden repetitiven Sequenzen des TGF β II gezeigt werden. Ebenfalls eine Rolle spielen hierbei das BAX-Gen und das IGFIIR-Gen.

Neben dem Zusammenhang mit HNPCC-Tumoren sind ca. 15 % der sporadischen Kolon- und auch anderer Karzinome mit Mikrosatelliteninstabilitäten vergesellschaftet (Boland C.R., 1998:5248-5257).

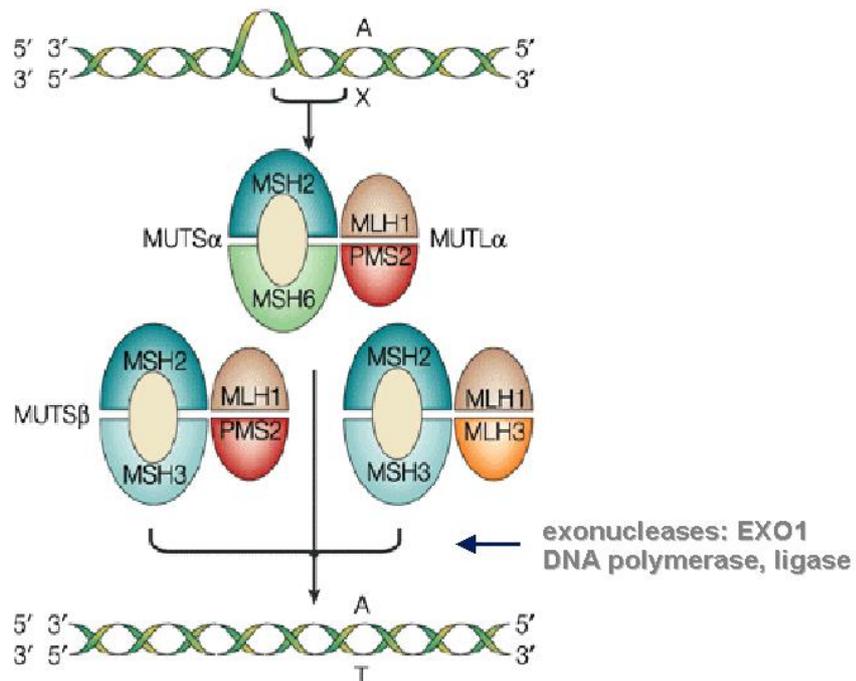
2.2.4.2 DNA-mismatch Reparatur (MMR)

Unter Mismatch versteht man die Falschpaarung von Nukleotiden in der DNA nach der Replikation .

Die DNA-Reparatur ist für den Erhalt der genetischen Stabilität essentiell, indem sie unter anderem die fehlerhaften Basenpaarungen und auch kleine Insertionen und Deletionen nach der Replikationsphase durch Exzision und Reparatur wieder korrigiert (Peltomäki P., 2001:78). Das bedeutet umgekehrt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von Mutationen im Sinne von Mikrosatelliteninstabilitäten (siehe 2.2.4.1) bei einem Funktionsausfall im Mismatch-repair System (Trojan J., 2002:212).

Bei Basenfehlpaarungen kommt es zumeist zu einzelner Basenaustausch (zB. G→T) in nicht-repetitiven Sequenzen, während eine Insertion oder Deletion zu einer Zunahme oder einem Verlust von short tandem repeats in Mikrosatellitenbereichen führt und damit zur Mikrosatelliteninstabilität (siehe auch 2.2.4.1) (Peltomäki P., 2001:736).

Je nach Art des aufgetretenen Fehlers (Basenfehlpaarung oder Insertion/Deletion) erkennt und bindet nun ein Komplex aus MSH2 und MSH6 (=hMutS α) oder aus MSH2 und MSH3 (=hMutS β), jeweils zusammen mit einem Heterodimer-Komplex aus MLH1 und PMS2 (=hMutL α) an die Region der Basenfehlpaarung. Diese zwei Komplexe koordinieren und aktivieren nun die zum Repairsystem gehörenden Proteine (Peltomäki P., 2001:736; Räschle M., 1999:32368-32375). Hierbei wird die Exzision der markierten Stelle durch Exonuklease 1 durchgeführt und die Resynthese und Ligation schließlich durch Polymerase δ , PCNA (proliferating cell nuclear antigen), RPA (Einzelstrang-DNA bindendes Protein) zusammen mit derzeit noch nicht identifizierten Proteinen (Peltomäki P., 2001:78).



E. Friedberg: Nat Rev Cancer, 1: 22, 2001

Abbildung 1:

Darstellung der einzelnen Proteine des Mismatch-Repair-Komplexes und ihrer Interaktionen untereinander.

Ein Funktionsverlust der MMR-Gene erfolgt im wesentlichen entsprechend der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Knudson-Theorie), d.h. bei Vorliegen einer Keimbahnmutation wird das verbleibende Allel durch einen LOH oder durch Hypermethylierung inaktiviert. Erst dann kommt es zu einem Funktionsverlust und einem Auftreten von genetischer Instabilität.

Charbonnier konnte in seiner Studie einen Prozentsatz von 23% von genetischem Rearrangement aufgrund von Deletion eines oder mehrerer Exons des MSH2 Gens bei HNPCC-Patienten nachweisen. Er folgert daraus, dass künftig nicht nur nach Punktmutationen des MSH2-Gens gesucht werden muss, sondern auch diese Rearrangements zu berücksichtigen sind (Charbonnier F., 2002:348).

2.3 Magen-Karzinom

2.3.1 Epidemiologie

Das Magen-Ca ist nach den kolorektalen Karzinomen die zweithäufigste Neoplasie des Gastrointestinaltrakts und stellt die fünft- bis sechsthäufigste Todesursache in Deutschland dar (Becker N. et al. 2001).

Mit einem durchschnittlichen Manifestationsalter zwischen 55 und 65 Jahren tritt das Magen-Ca in der Regel in der zweiten Lebenshälfte auf, in 10% der Fälle jedoch auch schon zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr (Herold et al. 2002:370; Riede U.-N., 1999:702).

2.3.2 Klassifikation

Die chirurgische Einteilung nach Borrmann unterscheidet zwischen polypös-exophytisch (ca. 35 %), polypös-exulzierend (35-40 %), exulzierend (20 %) und diffus infiltrierend (10%) wachsenden Magen-Karzinomen (Löhnert M., 2001:346).

Nach der histopathologischen Einteilung von Lauren spricht man von einem diffusen (infiltrativ wachsendem) oder einem intestinalen (polypös wachsendem) Typ (Lauren P., 1965:41). Diese Einteilung hat für den weiteren Therapieverlauf, wie z.B. das Ausmaß des Resektionsverfahrens und die Prognose eine wesentliche Bedeutung, da der diffuse Typ für den Patienten meist eine schlechtere Prognose bedeutet und auch mit einer genetischen Prädisposition in Zusammenhang gebracht werden kann (Riede und Schaefer 1999:702-705) (siehe auch 2.2.4).

Des weiteren ist wiederum die Einteilung nach der TNM-Klassifikation gebräuchlich (Löhnert M., 2001:346; Riede U.-N., 1999:705).

Histologisch werden Adenokarzinome (90 %), Siegelringzellkarzinome, Plattenepithelkarzinome, kleinzellige, adenosquamöse und undifferenzierte Karzinome gefunden (Herold et al. 2002:371).

2.3.3 Klinik und Prognose

Symptomatisch zeigt sich das Magen-CA mit uncharakteristischen Oberbauchbeschwerden und häufig auch Völlegefühl. Auch klagen betroffene Patienten oft über Inappetenz (insbesondere gegenüber Fleisch), epigastrisches Druckgefühl, Leistungsminderung und Teerstühle durch Blutungen (Löhnert M., 2001:347).

Zu den Risikofaktoren eines Magen-Ca zählen verschiedene Umweltfaktoren wie in erster Linie die Infektion des Magens mit *Helicobacter pylori*, aber auch die individuellen Essgewohnheiten und somit die Exposition der Magenschleimhaut gegenüber Aflatoxin oder auch Nitrosaminen (nitrathaltige Speisen oder Zigarettenrauch). Dies zeigt sich in einer geographisch deutlich unterschiedlichen Inzidenz. Ebenfalls sind sogenannte Vorläuferläsionen wie chronische Gastritis mit eventuellen Meta- oder Dysplasien, Magenübersäuerung, adenomatöse Magenpolypen, Morbus Menetrier oder Zustand nach Magenresektion nicht zu vernachlässigen (Keller G., 2002:229-233; Riede U.-N., 1999:702; Herold et al. 2002:370).

Nach neuesten Ergebnissen spielt auch für einen kleinen Anteil der Patienten eine genetische Prädisposition eine Rolle (siehe 2.2.4).

Die Diagnose wird durch Gastroskopie und histologische Analyse der dabei gewonnenen Biopsien gesichert. Für die Erfassung der Tiefenausdehnung bietet sich die Durchführung einer Endosonographie an.

Eine kurative Therapie besteht aus einer chirurgischen Resektion, meist ist dies eine Gastrektomie oder eine subtotale Resektion nach Billroth oder Roux-Y (Löhnert M., 2001:347-349).

Dieser kann eine neoadjuvante Chemotherapie vorgeschaltet werden.

Prognostisch den höchsten Einfluss hat wie bei den meisten Tumoren das Ausmaß der lokalen Tumorausdehnung, der Lymphknotenbefall und die eventuelle Fernmetastasierung.

Während die 5-Jahresüberlebensrate eines Carcinoma in situ bei 100 % liegt, sind es bei einem Magenfrühkarzinom noch 90 %. Weniger als 45 % der Patienten mit fortgeschritteneren Tumorstadien überleben die Diagnosestellung 5 Jahre (Herold et al. 2002:373).

2.3.4 Das Magenkarzinom im Rahmen hereditärer Tumorerkrankungen

Neben den Umweltfaktoren wird die Bedeutung von genetischer Prädisposition immer deutlicher. So wurde ein erbliches Magenkarzinom-Syndrom beschrieben, welches sich meist als Magenkarzinom des diffusen Typs manifestiert. Hierbei konnten Keimbahnmutationen im E-cadherin Gen festgestellt werden, welche zu einer Inaktivierung dieses Zelladhäsionsmoleküls geführt haben. Auch das lobuläre Mamma-Karzinom in Familien mit diffusen Magen-Karzinomen scheint nach neuesten Erkenntnissen mit diesen E-cadherin Mutationen in Zusammenhang zu stehen (Guilford P., 1998:402-405; Gayther S., 1998:4086-4089; Keller G., 2002:229-233).

Patienten mit erblichen Tumor-Syndromen anderer Organe sind häufig auch im Zuge ihrer Erkrankung von einem Magen-Karzinom betroffen. Dies trifft auf die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das Peutz-Jeghers Syndrom, die juvenile Polyposis, das Li-Fraumeni Syndrom und das HNPCC-Syndrom (siehe 2.2) zu (Bevan S. und Houlston R.S., 1999:6; Keller G., 2002:229-233).

So sind 11 % der Tumoren von HNPCC betroffenen Patienten Magen-Tumoren und von diesen wiederum 86 % vom intestinalen Typ (Aarnio M., 1997:551-555).

2.4 Exonuklease 1

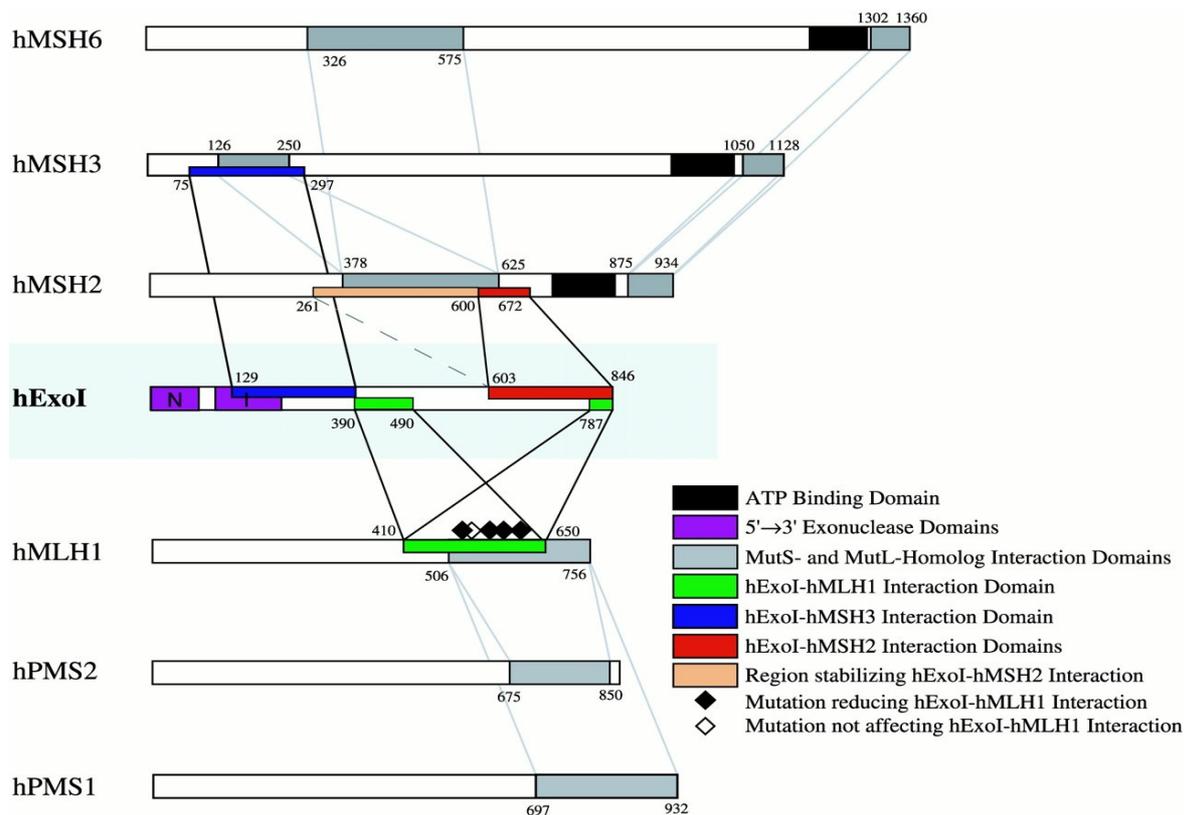
Das humane Exonuklease-1 Gen (HEX-1) ist ein auf Chromosom 1q42-q43 lokalisiertes Gen, welches aus 14 Exons besteht. Beim Genprodukt des Exo-1 Gens handelt es sich um ein aus 803 Aminosäuren zusammengesetztes Protein, das zu 55 % mit dem Produkt des Hefe-Exonuklease-1 Gens identisch ist (Wilson D.M., 1998:3762-3768; Qiu J., 1999:17893). Das Exonuklease-1 Gen besitzt eine 5`-3`Exonuklease-Aktivität, die ihre höchste Aktivität in der fetalen Leber und im adulten Knochenmark zeigt. Diese Tatsache führte zu der Annahme, dass das Protein des humanen Exonuklease1-Gens (HEX-1) eine wichtige Rolle in der hämopoetischen Stammzellentwicklung spielt (Wilson D.M., 1998:3762). Eine 5`„flap“-Endonukleaseaktivität (an der Bifurkationsstelle der getrennten homologen DNA-Stränge ansetzend) konnte ebenfalls beobachtet werden (Lee B., 1999:37763-37769).

Eine wesentliche Rolle des Exo-1 Genprodukts ist sowohl im crossing over während der Meiose, als auch im Mitwirken im DNA-Reparatursystem zu sehen.

Grundsätzlich spielen verschiedene Nukleasen eine Rolle im Reparatursystem der DNA, für die Rekombination, Replikation und Apoptose. Das humane Exo-1 zählt zur RAD2 Nukleasen-Familie, die im Rahmen der Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur eine Rolle spielt. Es wird unterschieden zwischen RAD2 Klasse 1, 2 oder 3, wobei Exo-1 der Klasse 3 zuzuschreiben ist.

Es wird vermutet, dass die DNA-Interaktion von Exo-1 am 5`-Ende der DNA seinen Anfang nimmt und dabei die biochemische Natur des 5`-Endes (mit Phosphatgruppe oder Biotingruppe) eine entscheidende Rolle für die Affinität spielt. Nach dieser ersten Interaktion soll, sofern ein einzelsträngiger DNA-Überhang besteht, Exo-1 mit seiner helikalen Biegung die „Flap“-Struktur einklemmen und so entlang dem einzelsträngigen Segment bis zur Wiedervereinigung mit dem komplementären Strang entlangwandern. Dort wird vorübergehend ein stabiler Komplex bis zur Spaltung durch die Endonuklease gebildet (Lee B., 2002:942-949).

Auch konnte das Exo-1 Protein als Interaktionspartner der humanen mismatch repair Proteine hMSH2, hMLH1 und MSH3 identifiziert werden (Schmutte C., 1998:4537-4542, Schmutte C., 2001:33011-33018). Dies betrifft im Speziellen die COOH-terminalen Regionen, während die NH4-terminale Region als Nukleasenbereich angesehen wird (Sun X., 2002:6026).



(Schmutte C., 2001:33011-33018, figure 5)

Abbildung 2:

Zusammenfassung der Interaktionsregionen zwischen den MMR-Proteinen und Exo-1

Das Exo1-Protein spielt vor allem eine strukturelle Rolle im Mismatch-Reparatur-System und stabilisiert den Multiproteinkomplex, der aus MMR-Proteinen besteht (Amin N.S., 2001:5142; Tishkoff X., 1997:7492). Weiterhin wird vermutet, dass Exo-1 am Exzisionsschritt der Mismatch-Reparatur beteiligt ist, assoziiert mit DNA-Polymerase δ und ϵ . Die hierbei wichtigste Protein-Protein Interaktion scheint Exo-1 mit POL30 (Mismatch-Polymerase) zu haben. Auch ist ein signifikanter Anstieg der Mutationsrate, bei einer gleichzeitigen Exo-1 Mutation und einer Destabilisierung des Mismatch-Reparatur Komplexes aufgrund von Mismatch Mutationen, im Hefesystem beobachtet worden (Amin N.S., 2001:5142-5155). Amin et al. vermuteten weiter, dass bei einer Koinzidenz von Exo-1 Mutation und Mutationen in anderen für Exonukleasen des MMR-Komplexes kodierenden Genen, dies lethal sein könnte. Die MMR-Proteine MLH1 und MSH2 scheinen im Falle einer Mutation durch Exo-1 stabilisiert zu werden und weisen dementsprechend in Abwesenheit der Exo-1 Interaktion eine Destabilisierung auf (Amin N.S., 2001:5142-5155).

Daraus ergibt sich die Vermutung, dass neben dem bereits bekannten Zusammenhang zwischen den MMR-Gen-Mutationen und HNPCC, auch Exo-1 eine Rolle im Falle des erblichen nichtpolypösen kolorektalen Karzinoms spielen könnte.

Eine weitere Aufgabe des Exo-1 Proteins scheint im Zusammenhang mit UV-geschädigter DNA zu bestehen. Eine Deletion des Exonuklease1 Gens bewirkt eine geringere UV-Sensitivität; bei gleichzeitiger Deletion von RAD51 und EXO1 wurde jedoch eine stark erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung festgestellt. Die RAD2 Nukleotidexzisionsreparatur in humanen Zellen ist der wichtigste UV-Reparaturweg und bei seiner Schädigung die Diagnose einer Xeroderma pigmentosum zu stellen. Der Reparaturweg des Exo-1 Proteins scheint jedoch im Zusammenhang mit RAD51 ein separater zu sein (Qiu J., 1999:17893-17900).

2.5 LOH (loss of heterozygosity)

Im Gegensatz zur Mikrosatelliteninstabilität bedeutet der Verlust der Heterozygotie (LOH) nicht nur den Verlust oder die Veränderung einiger Basenpaare, sondern den Verlust des gesamten betroffenen Allels.

Die vorhandenen Variationen in der DNA-Sequenz (Polymorphismen) führen zu einem Vorliegen von zwei oder mehreren Allelen für einen Genlocus. Das heißt, die zu untersuchende Probe ist heterozygot in diesem Allel und damit informativ. Wird nun ein molekularer Vergleich der Tumor-DNA mit der Blut-DNA durchgeführt und die Tumor-DNA zeigt lediglich eines der beiden Allele, so ist der Verlust der Heterozygotie nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die auffälligen Proben eine LOH-Untersuchung durch zusätzliche Sequenzierung der Tumor- und Lymphknoten-DNA durchgeführt.

3. Aufgabenstellung

Der Zeitpunkt der Diagnosestellung spielt nach wie vor eine evidente Rolle für die Prognose einer malignen Tumorerkrankung. Aus diesem Grund ist auch das Wissen um eine genetische Prädisposition für die Betroffenen von entscheidender Wichtigkeit. Diese Prädisposition konnte bereits im Sinne von Keimbahnmutationen in den DNA-mismatch-repair Genen hMLH1, hMSH2, hPMS2, hMSH6 bei HNPCC Familien nachgewiesen werden.

Ziel soll es nun sein, die Bedeutung des Exonuklease 1 Gens für ein familienanamnestisch und aufgrund seines Alters auffälliges Patientenkollektiv mit Magen- bzw. Kolonkarzinomen zu untersuchen. Hierbei wurden Patienten ausgewählt, bei denen großteils eine Untersuchung der DNA-mismatch-repair Gene hMLH1, hMSH2 und hMSH6 durchgeführt wurde und hierbei keine Mutation nachweisbar war.

Die Ergebnisse sollen mit den klinischen Daten verglichen werden.

Durchgeführt werden die Untersuchungen mit der DHPLC-Methode. Hierfür ist zuerst die Etablierung der Bedingungen für das Exonuklease-1 Gen notwendig. Im Vergleich der etablierten Bedingungen mit den vorgeschlagenen Bedingungen entsprechend dem Algorithmus der Computersoftware (Programm Wavemaker) soll die Bedeutung der DHPLC-Methode bei der Mutationsdetektion diskutiert werden.

4. Material und Methoden

4.1 Geräte

<i>AbiPrism™ 377 DNA Sequenzer</i>	Applied Biosystems, Weiterstadt
<i>Eagle Eye II</i>	Stratagene
<i>Elektrophoresekammer: Wide Mini Sub™ Cell</i>	Bio-Rad, München
<i>Färbemaschine TechMate™ Horizon</i>	DAKO, Hamburg
<i>Heiz-/Rührgerät</i>	IKA-Labortechnik, Staufen
<i>Mikrowelle</i>	Siemens, München
<i>PCR-Prozessoren:</i> - Mastercycler gradient - Thermocycler Gene Amp. PCR System 9700	Eppendorf, Hamburg Applied Biosystems, Weiterstadt
<i>Spannungsgeräte:</i> - PAC 300 - Model 200/2.0 Power Supply	Bio-RAD, München Bio-RAD, München
<i>Spektrophotometer:</i> - DU 530	Beckman, Fullerton, CA, USA
<i>Waagen:</i> - Analysenwaage R 160 P - Laborwaage L 220 S	Sartorius, Göttingen Sartorius, Göttingen
<i>Wasserbad</i>	Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel
<i>WAVE® DNA Fragment Analysis System</i>	Transgenomic, San Jose, CA, USA
<i>Zentrifugen:</i> - Tischzentrifuge 5417R und 5415D - Vakuumzentrifuge Speed Vac	Eppendorf, Hamburg Savant, Framingdale, USA

4.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Agarosegele

- SeaKem® LE Agarose Bio Wittaker Molekular Applications, Rockland, USA
- Ethidiumbromid Sigma, Deisenhofen
- Low melting temperature Agarose , Nu Sieve® GTG® Bio Wittaker Molekular Applications, Rockland, USA

DNA-Sequenzierung

- Long ranger Hydrolink Gel Biozym Diagnostik Gmbh, Oldendorf

DNA-Reinigung

- Centri Sep Spin Columns Applied Biosystems, USA
- QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen, Hilden

Enzyme

- AmpliTaq® DNA Polymerase Perkin Elmer, Weiterstadt

Nukleotide

- dNTPs 200 µmolar Applied Biosystems, Weiterstadt

Proteinase K

Böhringer Mannheim

Sonstiges

- Acetonitril Sigma, Deisenhofen
- Eosinlösung, wäßrig 1% Hausapotheke
- Ethanol 50% und 70% technische Befüllanlage
- Formamid Sigma, Deisenhofen
- Hämalaun, saures nach Mayer Hausapotheke
- Isopropanol technische Befüllanlage
- Molekulargewichtsmarker Phi Boehringer Gmbh, Mannheim
174X/HAEIII
- TEAA Applied Biosystems, Weiterstadt
- Xylol technische Befüllanlage

Verbrauchsmaterial

- Einmalpipetten 5,10,25,50 Greiner, Frickhausen
- Pipettenspitzen 10, 20, 100, 200, 1000µl Gilson, Villiers-le-Bel, France
- PCR-Tubes, 0,5 ml ultradünn Biozym Diagnostik Gmbh, Oldendorf
- Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml Eppendorf, Hamburg
- Lochplatten (96-Loch) Nunc, Wiesbaden-Biebrich

4.3 Puffer und Lösungen

H₂O

HPLC-Qualität, Filtration durch Miliporeanlage

Milipore, Eschborn

PCR-Puffer

Siehe 4.6

Premix für die DNA-Sequenzierung

Big Dye Terminator
Cycle Sequencing Kit

Applied Biosystems, USA

Puffer Dye

Blue Dextran/EDTA

Perkin Elmer, Foster City, CA, USA

TBE (10x konzentriert)

1,0 M Tris

0,9 M Borsäure pH 8

0,01 M EDTA

Invitrogen, Schottland, UK

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 8,0

1 mM EDTA

Spezielle Pufferlösungen sind bei der Beschreibung der entsprechenden Methode mitaufgeführt.

4.4 Patientenkollektiv

Es wurde ein Kollektiv von 48 Patienten mit Kolon- und Magenkarzinomen gewählt, welches aufgrund familienanamnestischer Kriterien und auffallend jungen Alters bereits auf Mutationen in hMLH1, hMSH2 und hMSH6 getestet und diese ausgeschlossen worden waren. Es trafen entweder die *Amsterdam-Kriterien* oder eines der *Bethesda-Kriterien* zu (siehe 2.2).

Tabelle 2: Patientenkollektiv

Es wurden 21 Patienten mit **Magenkarzinomen** untersucht:

Nummer	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Familienanamnestische Kriterien für Magenkarzinome (M1-11)	Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse
151	Weiblich	87	5,7,10,11	1
98	Weiblich	52	5, 10,11	2
4	Männlich	57	5, 10,11	2
363	Männlich	56	5, 10,11	0
394	Männlich	47	5, 10,11	0
481		73	5,7, 11	0
150	Männlich	39	1, 10,11	0
253	Weiblich	30	1, 5, 10	0
82	Weiblich	69	5,7,10	2
281	Männlich	66	2,5,7	1
159	Männlich	68	7, 11	0
268	Weiblich	50	5, 11	1
364	Männlich	61	5, 11	0
142	Weiblich	82	5,7	2
154	Weiblich	37	1, 11	2
196	Männlich	46	10	1
683	Weiblich	49	10	0
682	Weiblich	60	7	0
170	Männlich	69	11	2
155	Männlich	51		0
92	Männlich	71		2

Erläuterung der Familienanamnestischen Kriterien für Magenkarzinome:

- M1:** Alter des Patienten < 45 Jahre
- M2:** metachrones Magen-Ca mit primärem Kopenhagen-Tumor
- M5:** mindestens zwei erstgradige Verwandte sind ebenfalls an Magen-Ca erkrankt
- M7:** mindestens zwei erstgradige Verwandte ohne Altersbegrenzung sind an Magen-Ca oder einem HNPCC-assoziierten Tumor erkrankt
- M10:** mindestens zwei Familienmitglieder, eines davon <50 Jahre, sind an einem Magen-Ca erkrankt
- M11:** drei Familienmitglieder ohne Altersbegrenzung sind an einem Magen-Ca erkrankt

Erläuterung der Mikrosatelliteneinteilung:

- 0 MSS :** Mikrosatellitenstabil
- 1 MSI-L:** <40% instabile Marker
- 2 MSI-H:** mindestens 2/5 instabil

22 Karzinome des **Kolons** und des **Rektums** wurden untersucht:

Nummer	Geschlecht	Alter bei Diagnosestellung	Familienanamnestische Kriterien für Kolorektale Karzinome	Lokalisation	Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse
370	Männlich	60	2,3, 8	Kolon	0
143	Männlich	28	1, 4	Rektum	2
152	Männlich	32	1, 4	Kolon	1
183	Weiblich	43	1, 4	Kolon	0
316	Männlich	44	1, 4	Rektum	0
348	Weiblich		2, 4	Kolon	1
522	Männlich		3,4	Kolon	2
786	Männlich	30	3,4	Kolon	2
641	Männlich	44	4,8	Kolon	2
299	Männlich	63	1, 3	Kolon	0
672	Männlich	51	1,2	Kolon	2
157	Weiblich	77	1, 8	Rektum	1
319	Weiblich	44	1, 3	Rektum	0
194	Weiblich		4	Kolon	2
347	Weiblich	55	4	Kolon	1
376	Männlich	36	4	Kolon	2
476	Männlich		4	Kolon	2
707	Männlich		4	Kolon	2
763	Männlich	48	10	Kolon	1
349	Weiblich	68	10	Rektum	0
298	Männlich	66	12	Kolon	0
695	Männlich	78	8	Rektum	1

Erläuterung der familienanamnestischen Kriterien für kolorektale Karzinome:

- C1: Positive Familienanamnese = Amsterdam-Kriterium 1 positiv
- C2: Synchrones / metachrones Kolorektales-Ca, HNPCC-assoziiertes Tumor
- C3: Zwei erstgradige Verwandte sind an Kolorektalem-Ca oder einem HNPCC-assoziiertem Tumor erkrankt, einer davon <45 Jahren und/oder an einem Adenom <40 Jahren
- C4: Diagnose eines Kolon- oder Endometrium-Ca <45 Jahre
- C5: Diagnose eines Kolonadenoms <40 Jahre
- C6: Diagnose eines undifferenzierten Kolorektalen-Ca <45 Jahre
- C7: Histologie muzinös / Siegelringzellen / Entzündliche Reaktion
- C8: Amsterdam-Kriterium 2 positiv

Die restlichen 5 Patienten waren an weiteren HNPCC assoziierten Karzinomen erkrankt:

Nummer	Geschlecht	Alter bei Diagnosestellung	Familienanamnestische Kriterien	Lokalisation	Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse
300	Weiblich	45	C2,3,4	Endometrium	2
399	Weiblich		C 3,4	Endometrium	2
277	Weiblich	71	M2	Urether	1
342	Männlich	70	C 3, 8	Dünndarm	1
139	Männlich			Ösophagus	0

Als Kontrollkollektiv wurde DNA von 96 nicht an einem Tumor erkrankten Personen verwendet und im auffälligen Genabschnitt über das DHPLC-System analysiert.

Tabelle3: Kontrollkollektiv (Median Frauen: 56 Jahre; Median Männer: 50 Jahre)

Nummer	Geschlecht	Alter
1	w	89
2	w	86
3	w	83
4	m	82
5	m	81
6	w	81
7	w	80
8	w	79
9	w	78
10	w	76
11	m	74
12	w	71
13	w	70
14	w	70
15	m	69
16	m	69
17	m	68
18	m	67
19	m	67
20	m	65
21	m	65
22	w	64
23	w	64
24	w	64
25	m	64
26	m	63
27	m	63
28	w	63
29	w	63
30	m	62
31	w	62
32	w	61
33	m	61
34	m	61
35	m	61
36	m	61
37	m	61
38	m	60
39	m	60
40	w	58
41	m	56
42	w	56
43	m	56
44	w	55
45	w	55
46	w	55
47	w	54
48	w	54
49	w	54
50	m	54

Nummer	Geschlecht	Alter
56	w	51
57	w	51
58	m	51
59	m	50
60	m	48
61	w	48
62	m	48
63	m	47
64	m	47
65	m	46
66	w	46
67	w	45
68	m	45
69	m	44
70	m	43
71	m	43
72	m	43
73	m	43
74	m	43
75	m	42
76	m	41
77	m	41
78	m	38
79	m	37
80	m	36
81	m	36
82	w	36
83	m	36
84	m	36
85	m	36
86	w	36
87	m	34
88	m	33
89	m	31
90	w	31
91	m	31
92	m	30
93	w	30
94	w	28
95	m	26
96	w	25

51	w	53
52	m	53
53	w	52
54	w	52
55	m	51

4.5 DNA-Extraktion

4.5.1 Isolierung aus Blut

Lyse der Zellen

Für die Analysen wurde zunächst DNA aus Vollblut verwendet. Um diese zu gewinnen wurden jeweils 10 ml heparinisiertes Blut mit 40 ml Zellysepuffer, welcher auf 4°C gekühlt war, vermischt. Danach folgte bei 4°C für 15 Minuten eine Zentrifugation mit 3000 U/min. Nach dem Abgießen des Überstandes wurden erneut 5 ml Zellysepuffer hinzugefügt. Zur Vervollständigung der Lyse wurde diese mit weiteren 50 ml Zellysepuffer wiederholt, wobei letztlich nach Zentrifugation und Abgießen ein weißes „Plättchen“ (Zellpellet) zurückblieb, bestehend aus Zellkernen und Thrombozyten.

Nun wurden 4,5 ml Zellkernfällungspuffer, 0,5 ml 10%iges Natriumdodecylsulfat (SDS) und 0,1 ml Proteinase K (20mg/ml) hinzugefügt und 16 Stunden im Wasserbad bei 48°C belassen. Dieser Schritt führte zur Freisetzung der DNA.

Zellysepuffer

106,9 g	0,3 M Sucrose
10 ml	10 mM Tris pH 7,5
5 ml	5 mM MgCl ₂
10 ml	1 % Triton X 100

Zellkernfällungspuffer

15 ml	0,075 M NaCl
48 ml	0,024 M EDTA pH 8,0
ad 1 l Aqua dest.	

10% SDS

100 g SDS (Biorad) in 1000 ml entmineralisiertem Wasser aufgelöst

Reinigung und Fällung

Die folgenden Schritte bezwecken die Reinigung der DNA von Proteinen und Lipiden.

Bei Raumtemperatur und unter dem Abzug wurde die Extraktion mit 5 ml Phenol-Mix unter 10 minütigem Schwenken durchgeführt. Die Suspension musste schließlich milchig weiß

erscheinen.

Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 3000 U/min konnte mit der DNA-haltigen Phase erneut die Extraktion durchgeführt werden.

Anschließend wurde derselbe Vorgang mit 5 ml Chloroform-IAA wiederholt und der Überstand (DNA) wiederum abpipettiert.

Fällung

Zur Fällung der DNA wurde 0,5 ml 3 M Natriumacetat und 12,5 ml 100%iges Ethanol (auf – 20°C gekühlt) hinzugefügt und das Reagenzröhrchen vorsichtig geschwenkt. Das DNA-Präzipitat wurde nun als weißer geknäuelter Faden sichtbar und konnte an einer Pipettenspitze in ein Eppendorfgefäß überführt werden.

Zum Waschen der DNA wurde diese mit 70%igem Äthanol mehrmals gespült und dadurch das Salz entfernt. Das gleiche Prozedere wurde mit 100%igem Äthanol zur Entfernung des Wassers durchgeführt.

Über Nacht und in einem offenen Gefäß erfolgte schließlich die Trocknung der DNA, woraufhin die DNA über mehrere Tage in 1,5 ml TE-Puffer pH 7,4 gelöst wurde.

Die photometrische Mengenbestimmung und Verdünnung dieser Stocklösung wird unter 3.5.3 beschrieben.

Phenol-Mix

250 ml	Rotiphenol
250 ml	Chloroform-IAA
960 ml	Chloroform
40 ml	Isoamylalkohol (IAA)

Fakultativ erfolgte die DNA-Isolation auch über das Quiagen DNA-Isolierungskit entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

4.5.2 Isolierung aus Paraffinschnitten

Für die Analyse der DNA im Tumor wurden Proben aus formalinfixiertem und in Paraffin gebetteten Tumorgewebe gewonnen.

Dazu wurden zuerst 7µm dicke Schnitte aus den jeweiligen Paraffinblöcken angefertigt und einer HE-Färbung unterzogen. Auf diesen Schnitten konnte dann unter lichtmikroskopischer Betrachtung das tumoröse Areal markiert werden. So wurde der Anteil an nicht tumorösen Zellen möglichst gering gehalten.

Grundlage der manuellen Dissektion waren Hämalaun-Schnitte, aus denen mit einem Skalpell unter Vergleich mit den markierten HE-Schnitten die Gewebeanteile entnommen wurden.

Im Folgenden werden die dazu benötigten Schritte erläutert.

Entparaffinierung der Schnitte in absteigender Alkoholreihe

2 x	Xylol	je 10 Minuten
2 x	100 % Isopropanol	je 10 Minuten
2 x	96 % Ethanol	je 5 Minuten
2 x	70 % Ethanol	je 5 Minuten
1 x	Aqua dest.	10 Minuten

HE-Färbung

Hämalaun, saures nach Mayer	30 Sekunden
Leitungswasser	kurz fließend
1 % wässriges Eosin	30 Sekunden

anschließend werden die Schnitte kurz in eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol getaucht, mit Balsam (Pertex) betropft und mit einem Deckglas versehen.

Haemalaun-Färbung für die anschließende Makrodissektion

Hämalaun, saures nach Mayer	30 Sekunden
Aqua dest.	kurz fließend

Makrodissektion und Proteinase K-Verdau

Nach dem Abtragen der gewünschten Gewebeprobe von den Haemalaun-Schnitten mit einem Skalpell, wurde das Gewebe in ein Eppendorfgefäß mit Proteinase K-Puffer überführt.

Proteinase K-Puffer: 2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
80 ml 1 M Tris/HCL, pH 8,3
ad 1 l aqua dest.
pro 50 ml 250 µl TWEEN 20 steril filtrieren

Je nach Menge des abgetragenen Gewebes wurden zwischen 50 und 200µl Proteinase K-Puffer pro Probe verwendet.

Nach Abschluss dieses Schrittes wurde 1µl Proteinase-K (20 mg/ml) auf 50µl bzw. 100µl Puffer hinzugegeben und führte so zu einer Endkonzentration von 0,2-0,4 mg/ml.

Proteinase-K führt zum Abbau von Zellproteinen und der Kernmembran und somit zur Freilegung der nackten DNA. Diese Eigenschaft wird im Zuge der DNA-Isolation genutzt.

Anschließend folgte eine Inkubation bei 55°C im Thermomixer über Nacht. Zur abschließenden Inaktivierung des Enzyms wurden nun die Proben 10 Minuten bei 96°C gekocht.

4.5.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Menge und Verdünnung zur

Gebrauchslösung

Nach erfolgreicher DNA-Extraktion wurde im Photometer die Konzentration der 1:20 – 1:50 verdünnten Proben bestimmt. Hierbei wurde die UV-Absorption der Proben bei 260 nm gemessen, da hier die DNA ihr maximales Absorptionsvermögen besitzt.

Die Verdünnung der Stocklösung zur Gebrauchslösung soll zu einer Einstellung auf 20ng/µl führen und erfolgt in Abhängigkeit von der gemessenen Konzentration mit TE-Puffer.

4.6 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht eine selektive Vermehrung einzelner DNA Abschnitte und somit die molekulargenetische Analyse dieser Sequenzen.

Benötigt werden dazu die entsprechenden Primer, welche zu den jeweiligen entgegengesetzten Anfängen bzw. Enden der DNA-Abschnitte komplementäre synthetische Oligonukleotide sind. Nach der *Denaturierung* des zu vermehrenden DNA Doppelstrangs mittels Erhitzen liegt dieser nun als Einzelstrang vor und die Primer binden an diesen über Wasserstoffbrücken (=Annealing). Die optimale Annealingtemperatur des jeweiligen Exons sowie auch die Pufferkonzentration wurden in der Etablierung ausgetestet (siehe 5.1.1).

In der anschließenden *Extension* vervollständigt die zugegebene Polymerase die einzelsträngige DNA an den durch die Primer markierten Stellen. Diese dient hierbei als Matrize während Nukleotide (als dNTPs zugegeben) an das 3`Ende der Primer anbinden.

Infolge einer exponentiellen Kettenreaktion erhält man nach 30-facher Wiederholung dieses Zyklus eine milliardenfache Kopie der gewünschten DNA-Sequenz.

Tabelle 4:

25µl PCR-Reaktionsansatz

Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	dNTP	Puffer	Taq-DNA-Polymerase	DNA-Probe
0,5 µl (20 pmol/µl)	0,5 µl (20 pmol/µl)	4 µl	2,5 µl	0,25 µl	20 ng

In 35 Zyklen wurde die PCR-Reaktion im Gene Amp. PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) oder im Mastercycler gradient eppendorf (Hamburg) mit der jeweils spezifischen Annealingtemperatur durchgeführt.

Zur Überprüfung der Reinheit des Ansatzes wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne zugefügte DNA mitgeführt.

Die Etablierung der spezifischen Annealingtemperaturen wurde im Mastercycler gradient eppendorf, einem PCR-Gradientencycler welcher die gleichzeitige Amplifizierung von mehreren Proben bei verschiedenen Temperaturen erlaubt, durchgeführt und wird unter 5.1.1 erläutert.

Herstellung der PCR-Puffer in einer 10-fach konzentrierten Stammlösung:

20 ml TRIS-HCL, 1 M, pH 8,3
 100 ml KCL, 1 M
 200 mg Gelatine
 80 ml H₂O (milibore)

a 48 ml:

Für 10 mM Puffer:
 480 µl MgCl₂, 1M

Für 15 mM Puffer:
 720 µl MgCl₂, 1 M

Für 20 mM Puffer:
 960 µl MgCl₂, 1 M

Ein PCR-Ansatz bestand aus:

10 mM Tris-HCL ph 8,3
 50 mM KCL
 1-2mM MgCl_{2q}
 0,01% Gelatine
 200µM dNTPs
 0,4 µM Primer

pro 25µl Reaktionsansatz 1,25 U Taq Polymerase und
 20-40 ng DNA-Probe

Tabelle 5:

Primersequenzen und Amplifikatlänge der Exo-1 Exons (*Wu Y., 2001:1581*)

Exon	Vorwärts-Primer/ Rückwärts-Primer	Basenpaare
2	5`-ata tta ctg ttc tcc ctg tc-3` 5`-gtc aaa gaa tta aca taa gg-3`	243 bp
3	5`-gaa agg tga agc act gaa tg-3` 5`-tta gtg caa tga agt tag ag-3`	201 bp
4	5`-att taa aaa atg ttc ttc cc-3` 5`-tga act tgc cca tct gcc cc-3`	180 bp
5	5`-aga tgc cgt gct aga gat tc-3` 5`-gta ata tat agt agt cag ag-3`	206 bp
6	5`-aat gac aaa agt ggc cct tc-3` 5`-aag gaa atg ctt cag aaa ttg aat atg-3`	313 bp
7	5`-cct gtt ctt tag ttg cag at-3` 5`-gca caa att cta cca ttc tg-3`	268 bp
8	5`-gta taa tat cat ttg gtt gg-3` 5`-cag ctc ggg aca taa cta aa-3`	211 bp
9	5`-cgc cc/c ttt ctg caa ata atc ttt t-3`? 5`-ata ttc acc agc att ttg ca-3`	299 bp
10	5`-cag gtg aaa caa aga ttt ac-3` 5`-aca atc aac att ctg gag ac-3`	319 bp
11a	5`-tca tac tta ctt att gtt tc-3` 5`-ttc ttg gtc tcc ata ctc tg-3`	162 bp
11b	5`-taa aga gaa caa tct gca tg-3` 5`-ctc ggc gtt ctt gaa aaa tc-3`	273 bp
11c	5`-ttt tag ttg gtc tgg agg tc-3` 5`-gaa aac aaa gcc ttc agg at-3`	315 bp
12	5`-cgc att tta ttt ttt gat ctg gg-3` 5`-acc gct tct gaa att aaa aaa aa-3`	172 bp
13	5`-cag aat ggt ctt aaa atg gg-3` 5`-ctt gtt tca gaa taa gaa ac-3`	256 bp
14	5`-ctt ctc taa taa tca gta cc-3` 5`-aat tga tca gat tct ctt gc-3`	239 bp

Für die Durchführung der Sequenzanalyse wurde bei Exon 11c und 13 zur Optimierung der Sequenzierreaktion jeweils ein neu gelegter Reversprimer benutzt:

Exon 11c, revers: 5`-tcg taa ggg atg aga ctc at-3` → 181 bp

Exon 13, revers: 5`-gaa taa gaa aca agg caa ctc-3` → 247 bp

Zur Herstellung der Primer-Gebrauchslösung wurde, wie in 4.5.3 beschrieben, die Primerkonzentration photometrisch bei 260nm gemessen und anschließend der Verdünnungsfaktor berechnet, welcher zur Verdünnung auf 20 pmol/µl benötigt wird. Verdünnt wurde mit aqua dest.

Zum Austesten der optimalen Bedingungen für den jeweiligen Primer durch Temperatur- und Puffervariation siehe 5.1.1.

PCR-Programm:

Zu Beginn wurde der PCR-Ansatz einmalig auf 94°C für 4 min. erhitzt. Anschließend folgte ein Zyklus, bestehend aus 30 sec. bei 94°C, 30 sec. bei der jeweiligen Annealingtemperatur und 30 sec. bei 72°C. Dies wurde 34 mal wiederholt, wobei nach dem letzten Zyklus noch 7 min. bei 72°C folgten. Abschließend wurde der Ansatz auf 4°C herabgekühlt.

Tabelle 6:

PCR-Bedingungen

Exon	Annealingtemperatur	MgCl₂-Konzentration	Zyklen
2	55°C	1,5 mM	35
3	55°C	1,5 mM	35
4	48°C	1,0 mM	35
5	52°C	2,0 mM	35
6	55°C	1,5 mM	35
7	55°C	1,5 mM	35
8	52°C	1,5 mM	35
9	50°C	1,5 mM	35
10	55°C	1,5 mM	35
11a	50°C	1,5 mM	35
11b	55°C	2,0 mM	35
11c	55°C, mit verkürzendem Primer: 54°C	1,5 mM	35 (40)
12	52°C	1,5 mM	35
13	52°C	1,5 mM	35
14	58°C	2,0 mM	35

4.7 Gelelektrophorese

Um die Reinheit und Größe der PCR-Produkte (Amplifikate) zu überprüfen, wurden jeweils 4µl des Amplifikats mit je 1µl 10-fach konzentriertem Gelladepuffer in die Taschen eines Agarosegels eingebracht.

Es wurde ein 2%iges Agarosegel mit 0,5µl/ml Ethidiumbromid verwendet.

Agarosegel:

2 mg	Agar
100 ml	1 x TBE
1 Tropfen	Ethidiumbromid

Nach einer Laufzeit von 20 Minuten bei 120 V in einem 1× TBE Laufpuffer konnte unter UV-Licht das fluoreszierende Ethidiumbromid, welches nun die DNA durch Interkalierung markiert hatte, sichtbar gemacht werden.

Eine einzelne, klar abgrenzbare Bande und keine Bande im Bereich der Kontrollprobe sprachen für die Reinheit des Amplifikats. Die Größe der Bande (Laufhöhe) wurde mit dem jeweils mitgeführten Marker HAE III verglichen. Durch Abgleich mit dem DNA-Längenstandard konnte die jeweilige Länge des Amplifikats abgeschätzt werden.

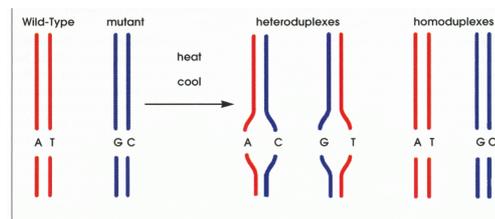
4.8 DHPLC (denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie)

Die Methode der DHPLC ist relativ neu und erlaubt die Detektion und Identifizierung von Mutationen, auch wenn Art und Ort der Mutation noch nicht bekannt sind.

Man geht hierbei von der Tatsache aus, dass Individuen mit einer heterozygoten Mutation oder Polymorphismus ein 1:1 Verhältnis zwischen Wildtyp und mutierter DNA besitzen.

Das Erhitzen und damit Denaturieren der PCR-Amplifikate im Cycle-Gerät auf 95°C und ein anschließendes langsames Abkühlen (siehe Abkühlprogramm) führen zur Hybridisierung von Wildtyp und mutierter DNA und zu einer Mischung aus Homo- und Heteroduplexen. Unter Heteroduplexen versteht man einen DNA-Doppelstrang mit einer Basenfehlpaarung.

Trennprinzip DHPLC (denaturing high pressure liquid chromatographie)



1. Binden der DNA Moleküle an die Säule



2. Elution: Temperatur, Acetonitril

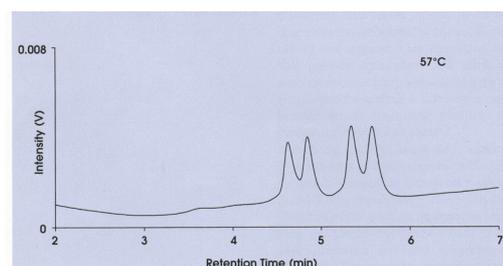


Abbildung 3:

Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte der DHPLC-Methode: Erhitzen mit anschließendem langsamen Abkühlen und damit Bildung der Heteroduplexe, Bindung an die Chromatographiesäule (1) und Elution von der Säule je nach Schmelzeigenschaft des gebundenen DNA-Stranges (2).

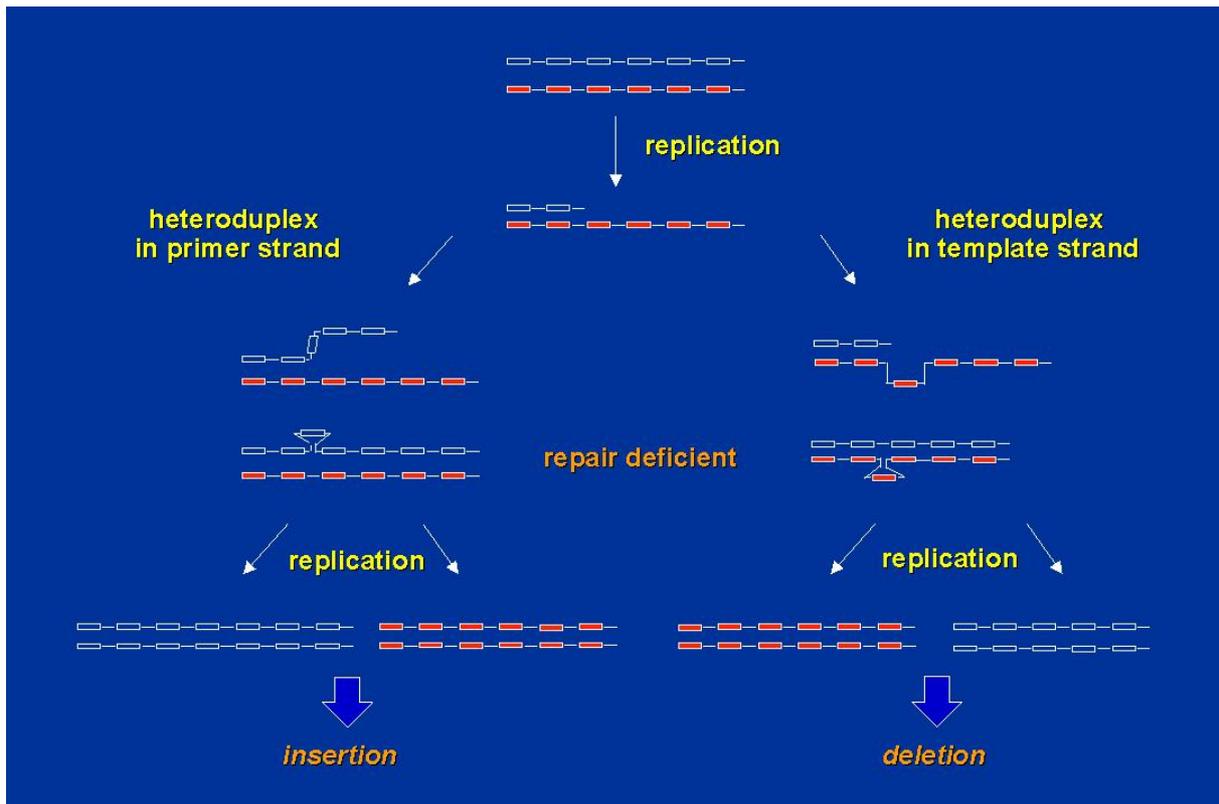


Abbildung4:

Darstellung der Entstehung von Insertionen oder Deletionen bei mangelnder DNA-Reparatur.

Zur DHPLC-Analyse wurde das automatisierte WAVE System von Transgenomic, Omaha/Nebraska verwendet.

Hierbei wird zunächst die DNA an eine Chromatographiesäule gebunden. Die Säulenmatrix kann die doppelsträngige DNA nur über das Brückenmolekül TEAA (Triethylamoniumacetat) binden, welches im Puffer (siehe unten) enthalten ist. Dabei interagiert das positiv geladene Ammoniumion des TEAA mit den negativ geladenen Phosphationen der DNA-Moleküle und bindet gleichzeitig an die Matrix. Längere DNA-Fragmente werden dabei stärker gebunden und Einzelstränge schneller aus der Säule ausgewaschen.

Das System der DHPLC ist nun in der Lage die Heteroduplizes und Homoduplizes voneinander zu unterscheiden, indem es die DNA-Stränge durch Hitze teilweise denaturiert und sich die unterschiedlichen Schmelzeigenschaften zunutze macht (Taylor et al, Transgenomic application note 101). So werden unter bestimmten partiell denaturierenden Bedingungen die Heteroduplexmoleküle aufgrund ihrer geringeren Stabilität eher von der Säule eluiert als die Homoduplexmoleküle. Verantwortlich ist dafür insbesondere die Temperatur und die Azetonitrilkonzentration im Puffer.

Durch eine Analyse des Schmelzverhaltens der jeweiligen DNA-Homoduplex wird die Temperatur bestimmt, bei der noch ca. 75 – 90 % der Moleküle als Doppelstrang vorliegen. Die Ermittlung der Schmelzkurve erfolgt in der Regel im Temperaturbereich von 50 – 65 °C und ist im wesentlichen von der DNA-Sequenz (GC-Gehalt) des Fragments abhängig.

Die Elution des Fragments bei der jeweiligen Temperatur erfolgt durch eine steigende Acetonitrilkonzentration im Puffer. Durch Acetonitril erfolgt eine Verdrängung der über das TEAA gebundenen DNA von der Säule.

Für eine optimale Auftrennung wird die Temperatur verwendet, bei der ca. 75 – 90 % der Moleküle noch als Doppelstrang vorliegen. Ergeben sich aufgrund der Schmelzkurve des DNA-Fragments Hinweise auf das Vorliegen mehrerer Schmelzdomänen, die aufgrund eines unterschiedlichen GC-Gehalts innerhalb des Fragments auftreten können, so wird die Analyse bei zwei oder auch drei verschiedenen Temperaturen durchgeführt.

Der Vergleich zwischen den selbständig ermittelten Temperaturen und den vom Wavemakercomputer vorgeschlagenen wird im Ergebnisteil beschrieben.

Für die DHPLC-Analysen sollte das zu untersuchende Exon möglichst in 150-450 Basenpaar lange Abschnitte unterteilt werden.

Abkühl-Programm:

94°C 4 Minuten
1°C / Minute abkühlen bis auf Raumtemperatur

Puffer A:

50 ml TEAA (2 M)
250 µl Acetonitril
auf 1000 ml mit HPLC-Wasser auffüllen

Puffer B:

50 ml TEAA (2 M)
250 ml Acetonitril
auf 1000 ml mit HPLC-Wasser auffüllen

Puffer C:

750 ml Acetonitril
250 ml HPLC-Wasser

Spritzenpuffer:

80 ml Acetonitril
auf 1000 ml HPLC-Wasser auffüllen

4.9 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung der auffälligen Proben wurde die Methode nach Sanger (1975) verwendet. Dies ist ein enzymatisches Verfahren, welches mittlerweile automatisiert eingesetzt werden kann und als Kettenabbruchmethode funktioniert.

Der zu sequenzierende DNA-Abschnitt wird hierbei getrennt, einmal mit dem Vorwärtsprimer und einmal mit dem Rückwärtsprimer, amplifiziert. Zum gewünschten Kettenabbruch kommt es beim Einbau eines fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosids. Diese werden als ddNTPs dem Ansatz hinzugefügt. Es werden jedoch ebenfalls alle vier Basen als dNTPs zugegeben, so dass es nicht prinzipiell zu einem Kettenabbruch kommen muss (Petrides P.E., 1998:322).

Während des elektrophoretischen Laufs über das Sequenzgel wird die DNA der Länge nach aufgetrennt und ein automatisches Lesegerät kann die fluoreszenzmarkierten DNA-Abbruchenden messen und so die Abfolge der Sequenz interpretieren.

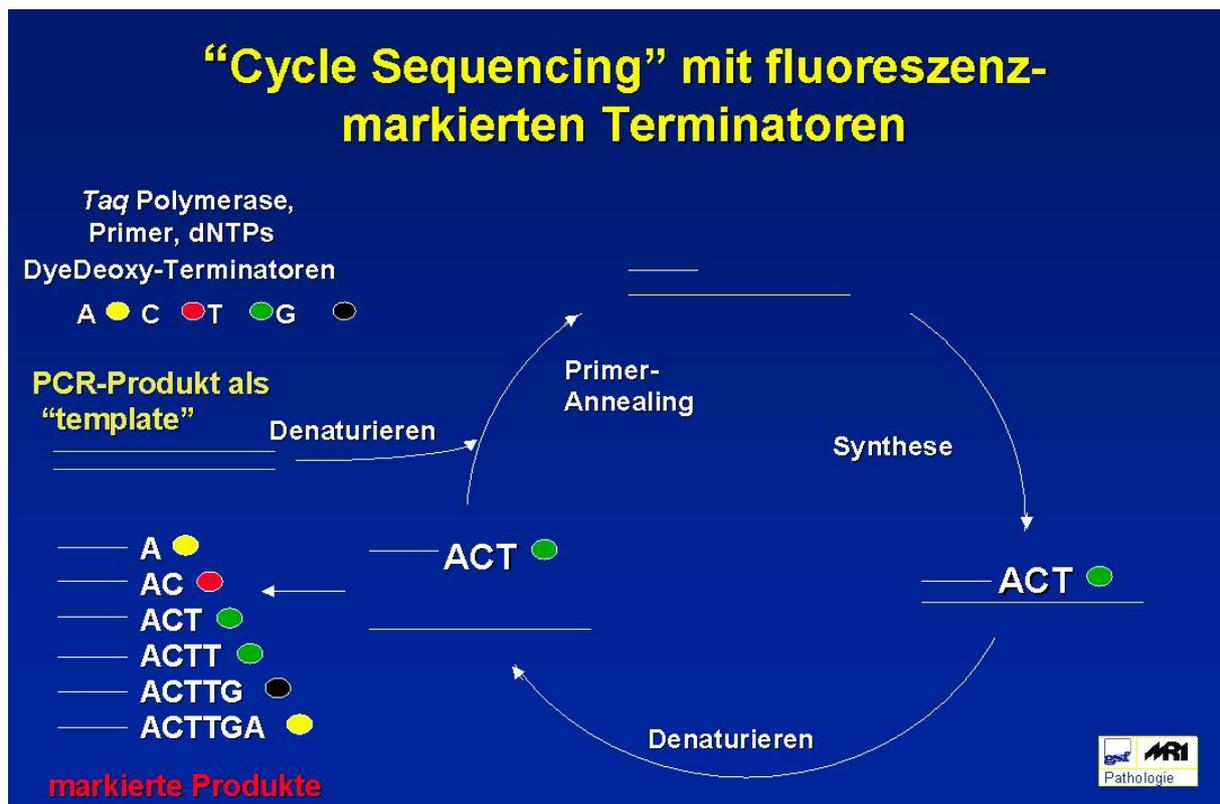


Abbildung 5:

Darstellung der Methode der fluoreszenzmarkierten DNA-Sequenzierung und ihrer einzelnen Arbeitsschritte

Im Folgenden wird auf die Einzelschritte der DNA-Sequenzierung näher eingegangen.

Low-melting Gelelektrophorese

Nach Amplifikation des zu sequenzierenden Genabschnittes durch einen 50 µl PCR-Ansatz und dessen Reinheitskontrolle im Agarosegel, wird das Amplifikat auf ein low-melting Gel aufgetragen.

low-melting Gel: 0,5 g Agar
1,5 g low-melting Agar
100 ml 1 x TBE
1 Tropfen Ethidiumbromid

Die Spannung betrug 170 V und nach 15 Minuten wurde unter UV-Licht die nun vom Primer getrennte Amplifikatsbande mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Reinigung der Amplifikate

Über ein Gelextraktionskit (Qiagen) wird die aus dem Gel ausgeschnittene Bande gereinigt. Dies wird gemäß der Anleitung von Quiagen durchgeführt. Das Ergebnis wird erneut auf einem Agarosegel überprüft.

Cycle Sequenzierung

Die gereinigten Proben werden in einem 20 µl Ansatz mit jeweils einem Primer und den für den Kettenabbruch verantwortlichen Terminatoren erneut gecycelt.

Cycle-PCR Ansatz: 4 µl Premix
0,5 µl Primer (20 pmol/µl)
1 µl DMSO
8-14,5 µl Template (je nach Stärke des aufgereinigten Amplifikats)
Aqua dest. ad 20 µl

Berechnung der Annealing-Temperatur:

je Primer für A und T je 2°C

für C und G je 4°C

Gesamttemperatur – 5°C = Annealingtemperatur

Überschreitet eine berechnete Temperatur 60°C, so wird bei 60°C gecycelt.

Tabelle 7:

berechnete Annealingtemperaturen der einzelnen Exons

Exon	Temperatur Vorwärtsprimer	Temperatur Rückwärtsprimer
4	45 °C	59 °C
6	53 °C	60 °C
7	51 °C	51 °C
9	60 °C	49 °C
10	49 °C	51 °C
11a	45 °C	53 °C
11b	49 °C	53 °C
11c	53 °C	51 °C; 53 °C *
12	57 °C	47 °C
13	51 °C	47 °C; 53 °C *
14	49 °C	49 °C

** Annealing-Temperatur des neugewählten Rückwärtsprimers zur Analyse der Varianten des Exons 11c unter Ausschluß der Variante des Nukleotids 2009 (siehe 5.2.2, Tabelle 12)*

In der Cycle-PCR wurde das aufgereinigte Produkt zuerst 10 Sekunden auf 96°C erhitzt. Anschließend folgten 5 sec. bei der für den jeweiligen Primer errechneten Temperatur (siehe Tabelle 7) welche von 4 min. bei 60°C abgelöst wurden. Dieser Zyklus wurde 24mal wiederholt. Nach dem letzten Zyklus wurden die Proben auf 4°C herabgekühlt.

Reinigung der Cycle-Amplifikate

Im Anschluss an die Cycle-PCR sollte möglichst kein Einfrieren der Proben mehr erfolgen und direkt die Reinigung durch Centri Sep Columns entsprechend der Anleitung durchgeführt werden. Hierbei werden nicht eingebaute markierte ddNTPs durch Gelfiltration abgetrennt. Abgeschlossen wird dieser Schritt durch die Eintrocknung im Speed Vac über ca. 20 Minuten.

Sequenzgel

Ladepuffer:

50 mg/ml Blue Dextran in 25 mM EDTA, pH 8,0 im Verhältnis 1:5 mit deionisiertem Formamid mischen. In 6 µl dieses Ladepuffer werden die getrockneten Proben jeweils resuspendiert, gevortext und abzentrifugiert.

Anschließend folgt eine Denaturierung bei 95°C über 5 Minuten und das Laden von 1,5 µl auf das Gel.

Sequenzgel: 0,5 long ranger Hydrolink Gel

5 ml Hydrolink-Gel

5 ml 10 x TBE

21 g Harnstoff

bidest. ad 50 ml

350 μ l (bzw. 180) 10% APS

15 μ l (45) TEMED

Als Laufpuffer wird 1 x TBE verwendet und die Polymerisationszeit beträgt zwei Stunden.

5. Ergebnisse

5.1 Etablierung

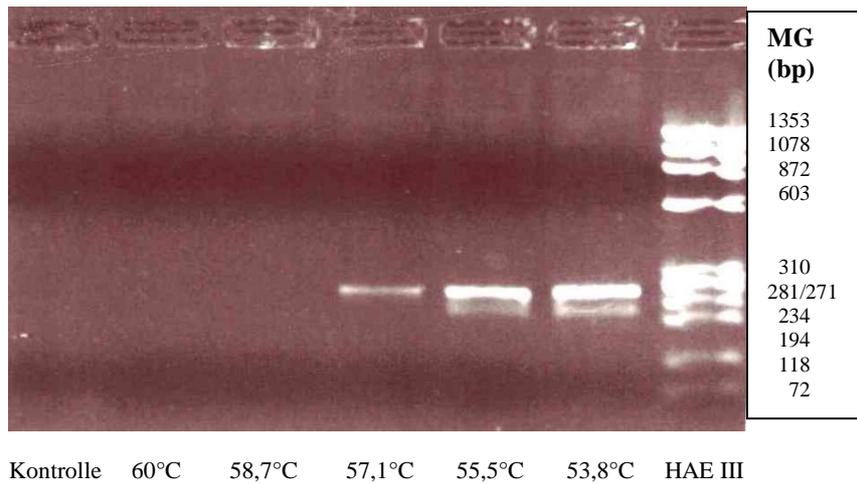
Vor der Durchführung der Analysen mussten die PCR-Bedingungen zur Amplifikation der einzelnen Exons, sowie die optimale Temperatur für die DHPLC-Methode bestimmt werden. Dies wird im Folgenden genauer beschrieben.

5.1.1 PCR

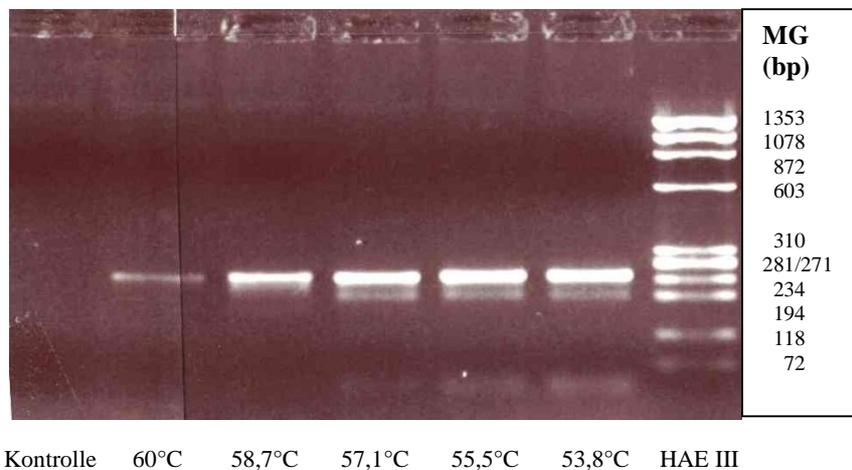
Im Gradientencycler von Eppendorf war es möglich, mehrere PCR-Ansätze bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen gleichzeitig zu amplifizieren. Begonnen wurde dabei meist mit fünf Temperaturen im Bereich von 49°C bis 60°C. Nach Auswertung des Ergebnisses in der Gelelektrophorese (siehe 4.7), konnte die Temperatur mit dem besten (d.h. eine einzelne und starke Bande entsprechend der zu erwartenden Größe bei Vergleich mit dem Längenmarker) Amplifikat ausgewählt werden.

Kamen mehrere Temperaturen in Betracht, so wurde versucht, möglichst häufig gleiche Temperaturen auszuwählen, um die Durchführung der Analysen später zu vereinfachen.

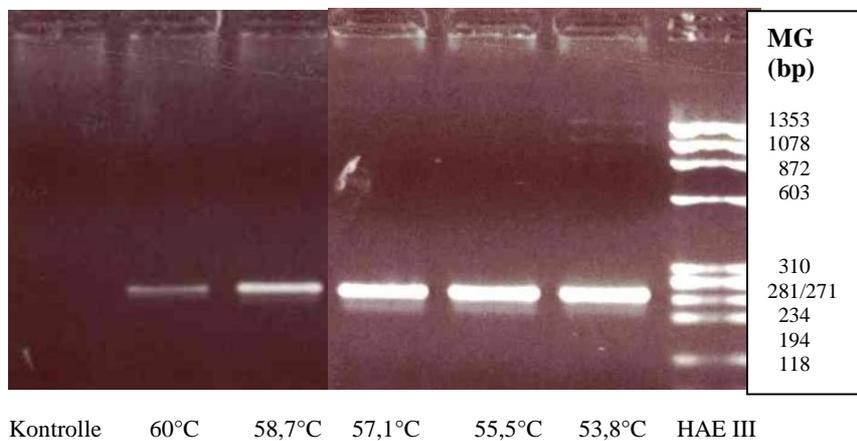
Weitere Variationsmöglichkeiten zur Erzielung optimaler Amplifikate waren in der Wahl des PCR-Puffers gegeben. In der Regel ist hierbei ein Puffer mit 1,5 mM MgCl-Konzentration (siehe 4.6) geeignet. Die Mg²⁺-Konzentration beeinflusst das Anlagern des Primers an die zu amplifizierende DNA-Sequenz und hat somit Einfluss auf die Spezifität der Amplifikation. Bei besonders schwachen Amplifikatbanden in der Gelelektrophorese wurde zu einem 2 mM MgCl-Puffer gewechselt und damit ein vermehrtes Anlagern, aber auch eine geringere Sensitivität erreicht. Umgekehrt bestand bei Erscheinen mehrerer Banden die Möglichkeit mit dem Verwenden des 1mM MgCl-Puffers die Sensitivität zu erhöhen.



1,0mM Puffer



1,5mM Puffer



2,0mM Puffer

Abbildung 6:

Auftrennung der PCR-Amplifikate des Exons 14 im Agarosegel

Die unter UV-Licht sichtbare Bande entspricht im Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker einer Sequenzlänge von ca. 240 Basenpaaren und stimmt somit mit der zu erwartenden Länge des Amplifikats überein.

Die unterschiedliche Qualität der Ergebnisse je nach Pufferkonzentration und Annealingtemperatur führte zur Auswahl der optimalen Bedingungen, in diesem Falle ein *2,0mM Puffer bei 58°C* (siehe Tabelle 6 unter 4.6).

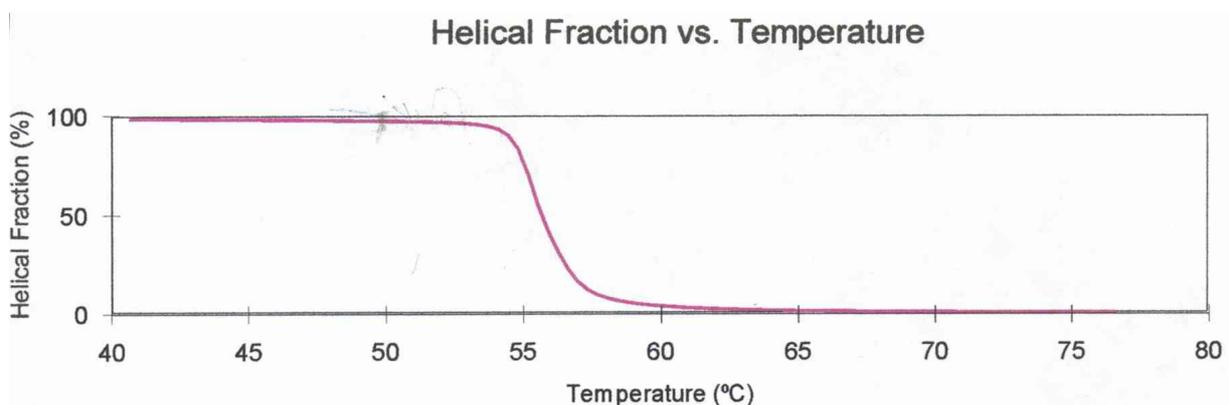
5.1.2 DHPLC

Zunächst sollte ein Vergleich der vorgeschlagenen Analysenbedingungen entsprechend dem Algorithmus der Wavemakersoftware und der durch Austestung selbst ermittelten Bedingungen durchgeführt werden. Hierzu benötigte das Programm der Computersoftware die Sequenz des jeweiligen Exons und berechnete daraus die wahrscheinliche Schmelztemperatur mit Erstellung einer Schmelzkurve (siehe Abbildung 7), die optimalen Pufferkonzentrationen (Gradienten) und die dazugehörigen Laufzeiten.

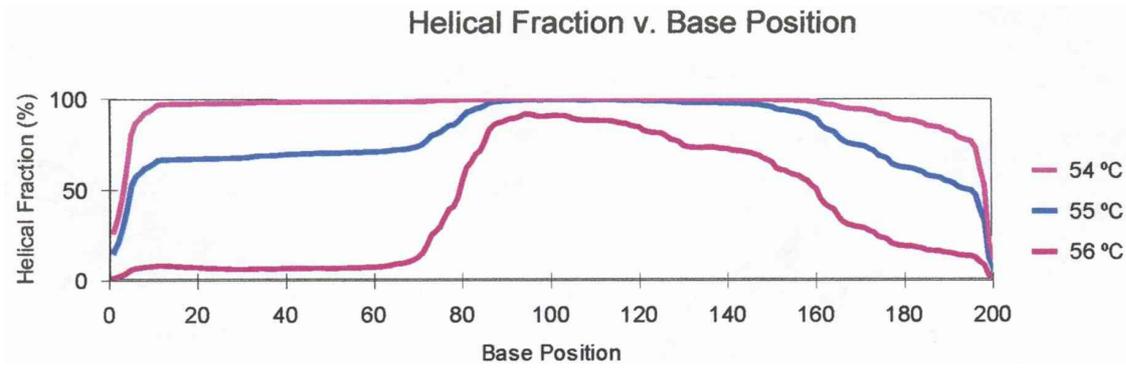
Zur selbstständigen Etablierung der Bedingungen wurde ein 50µl PCR-Ansatz amplifiziert und anschließend über das Abkühl-Programm (siehe 4.8) stufenweise abgekühlt, um die Bildung der Heteroduplizes zu fördern. Das Ergebnis der PCR wurde in der Gelelektrophorese kontrolliert und die Stärke des Amplifikats (Intensität der Bande) war ausschlaggebend für die Injektionsmenge bei der DHPLC-Analyse. Diese variierte je nach Amplifikat zwischen 5µl und 15µl.

Für die Erstellung der Schmelzkurve wurden mehrere Durchläufe mit dem Universalgradientenprogramm, das steigende Acetonitrilkonzentrationen von 40 % bis 72 % durchläuft, und Temperaturen im Bereich zwischen 50°C und 65°C geladen. Aus dem Zeitpunkt der Elution des DNA-Peaks und der dazugehörigen Temperatur konnte die Schmelzkurve konstruiert werden. Die optimale Analysentemperatur lag nun an der Stelle von 75 - 90%-igem Vorliegen der DNA als Doppelstrang. Je nach Beschaffenheit der Schmelzkurve konnten auch zwei oder eventuell drei Schmelzdomänen vorhanden sein (siehe Abbildung 8).

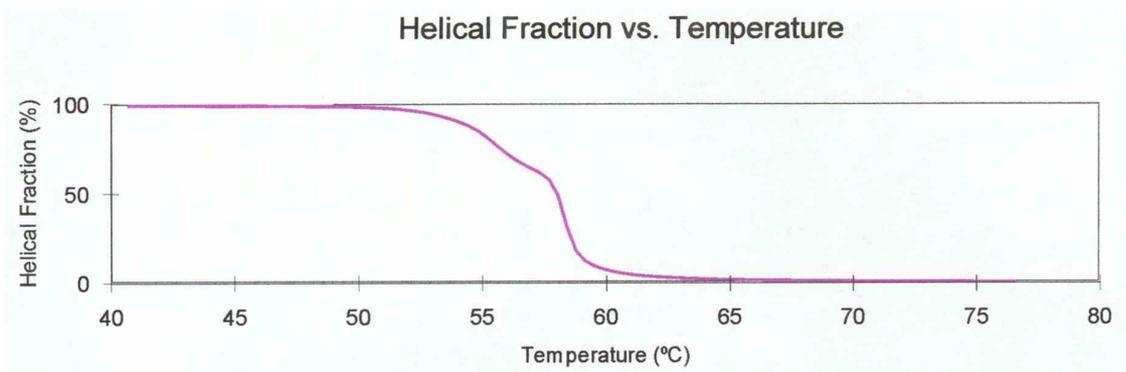
Abbildung 7:



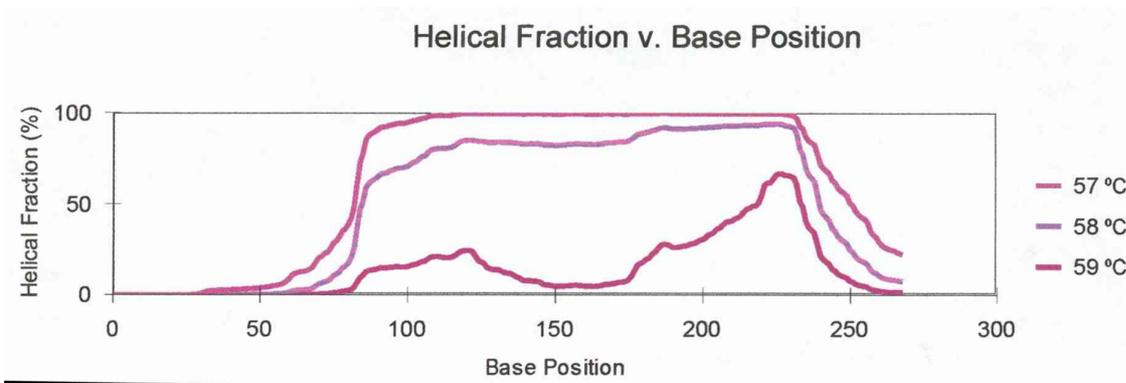
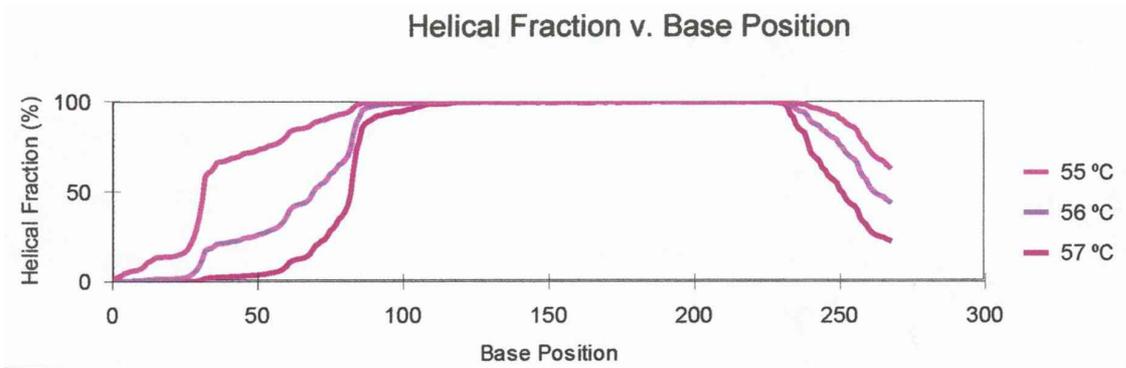
a.) Schmelzkurvenberechnung bei Exon 3 anhand des Algorithmus der Computersoftware; die optimale Analysentemperatur wird mit 55°C angegeben.



b.) Darstellung der prozentualen helikalen Fraktion, in Abhängigkeit von der Sequenz und bei unterschiedlichen Temperaturen

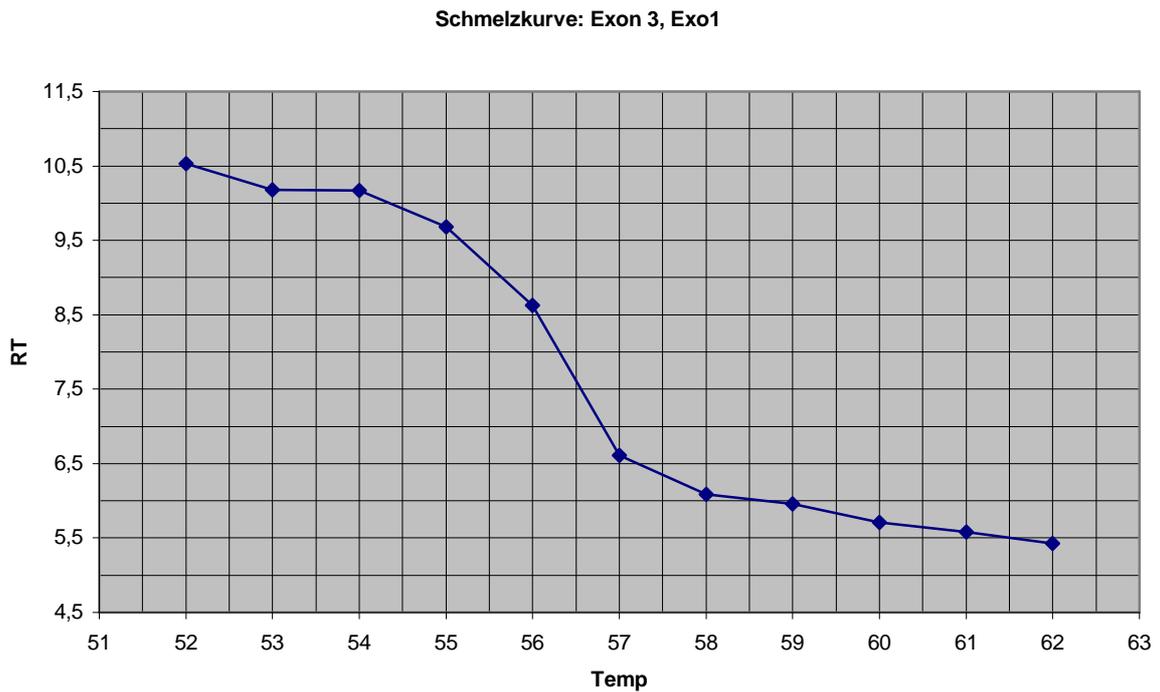


c.) Schmelzkurvenberechnung anhand des Algorithmus der Computersoftware am Beispiel des Exon 7; die optimale Analysentemperatur wird mit 56°C angegeben

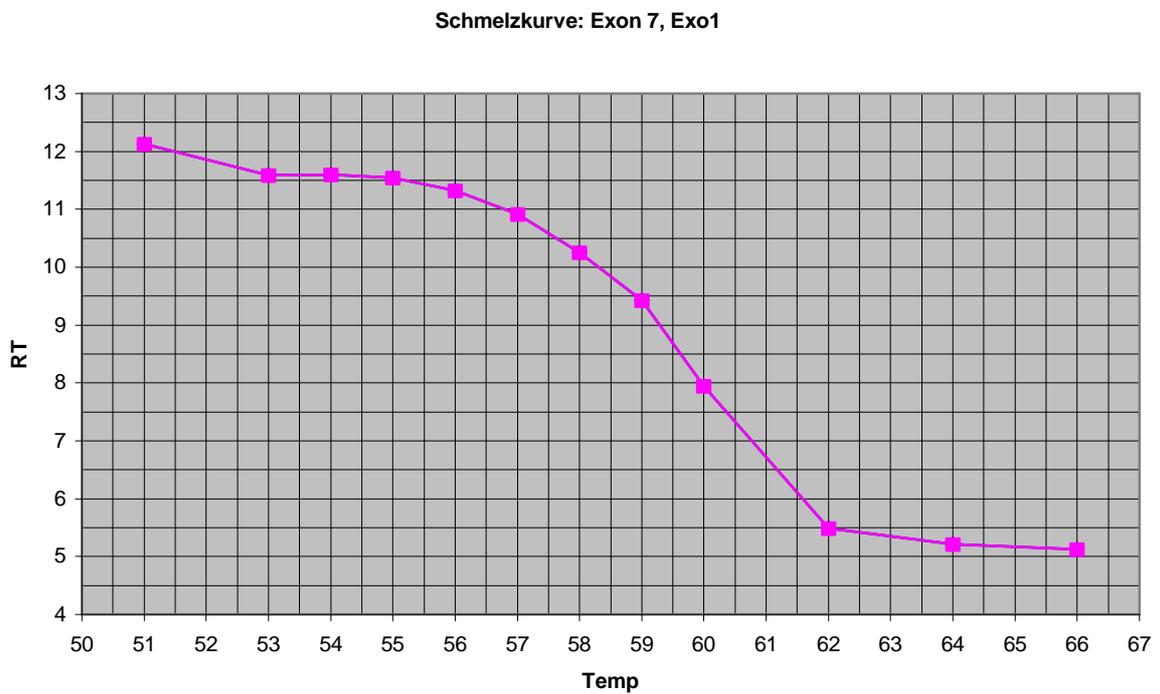


d.) Darstellung der prozentualen helikalen Fraktion, in Abhängigkeit von der Sequenz bei unterschiedlichen Temperaturen am Beispiel von Exon 7

Abbildung 8:



- a.) Schmelzkurve des Exon 3; die Beschaffenheit der Kurve lässt auf eine Schmelzdomäne schließen; die Temperatur wurde bei 55°C gewählt.



- b.) Schmelzkurve des Exon 7; aufgrund der Beschaffenheit der Kurve wurden 2 Analysentemperaturen bei 56°C und 58°C gewählt.

Tabelle 8:

Vergleich der Temperaturen des Wavemakerprogramms und der aufgrund der erstellten Schmelzkurve ermittelten Temperaturen

Exon	Schmelztemperatur des Wavemakerprogramms	Aufgrund der erstellten Schmelzkurve ermittelte Temperatur
2	57°C	59°C und 57°C
3	55°C	55°C
4	59°C	59°C
5	59°C	59°C und 62°C
6	57°C	56°C, 58°C und 60°C
7	56°C	56°C und 58°C
8	55°C	55°C und 57°C
9	57°C	57°C und 59°C
10	57°C	55°C, 57°C und 59°C
11a	55°C	54°C und 56°C
11b	58°C	58°C
11c	59°C	58°C und 61°C
12	54°C	53°C und 55°C
13	57°C	57°C, 60°C und 62°C
14	57°C	53°C, 56°C und 58°C

Es zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung in den jeweils gewählten Temperaturen. Alle software-ermittelten Analysentemperaturen liegen innerhalb von 1°C Abweichung von den anhand der Schmelzkurve selbstständig berechneten. Jedoch wurden experimentell in den meisten Fällen mehrere Temperaturen ermittelt, während die Computersoftware ausschliesslich eine Temperatur angab.

Nach der Auswahl der Analysentemperaturen war es möglich, die Methode anhand einer Anpassung des Gradienten zu verkürzen. Im Vergleich mit dem Universalgradientenprogramm konnte so mit einem höheren Prozentsatz an Puffer B begonnen werden (der Peak erscheint früher) und mit einem niedrigeren Prozentsatz an Puffer B im Vergleich zum Universalgradienten gestoppt werden. Bei Exon 3 konnte im Zuge dieser Verkürzung der Gradient auf 48 – 59 % B festgelegt werden. Dies bedeutet, dass dieser Schritt 5,5 Minuten dauert, da pro Minute Puffer B um 2 % erhöht wird. Die restlichen Berechnungen der Methode variieren nicht. Der erste Schritt dauert 0,1 Minuten und beinhaltet eine Erhöhung des Puffers B um 5 %. Anschließend folgt der jeweils berechnete Schritt des Gradienten, dann 0,1 und 0,5 Minuten bei 100 % Puffer C um restliche gebundene DNA von der Säule zu waschen und abschließend 0,1 und 2,0 Minuten Aquilibrieren beim Ausgangsverhältnis der Puffer.

Tabelle 9:

verkürzte endgültige DHPLC-Methode am Beispiel des Exons 2, 57°C

Zeit	Puffer A	Puffer B	Puffer C
0,0 min	53 %	47 %	0
0,1 min	48 %	52 %	0
5,1 min	38 %	62 %	0
5,2 min	0	0	100 %
5,7 min	0	0	100 %
5,8 min	53 %	47 %	0
7,8 min	53 %	47 %	0

Tabelle 10:

Vergleich des vom Wavemaker errechneten Gradienten und des selbstständig ermittelten Gradienten

Exon und Temperatur	Errechneter Gradient des Wavemakers (% Puffer B)	experimentell ermittelter Gradient (% Puffer B)
2: 57°C 59°C	52 – 61	52 – 62 50 – 60
3: 55°C	50 – 59	50 – 64
4: 59°C	49 – 58	50 – 60
5: 59°C 62°C	51 – 60	51 – 60 46 – 57
6: 56°C 57°C 58°C 60°C	55 – 64	55 – 65 54 – 64 51 – 61
7: 56°C 58°C	53 – 62	54 – 64 52 – 62
8: 55°C 57°C	51 – 60	50 – 60 48 – 58
9: 57°C 59°C	54 – 63	56 – 65 51 – 61
10: 55°C 57°C 59°C	55 – 64	55 – 65 54 – 64 50 – 61
11a: 54°C 55°C 56°C	48 – 57	49 – 59 48 – 58
11b: 58°C	53 – 62	53 – 63
11c: 58°C 59°C 61°C	55 – 64	56 – 65 52 – 62
12: 53°C 54°C 55°C	49 – 58	50 – 60 49 – 59
13: 57°C 60°C 62°C	53 – 62	52 – 63 50 – 60 47 – 57
14: 53°C 56°C 57°C 58°C	52 – 61	53 – 63 52 – 62 50 – 60

Auch hier zeigen sich deutliche Übereinstimmungen zwischen den Vorschlägen des Wavemakers und den in der Austestung ermittelten Bedingungen. Ausschlaggebend ist

jedoch, unter welchen Bedingungen die Detektion der Varianten möglich war und ob in Zukunft auf eine experimentelle Etablierung verzichtet werden kann. Ein Vergleich der Ergebnisse unter den Wavemakerbedingungen und den etablierten Bedingungen findet sich in Tabelle 12 unter 5.2.

5.2 Analysenergebnisse

5.2.1 DHPLC

Mit den in der Etablierungsphase ermittelten Bedingungen konnte nun die DHPLC-Analyse der Proben durchgeführt werden. Anschließend wurden die Elutionschromatogramme genau ausgewertet. Als auffällig galten Proben mit einem Doppelpeak, aber auch mit Variationen in der Form des Peaks. Die unterschiedlichen Muster der Auffälligkeiten wurden durchnummeriert und so gekennzeichnet. Es wurden exemplarisch drei bis vier Proben pro auffälligem Muster und eine Kontrollprobe ohne Auffälligkeit der Sequenzanalyse unterzogen.

Tabelle 11:
Zusammenfassung der DHPLC-Ergebnisse

Exon	Anzahl der auffälligen Proben				Anzahl der unauffälligen Proben
	Muster1	Muster2	Muster3	Muster4	
2					48
3					48
4	6	14	1	1	26
5					48
6					48
7	3	1	1		43
8					48
9	24				24
10	6	6	13	2	21
11a	7	11			30
11b	23				25
11c	26	2	1		19
12	2	2			44
13	14				34
14					48

Tabelle 12:

Vergleich der Ergebnisse unter den Wavemakerbedingungen und den etablierten Bedingungen im Hinblick auf eine zuverlässige Detektion von Varianten

Exon	Variante	Auffällig unter Bedingung des Wavemakers	Auffällig unter etablierter Bedingung
7	Gly274Arg Asn279Ser	Auffällig <i>Unauffällig</i>	Auffällig Auffällig
9	Arg354His	Auffällig	Auffällig
10	Thr439Meth Val458Meth Val460Leu	Auffällig (1) Auffällig Auffällig	Auffällig (2) Auffällig Auffällig
11b	Lys589Glu	Auffällig	Auffällig
11c	Arg634Gln Pro640Ala Pro640Ser Asp661Asp Gly670Glu	Auffällig (2) gering auffällig gering auffällig gering auffällig Auffällig	Auffällig (3) Auffällig Auffällig Auffällig Auffällig
12	Cys723Arg Ser725Ser	Auffällig Auffällig	Auffällig Auffällig
13	Leu757Pro	Auffällig	Auffällig

(1) Unterscheidung der Varianten anhand des Musters nicht möglich

(2) Unterscheidung der Varianten anhand des Musters teilweise möglich

(3) Unterscheidung der Varianten anhand des Musters möglich

Das heißt, dass 1/15 Varianten (6,7 %) unter den Analysenbedingungen der Wavemakersoftware unentdeckt geblieben wäre. Bei den Probedurchläufen der Analysen des Exon 6 fiel das permanente Auftreten von Doppelpeaks auf, welche eine Interpretation der Ergebnisse stark erschwert hätten. Aus diesem Grund wurden in geringer Variation neue Primer gelegt und mit diesen die Methode neu etabliert. Die neuen DHPLC-Analysenergebnisse waren nun verwertbar.

5.2.2 Sequenzierung

Die exemplarisch ausgewählten Proben wurden, wie in 4.9 beschrieben, sequenziert und zwar sowohl mit dem Vorwärts- als auch mit dem Rückwärtsprimer. Die Ergebnisse wurden auf Abweichungen in der Sequenz vom Wildtyp untersucht. In einzelnen Fällen bereitete die Sequenzanalyse Schwierigkeiten, so dass bei einwandfreiem Ergebnis entweder in Vorwärts- oder Rückwärtsrichtung auf die entgegengesetzte Richtung verzichtet wurde.

Die Sequenzanalyse der Exons 4 und 11a mit auffälligem Muster in der DHPLC-Analyse ergab kein vom Wildtyp abweichendes Ergebnis.

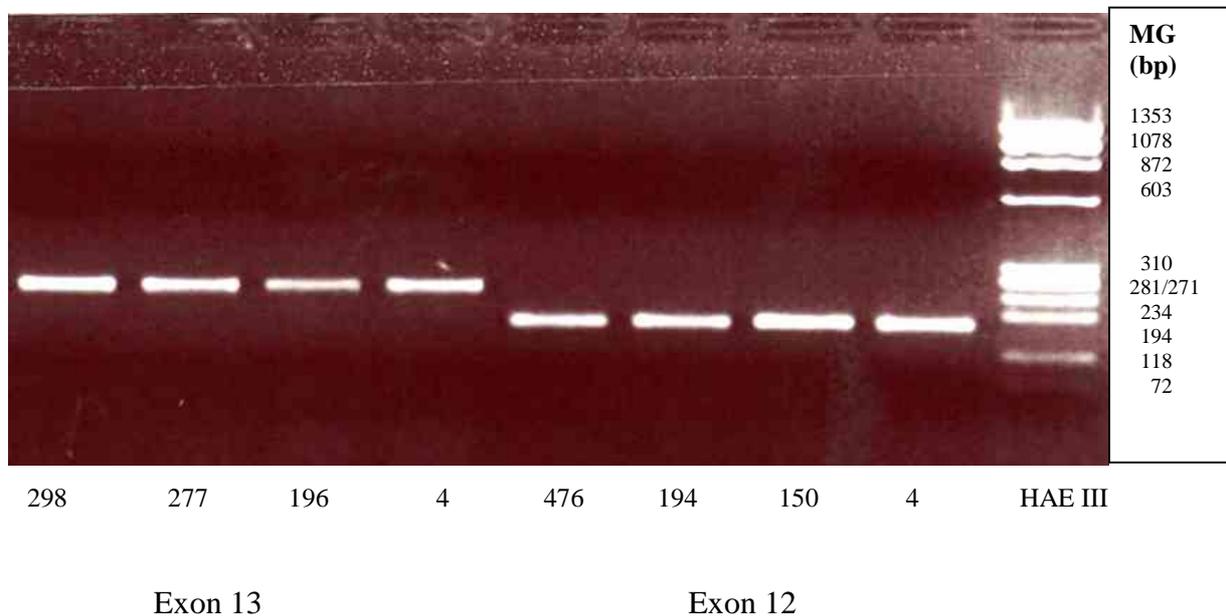
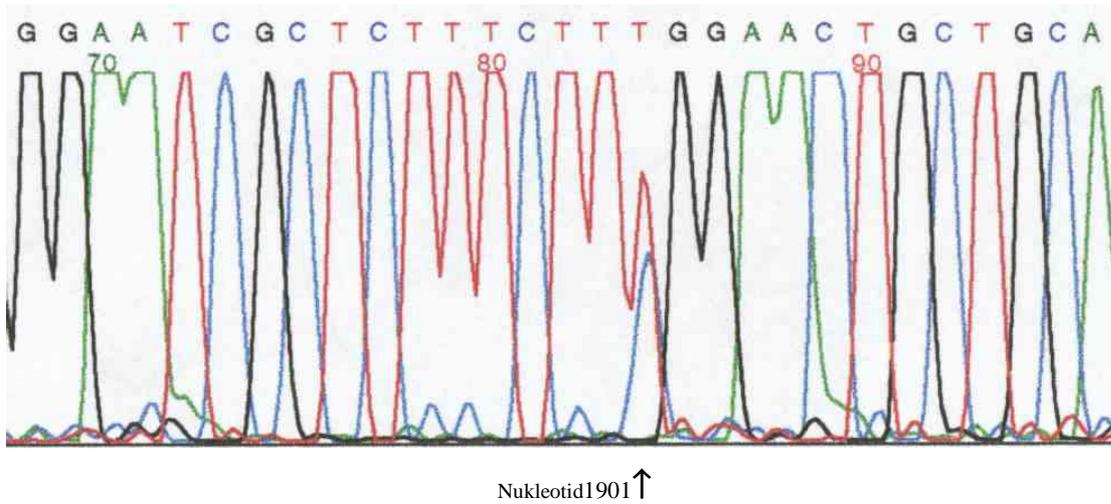


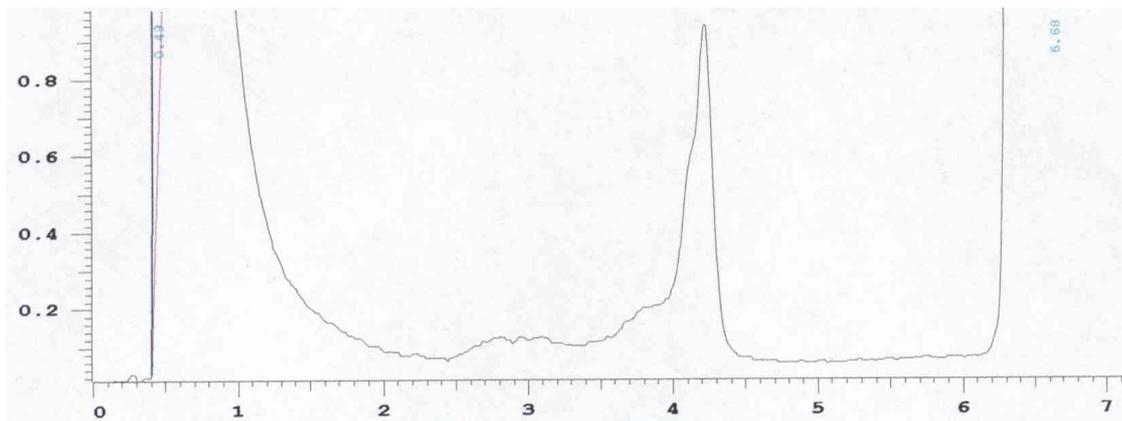
Abbildung10:

Elektrophoretische Überprüfung der Amplifikate nach dem Schritt der Aufreinigung (siehe 4.9) am Beispiel des Exon 12, 13

Abbildung 11:

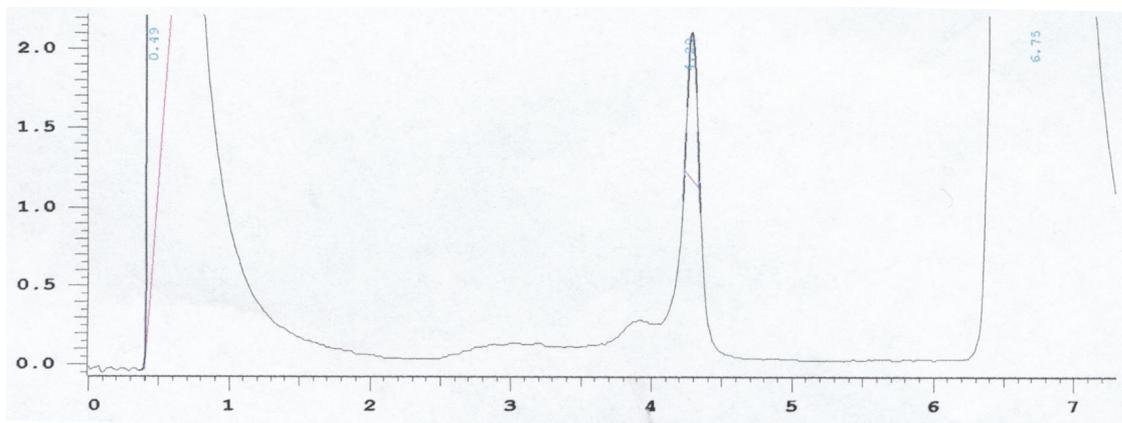


- a.) Ausschnitt aus der Sequenzanalyse des Exons 11c, Probe 707 rückwärts;
Es ist deutlich das Vorliegen des Basenaustauschs T -> C (Vorwärts A -> G) bei
Nukleotid 1901 zu erkennen.



Intensität (mV) Retentionszeit (min)

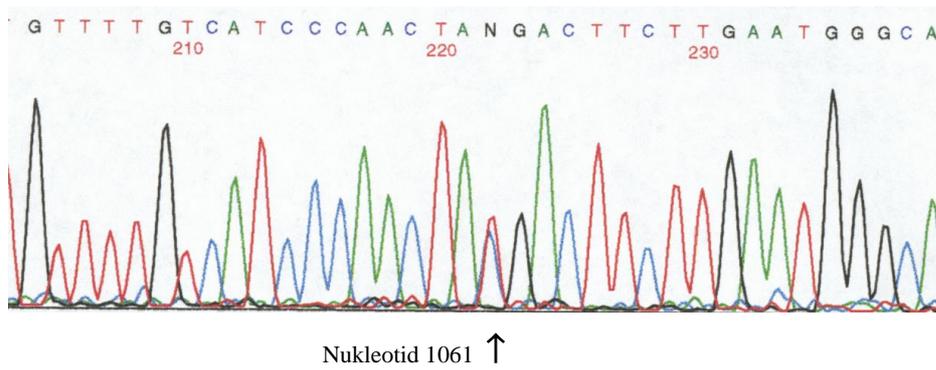
- b.) Auffälliges Muster der DHPLC-Analyse des Exons 11c, Probe 707 bei 58°C



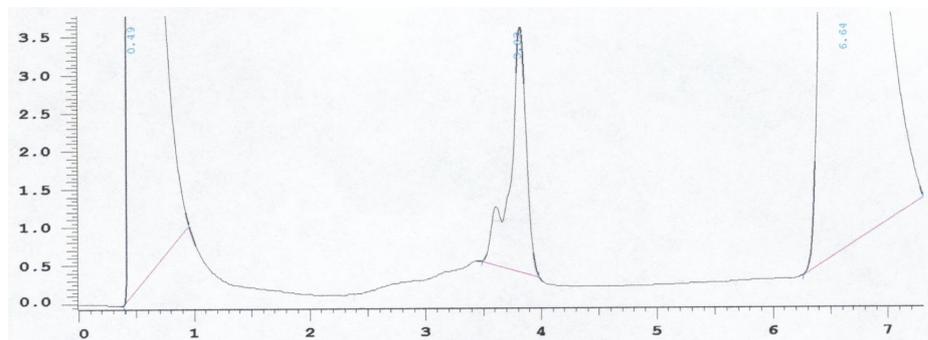
Intensität (mV) Retentionszeit (min)

- c.) unauffälliges DHPLC-Muster des Exons 11c, Probe 522 bei 58°C

Abbildung 12:

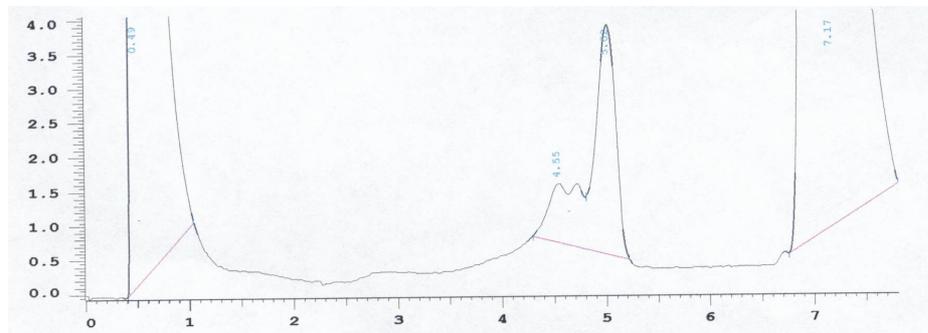


- a.) Ausschnitt aus der Sequenzanalyse des Exons 9 der Probe 683 rückwärts;
Man erkennt bei Nukeotid 1061 den Basenaustausch C → T (entspricht Vorwärts G → A).



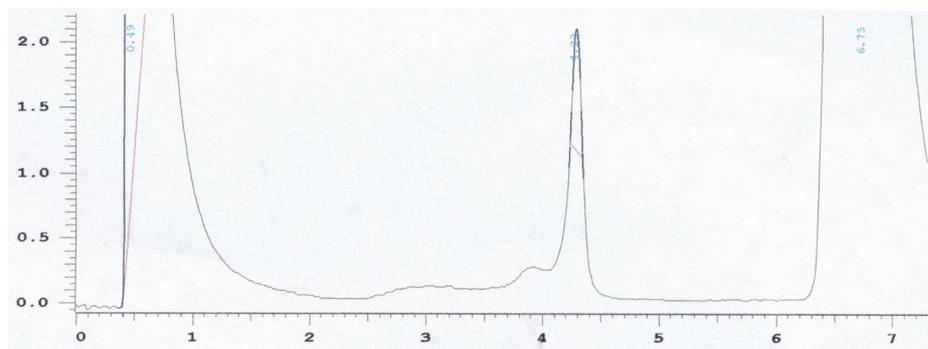
Intensität (mV) Retentionszeit (min)

- b.) Auffälliges Muster der DHPLC-Analyse des Exons 9, Probe 683 bei 57°C



Intensität (mV) Retentionszeit (min)

- c.) Auffälliges Muster der DHPLC-Analyse des Exons 9, Probe 683 bei 59°C



Intensität (mV) Retentionszeit (min)

- d.) Unauffälliges Muster einer Kontrollprobe

Tabelle 13:

Ergebnis der Sequenzierung der auffälligen Proben

Exon	Basenaustausch	Nukleotid	Aminosäure- austausch	Codon	Anzahl der Varianten/getestete Proben (%)
7	A → G	836	Asn → Ser	279	3/48 (6,3)
	G → A	820	Gly → Arg	274	1/48 (2,1)
9	G → A	1061	Arg → His	354	24/48 (50,0)
10	G → A	1372	Val → Met	458	17/48 (35,4)
	C → T	1316	Thr → Met	439	9/48 (17,6)
	G → C	1378	Val → Leu	460	1/48 (2,1)
11b	G → A	1765	Lys → Glu	589	22/48 (45,8)
11c	G → A	2009	Gly → Glu	670	26/48 (54,2)
	C → G	1918	Pro → Ala	640	1/48 (2,1)
	C → T	1918	Pro → Ser	640	1/48 (2,1)
	G → A	1901	Arg → Gln	634	1/48 (2,1)
	C → T	1983	Asp → Asp	661	0/48 (0,0)
12	T → C	2167	Cys → Arg	723	2/48 (4,2)
	T → A	2175	Ser → Ser	725	2/48 (4,2)
13	C → T	2270	Leu → Pro	757	13/48 (27,1)

Aufgrund der Ergebnisse im Exon 11c, welche zum Teil in der Literatur als Keimbahnmutationen beschrieben waren, wurde das Kontrollkollektiv auf die ausgewählten Stellen (Nukleotid 1918 und 1901) untersucht. Hierzu wurde der Primer entsprechend gewählt, so dass das Nukleotid 2009 nicht mehr mitamplifiziert wurde und keine Überlagerung durch die Sequenzvariante dieses Nukleotids im Ergebnis der DHPLC-Analyse verursacht werden konnte.

Nach erneuter Etablierung der Bedingungen für den neuen Primer, wurden die Proben und die Kontrollen der DHPLC-Analyse unterzogen und wiederum die auffälligen Proben sequenziert. Zum Ergebnis siehe Tabelle 13.

Schließlich wurden auch DNA-Proben aus Tumor und Normalgewebe der drei Patienten mit den suspekten Varianten des Exons 11c in die Sequenzanalyse miteinbezogen (siehe auch 5.2.3).

Tabelle 14:

Vergleich der Sequenzergebnisse mit den Literaturangaben

Variante	Betroffene Patienten		Auftreten im Kontrollkollektiv	Kon- %	Referenz
		%			
Asn279Ser	3/48	6,3 4,0		3,6	* 58
Gly274Arg	1/48	2,1 0,5		0,6	* 58
Arg354His	24/48	50,0 40,0		42,0	* 58
Val458Meth	17/48	35,4 17,0		22,0	* 58
Thr439Meth	9/48	17,6 7,5		4,0	* 58
Val460Leu	1/48	2,1 2,2		1,5	* 58
Lys589Glu	22/48	45,8 59,0		59,0	* 58
Gly670Glu	26/48	54,2 39,0		38,0	* 58
Pro640Ala	1/48 7/965	2,1 0,4 0,7	0/96 4/730	0,0 0,6	* 58 19
Pro640Ser	1/48 12/965	2,1 0,4 1,2	4/96 7/728	4,2 0,0 1,0	* 58 19
Arg634Gln	1/48	2,1	1/96	1,0	* 19
Asp661Asp	0/48		1/96 0/72	1,0 0,0	* 19
Cys723Arg	2/48	4,2 2,0		2,3	* 58
Ser725Ser	2/48	4,2 2,0		2,3	* 58
Leu757Pro	13/48	27,1 22,0		16,0	* 58

Referenz:

*) vorliegende Studie

58) Wu Y, 2001:1583 (aufgrund der veröffentlichten Daten können nur Prozentangaben und keine absoluten Zahlen genannt werden)

19) Jagmohan-Changur S, 2003:156

Tabelle 15:

Zusammenfassung der Varianten, welche in der Literatur als Keimbahnmutationen beschrieben waren, bzw. erstmalig in der vorliegenden Studie (*) auftraten.

Patient	Organ	Variante	Literatur
342	Dünndarm	Pro640Ala	Wu Y. 2001:1580-1587
481	Magen	Pro640Ser	Wu Y. 2001:1580-1587
707	Kolon	Arg634Gln	(*)

5.2.3 LOH-Analyse

Um eine mögliche pathogene Bedeutung der Varianten festzustellen, wurde eine LOH-Analyse (Verlust der Heterozygotie) durchgeführt. Dafür wurden die drei, in Bezug auf eine Keimbahnmutation suspekten Proben auch in Tumor- und Normalgewebe einer Sequenzanalyse unterzogen. Verwendet wurde hierfür DNA, welche aus Paraffinschnitten des Tumors und gesundem Gewebe gewonnen worden war.

Der Nachweis, dass ein Allel in der Tumor-DNA verlorengegangen ist und somit in der Sequenz nicht mehr oder nur geringfügig sichtbar ist, wird als LOH bezeichnet.

Tabelle 16:

Ergebnisse der LOH-Untersuchung

Probe	Variante	LOH in Tumor-DNA
342	Pro640Ala	kein Nachweis
481	Pro640Ser	LOH
707	Arg634Gln	kein Nachweis

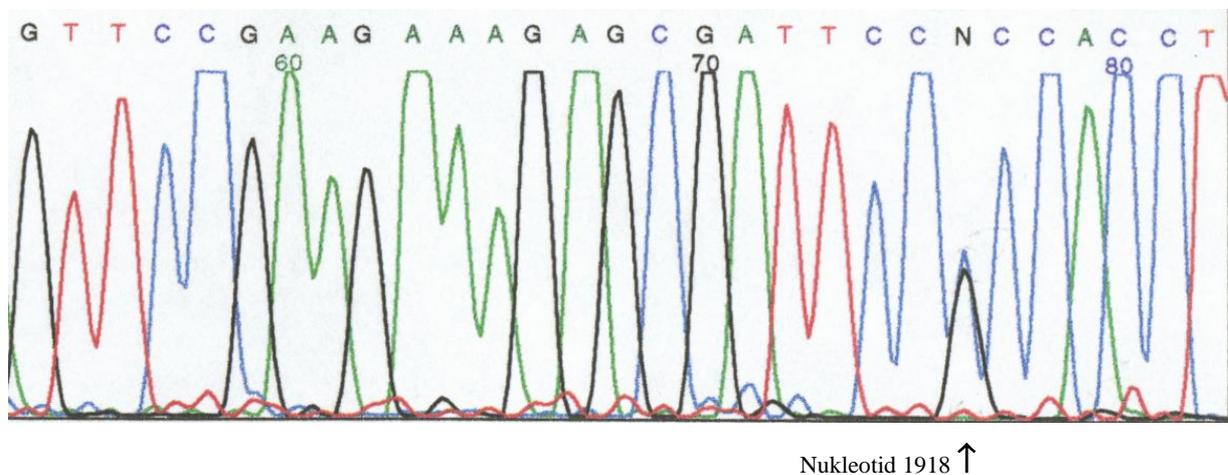


Abbildung 13:

Sequenz der Tumor-DNA des Patienten 342

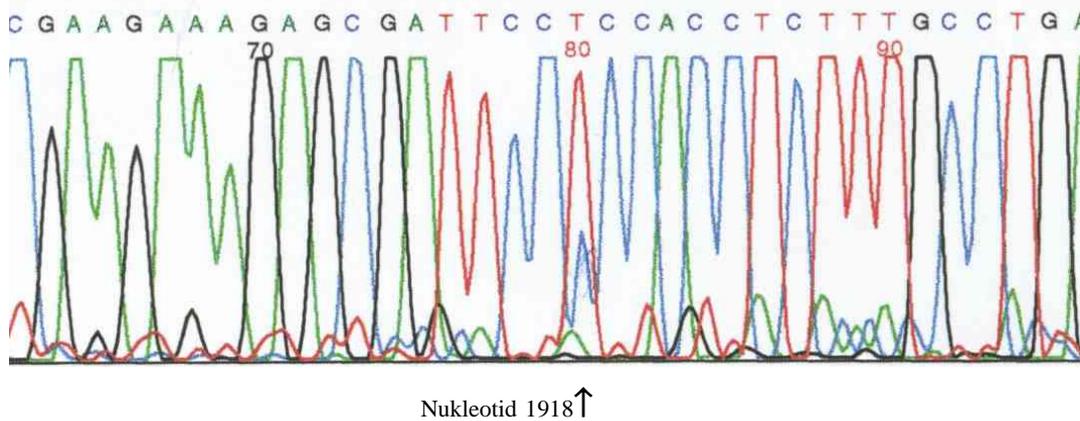
Es zeigt sich eine gleich starke Präsenz der beiden Allele

Aufgrund des positiven Ergebnisses der Tumor-DNA des Patienten 481 wurden weitergehende Sequenzierungen durchgeführt. Diese betrafen erneut aus Blut isolierte DNA, sowie DNA des Magen-Ca und zusätzlich aus dem ebenfalls diagnostizierten Mamma-Ca. Auch wurde im Falle des LOH der Verlust des Wildtypallels überprüft.

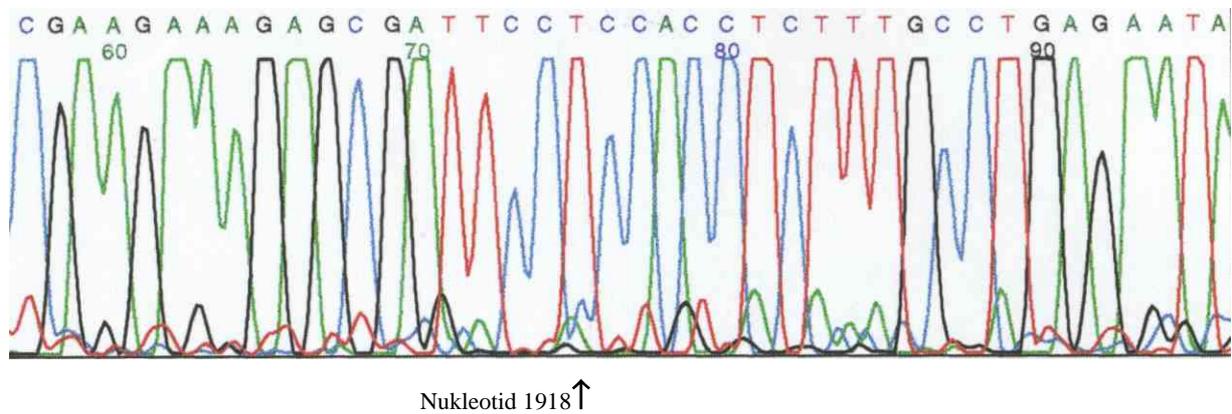
Tabelle 17:
LOH-Untersuchungen des Patienten 481

Magenkarzinom	Mammakarzinom
LOH mit Wildtypverlust	LOH mit Wildtypverlust

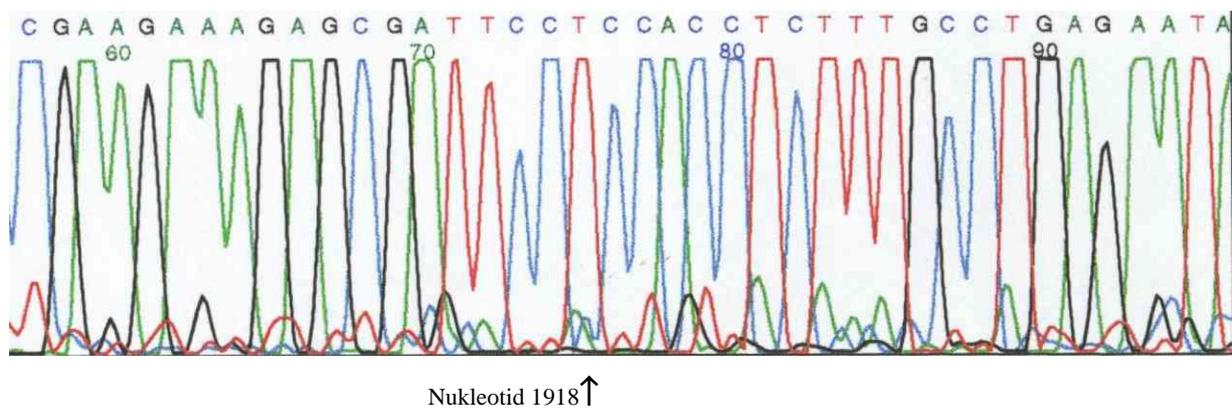
Abbildung 14: Patientin 481



a.) Sequenz der genomischen DNA aus Blut ohne LOH und mit Wildtypallel und Variantenallel



b.) Sequenz der Magen-Ca DNA mit LOH und Wildtypverlust



c.) Sequenz der Mamma-Ca DNA mit LOH und Wildtypverlust

6. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden 48 Patienten mit auffälliger Familienanamnese einer Keimbahnmutationsanalyse im Bereich des Exonuklease 1 Gens unterzogen. Es handelte sich dabei um 21 Patienten mit diagnostiziertem Magenkarzinom, 22 Patienten mit kolorektalem Karzinom und weitere 5 Patienten mit HNPCC-assoziierten Karzinomen. Die Untersuchung geschah im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Exo1 Gen und dem erblichen nicht-polypösen kolorektalen Karzinom.

Die Mutationsdetektion wurde mit der DHPLC-Methode durchgeführt, deren Bedeutung hier ebenfalls diskutiert werden soll.

6.1 Etablierung der Analysenbedingungen und Vergleich mit den durch die Software berechneten Bedingungen

Die Methode der denaturierenden Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (DHPLC) ist eine zunehmend genutzte Möglichkeit, größere Mengen an Proben effizient mit relativ geringem Aufwand auf Mutationen bzw. Varianten zu testen. Alternativ stehen als Methoden SSCP (single-strand conformation analysis), direktes Sequenzieren PTT (protein truncation test) und DGGE (denaturierende Gelelektrophorese) zur Verfügung. Nachteilig sind bei den zuletzt genannten jedoch immer entweder eine geringe Sensitivität oder bei hoher Sensitivität ein enormer Arbeitsaufwand, hohe Kosten und lange Analysendauer.

Bisher war die Anwendung der DHPLC-Methode u.a. für Gene beschrieben worden, die insbesondere im Rahmen humangenetischer Diagnostik eine Rolle spielen, wie zB. hMLH1 und hMSH2 (Holinski-Feder E., 2001:21-32; Wagner T., 1999:369-376), jedoch nicht im Sequenzbereich des Exonuklease-1 Gens. Aus diesem Grund mussten die Bedingungen zur Probenanalyse für die vorliegende Studie erst etabliert werden.

Das System der DHPLC arbeitet hochautomatisiert und die Computersoftware ist in der Lage, aufgrund der Sequenz der zu analysierenden Amplifikate die geeigneten Analysenbedingungen zu berechnen. In der vorliegenden Untersuchung wurden dennoch, zum Vergleich mit den Berechnungen der Computersoftware, zusätzlich die Analysenbedingungen für die jeweiligen Exons selbstständig etabliert. Bei großer Zuverlässigkeit des Systems und

Treffsicherheit in Bezug auf die zu screenenden Varianten wäre so in Zukunft eine Etablierung entbehrlich und es könnte, ohne Verlust der Validität und Reliabilität, ein großer Teil des Arbeitsaufwands eingespart werden. Dies wäre, verbunden mit der hohen Geschwindigkeit, mit der die DHPLC Methode (ca. 7 min pro Probe) eine große Anzahl an Proben bearbeiten kann, besonders für den routinemäßigen Einsatz in der Klinik von Vorteil. Wesentlich für die vorliegende Studie war somit die Überprüfung der zuverlässig möglichen Anwendung der berechneten Bedingungen der Wavemakersoftware, das heißt ob unter diesen Bedingungen die Proben ebenfalls auffällige Muster gezeigt hätten und so einer Sequenzanalyse zugeführt worden wären.

In der vorliegenden Studie fällt eine große Übereinstimmung der ermittelten Bedingungen und der Bedingungen der Computersoftware auf, wie aus Tabelle 8 und 10 unter 5.1.2 ersichtlich wird. Abhängig von den Schmelzdomänen der einzelnen Exons wurden oft mehrere Analysentemperaturen berechnet, während die Berechnung entsprechend dem Algorithmus des Wavemakersystems prinzipiell eine einzige Temperatur vorgab. Die Wahl der Schmelztemperaturen ist insofern von großer Bedeutung, als viele Sequenzvarianten nur bei einer spezifischen Temperatur zu messen sind.

Bei Exon 7, 9, 10, 11b und 13 wurde grundsätzlich in Übereinstimmung mit der entsprechend dem Algorithmus des Wavemakercomputers errechneten Temperatur analysiert, bzw. war diese Temperatur eine von zwei oder drei Analysentemperaturen. Dabei waren die abweichenden Muster der Elutionschromatogramme in den meisten Fällen unter den durch die Software ermittelten Temperaturen auffällig. Verlässlich war die Temperaturangabe für Exon 13, hier wäre die vorgeschlagene Temperatur des Wavemakers von 57°C völlig ausreichend zur Detektion der Varianten gewesen. Ebenso verhält es sich mit Exon 9 und den empfohlenen 57°C und Exon 11b. Im Falle von Exon 7 jedoch wäre unter alleiniger Verwendung der empfohlenen Analysenbedingungen eines von zwei auffälligen Muster unerkant geblieben und damit eine von zwei vorhandenen DNA-Sequenzvarianten.

Die Polymorphismen des Exon 12 wiederum waren sowohl bei den software-ermittelten als auch selbst berechneten Bedingungen aufgefallen.

In der Auswertung der Elutionschromatogramme des Exon 11c fielen deutlich auffällige Muster bei den vergleichsweise errechneten Bedingungen auf und führten somit u.a. zur Detektion der wichtigen Varianten Pro640Ser und Pro640Ala. Bei Anwendung der anhand des Algorithmus des Wavemakercomputers ermittelten Temperaturen war jedoch nur schwer eine Abweichung der Chromatogramme dieser Proben nachzuvollziehen. Ohne das bereits

vorhandene Wissen um Varianten dieser Proben wären diese mit großer Wahrscheinlichkeit bei alleiniger Analyse unter den Software-ermittelten Bedingungen nicht erkannt worden.

Trotz deutlicher Auffälligkeiten im Muster der Elutionschromatogramme, konnten bei den Exon 4 und 11b in der Sequenzierung keine Varianten entdeckt werden.

Bei Exon 10 schließlich konnten durch eine zusätzlich etablierte Temperatur die drei vorhandenen Polymorphismen bereits anhand der DHPLC-Ergebnisse voneinander unterschieden werden, während sie unter den Bedingungen entsprechend dem Algorithmus der Software zwar auffielen, aber ausschließlich das gleiche Muster zeigten.

Zusammenfassend sind also 14 von 15 Varianten (93,3 %) unter den Analysenbedingungen, die anhand des Algorithmus der Wavemakersoftware ermittelt wurden, auffällig gewesen und so einer Sequenzanalyse zugeführt worden.

In einigen Fällen waren die Ergebnisse der DHPLC-Analyse stark auffällig, wie durch das Auftreten von Doppelpeaks im Chromatogramm. Bei anderen Polymorphismen waren die Abweichungen im Vergleich zu den Kontrollproben jedoch minimal und erforderten eine genaue Interpretation und auch Erfahrung. In jedem Fall war jedoch eine Reproduzierbarkeit der Muster vorhanden. Zwischen dem Erscheinungsbild des Musters und der eventuellen Bedeutung der dazugehörenden Variante konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

In der Literatur finden sich Studien, die sich mit derselben Fragestellung befassen, wie die von J.G.Rudolph (Rudolph J.G., 2002:169-176), in der neben zwei anderen Programmen auch die Wavemaker-Computersoftware eingesetzt wurde. Es wurden hierbei 53 verschiedene PCR-Produkte verschiedener Länge von 25 verschiedenen Genen sowohl einer experimentellen Festlegung der Analysenbedingungen als auch einer Berechnung durch die verschiedenen Computersoftware unterzogen. Die Ergebnisse der Wavemakersoftware zeigten in 94% eine Übereinstimmung innerhalb von 1°C Abweichung mit den experimentell ermittelten Schmelztemperaturen. Dies ist somit ein vergleichbares Ergebnis zu den Resultaten der vorliegenden Studie, bei der 10/15 (66,7 %) Exons in der Temperatur übereinstimmten und die restlichen fünf Exons innerhalb von 1°C Abweichung angegeben wurden.

Als Kontrollen wurden prinzipiell auch Proben einer Sequenzanalyse unterzogen, welche in der DHPLC-Analyse unauffällig gewesen waren. In keinem dieser Fälle wurde eine Sequenzvariante entdeckt, was auch auf eine hohe Sensitivität der Methode hinweist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Ausnahme der Polymorphismen der Exons 7 und 11c, mit den anhand der Computersoftware errechneten Bedingungen und der DHPLC-Methode alle Varianten detektierbar waren. Auch waren die einzelnen Polymorphismen aufgrund ihrer unterschiedlichen Muster beim Verwenden von mehr als einer Temperatur im DHPLC-Ergebnis in mehreren Fällen voneinander unterscheidbar.

Es zeigt sich eine hohe Zuverlässigkeit der Berechnungen entsprechend dem Algorithmus der Wavemakersoftware, die ausreichend erscheint um Auffälligkeiten zu erkennen. Dennoch empfiehlt es sich, aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie, zusätzlich eine Interpretation des Schmelzverhaltens des DNA-Fragments in die endgültige Wahl der Analysenbedingungen miteinzubeziehen. Aus den Berechnungen der Software zum Schmelzverhalten unter unterschiedlichen Temperaturen und der daraus erstellten Schmelzkurve sind unterschiedliche Schmelzdomänen ersichtlich. So ist es angezeigt, zusätzlich zur vorgeschlagenen Temperatur der Software bei einer oder auch zwei weiteren Temperaturen, bei der ca. 75-90 % der DNA-Fragmente dieses Bereichs aufgeschmolzen werden, zu analysieren.

Bei einer Analyse unter optimalen Bedingungen zeigten sich in der vorliegenden Studie zuverlässige Ergebnisse und es war sogar eine Identifizierung der einzelnen Varianten anhand ihrer Muster im DHPLC-Ergebnis möglich. Am eindrucksvollsten zeigt dies Exon 11c mit unterschiedlichen Mustern für Kontrollen und DNA-Sequenzvarianten. In diesem Fall lässt das Ergebnis der DHPLC-Analyse auf die Art und Lokalisation des bereits bekannten Polymorphismus schließen. Voraussetzung dafür ist natürlich die bereits erfolgte Identifizierung des Polymorphismus und seine Zuordnung zu einem bestimmten DHPLC-Muster.

In der vorliegenden Studie zeigten sich 9 Exons mit auffälligen Peaks, von denen dann in der anschließenden Sequenzanalyse sieben (77,8 %) tatsächlich Varianten aufwiesen.

Der Vergleich mit der Literatur bestätigt ebenfalls die positiven Resultate in Bezug auf die effiziente und zuverlässige Anwendbarkeit dieser Methode und auch Interpretation der erhaltenen Ergebnisse.

So wurde die DHPLC-Methode in einer weiteren Studie an insgesamt 61 DNA-Proben von mutmaßlichen HNPCC-Patienten angewandt. Hierbei stellten sich 80 % der auffälligen Peaks in der anschließenden Sequenzanalyse als tatsächliche Sequenzvarianten heraus (Young J., 2002:529-533).

Eine Sensitivität von 97 % bei der Detektion von MLH1- und MSH2-Mutationen konnte Holinski-Feder durch die DHPLC-Analyse von bereits sequenzierten Proben zeigen (Holinski-Feder E., 2001:21-32) und in der Studie von Takashima waren sogar alle zu untersuchenden Mutationen der Charcot-Marie-Tooth Krankheit in der DHPLC-Analyse auffällig und darüber hinaus wurden noch zwei zusätzliche Varianten entdeckt (Takashima H., 2001:335-342).

Diese Resultate machen gemeinsam mit den denen der vorliegenden Studie eine häufigere und breit gefächerte Anwendung der DHPLC-Methode sinnvoll, da sich deutlich die sichere und zuverlässige Anwendbarkeit gezeigt hat.

Als schnelle und sehr sensitive Methode ist die DHPLC-Analyse in Zukunft eine Methode der Wahl bei der Detektion von Mutationen. Sie besitzt im Vergleich zu anderen Methoden der Mutationsanalyse, wie SSCP, direkte Sequenzierung, DGGE u.a. den Vorteil der schnellen und einfachen Durchführung und der dennoch hohen Sensitivität.

6.2 Analysenergebnisse

Das HNPCC-Syndrom ist ein autosomal dominant vererbbares Tumorprädispositionssyndrom, mit kolorektalen Karzinomen als charakteristische Tumorentität. Bei einer Großzahl von HNPCC-Familien konnten Keimbahnmutationen im Bereich der Mismatch-Reparatur-Gene, insbesondere MSH2 und MLH1, gezeigt werden (Peltomäki P., 1997:1146-1158). Da aber nicht alle Fälle Mutationen in den bekannten MMR-Genen aufweisen, kann vermutet werden, dass weitere Genloci in die Genese eines HNPCC involviert sind. Ein möglicher Kandidat ist hierbei das Exonuklease-1 Gen, welches in der vorliegenden Studie untersucht wurde.

Nach der Entdeckung einer Exonuklease-1 im Hefesystem, bei *Drosophila melanogaster* und *Saccharomyces cerevisiae* (Tishkoff D.X., 1997:7487-7492), konnte diese schließlich auch als humanes Mitglied der RAD2 Nukleasenfamilie identifiziert werden (Wilson D.M., 1998:3762-3768). Es wurde hierbei die gleiche 5´-3´Exonukleasenaktivität wie im Hefesystem nachgewiesen und es gelang eine Aufschlüsselung der Gensequenz mit Darstellung der 14 Exons. Die direkte Interaktion der Exonuklease-1 mit den Mismatch-Repair-Proteinen MSH2, MSH3 und MLH1 (Schmutte C., 2001:33011-33018) und ihre mögliche Rolle in der Mismatch-Reparatur durch Exzision und Komplexstabilisierung (Tishkoff D.X., 1997:7491; Lee B., 2002:942-949; Amin N.S., 2001:5142-5155) weist erneut auf einen Zusammenhang mit dem HNPCC-Syndrom hin.

Bestätigt wurde diese Vermutung u.a. durch die Studie von Wu (Wu Y., 2001:1580), in der 258 Patienten mit HNPCC oder Verdacht auf HNPCC auf Mutationen im Bereich des Exonuklease-1 Gens getestet wurden. Es ergaben sich hierbei in 14 Fällen Keimbahnvarianten des EXO-1 Gens, welche im Kontrollkollektiv nicht erschienen.

In der hier vorliegenden Studie wurde bei 48 HNPCC-verdächtigen Patienten ohne Mutationen der MMR-Gene, eine Keimbahnmutationsanalyse im Bereich des Exonuklease-1 Gens durchgeführt.

Dabei waren keine Keimbahnmutationen wie Deletionen oder Insertionen, jedoch verschiedene Missense Varianten auffällig (siehe 5.2.2, Tabelle 11). Im Fall von Exon 7, 9, 10, 11b, 12, 13 und 11c (Codon 670) bestätigt dieses Ergebnis die Literaturdaten (Wu Y., 2001:1583), welche mit ähnlicher Häufigkeit diesselben Varianten sowohl im Patientengut als

auch im Kontrollkollektiv beschreiben (siehe 5.2.2, Tabelle 12). Somit bestätigen sich diese Varianten als Polymorphismen.

In der Studie von Wu werden 9 weitere Varianten als Keimbahnmutationen interpretiert. Dies betrifft unter anderem Exon 11c, Nukleotid 1918 mit 2 verschiedenen Basenaustauschvarianten (Pro640Ser und Pro640Ala), welche je einmal auftraten. In der hier vorliegenden Studie traten diese beiden Varianten ebenfalls mit je 1/48 auf und wurden nun weiter untersucht.

Sechs weitere Varianten in den Exons 2, 3, 4, 9, 11 und 13, die Wu als Keimbahnmutationen interpretierte, waren wiederum in den hier vorliegenden Analyseergebnissen nicht auffällig geworden.

Zur Feststellung der Pathogenität von Missensemutationen sind prinzipiell verschiedene Kriterien nötig. So sollte die Variante nicht in gesunden Individuen (Kontrollkollektiv) nachweisbar sein, es sollten funktionelle Analysen durchgeführt werden, ein Verlust des Wildtypallels im Tumor sollte nachweisbar sein und die Variante sollte bei den von der Erkrankung betroffenen Familienmitgliedern auftreten.

In der hier vorliegenden Studie wurde zur Kontrolle dieser Kriterien ein Kollektiv von 96 nicht erkrankten Personen (siehe 4.4, Tabelle 2) im Exon 11c auf Mutationen untersucht. Dabei fand sich bei vier Kontrollen erneut die Variante Pro640Ser. Außerdem traten zwei neue Varianten im Exon 11c, Arg634Gln und Asp661Asp, auf.

Mit einer Häufigkeit von 4/96 im Kontrollkollektiv und 1/48 im Patientengut ist nun eine aussagekräftige Bedeutung der Variante Pro640Ser eindeutig in Frage zu stellen.

Bestätigt wird dies durch eine großangelegte Studie, die zeitgleich mit der hier vorliegenden Untersuchung stattfand. Hierbei trat die Variante Pro640Ser in einem Kontrollkollektiv von 728 Proben aus 4 verschiedenen europäischen Ländern 7mal auf (Jagmohan-Changur S., 2003:156).

Die Variante Pro640Ala konnte zwar in unseren Kontrollen nicht nachgewiesen werden, war jedoch bei Jagmohan-Changur mit 4/730 Kontrollen vertreten. Im Gegensatz dazu ist die Variante Asp661Asp mit 1 % bei unseren Kontrollen, nicht jedoch in Jagmohans Kontrollen nachweisbar.

Die Studie Jagmohans erscheint aufgrund des großen Kollektivs, das aus den Niederlanden, Norwegen, Finnland, Großbritannien und Dänemark rekrutiert wurde, von starker Aussagekraft zu sein. Zwar ist dadurch nur die westeuropäische Bevölkerung repräsentiert, in der Studie von Wu et al. ist jedoch das Kontrollkollektiv holländisch und somit vergleichbar.

Auch die Methoden zur Mutationsdetektion sind in der Studie von Jagmohan vielfältig, es wurde Sequenzierung, SSCP, Restriktions-Analyse, DGGE, CSGE und wie in der vorliegenden Studie die DHPLC-Methode angewand.

Ein vergleichbares Ergebnis brachte eine weitere Studie, in der durch Inaktivierung der Exonuklease-1 bei Mäusen die daraus folgende evtl. erhöhte Tumorwahrscheinlichkeit untersucht wurde (Wei K., 2003:603-614). Es konnte dabei keine signifikant erhöhte Karzinomentstehung bei Mäusen mit Exo1-Mutationen im Vergleich zum Kontrollkollektiv (gleiche Inzidenz der gastrointestinalen Adenome) nachgewiesen werden. Sowohl Wei als auch Jagmohan vermuten in humanen Exonuklease-1 Mutationen nur einen seltenen Grund für das Auftreten von HNPCC.

Aufgrund der deutlichen Auffälligkeit und der Übereinstimmung mit den Literaturdaten wurde in der hier vorliegenden Studie eine LOH-Untersuchung der Varianten Pro640Ala, Pro640Ser und Arg634Gln durchgeführt. Es wurde dabei die DNA-Sequenz der Tumor-DNA und der Blut-DNA am betroffenen Nukleotid verglichen. Bei Patientin 481 mit der Variante Pro640Ser zeigte sich hierbei ein LOH im Tumorgewebe.

Diese Patientin weist neben einem diffusen Magenkarzinom des Antrums/Korpus, welches wie schon beschrieben untersucht worden war, die Diagnose eines Mammakarzinoms und Urothelkarzinoms auf. Die Diagnose des Urothelkarzinoms wurde im Alter von 66 Jahren, die des Mammakarzinoms im Alter von 72 Jahren und die des Magenkarzinoms im Alter von 74 Jahren gestellt. Es treffen die Magenkriterien M5, M7 und M11 zu, das heißt, dass mindestens zwei erstgradige Verwandte ebenfalls an einem Magen-Ca oder einem HNPCC-assoziierten Tumor erkrankt sind und drei Familienmitglieder ohne Altersbegrenzung an einem Magen-Ca erkrankt sind.

Diese eindrucksvollen anamnestischen Daten weisen auf eine erbliche Komponente hin. Die LOH-Untersuchung der DNA des Magenkarzinomgewebes und des Mammakarzinomgewebes zeigte ein positives Ergebnis (siehe auch 5.2.3; Abbildung 14a, b, c). In beiden Tumoren war jeweils ein Wildtypverlust festzustellen, das heißt, es war nur noch das mutierte Allel in der Sequenz vorhanden.

Auch wurden mittlerweile funktionelle Analysen durchgeführt und dabei funktionelle Alterationen der Exonuklease-1 beschrieben, welche einen weiteren Hinweis für den Zusammenhang mit HNPCC-assoziierten Tumoren darstellen könnten. Sie betreffen auch die Varianten Pro640Ala und Pro640Ser (Nukleotid 1918), die am COOH-Ende und innerhalb der Interaktionsregion mit den MMR-Proteinen, speziell von MSH2 lokalisiert sind (siehe 2.4,

Abb.2). Diese Interaktionen führen evtl. zur Positionierung des Exo1 in der späteren mismatch Exzision (Sun X., 2002:6026-6030).

Für eine Pathogenität der Varianten in Sun's Studie sprechen die Lokalisation an der kritischen Region für Nukleasenaktivität oder Interaktion mit MSH2 oder MLH1 und das Fehlen von MSH2 und MLH1 Keimbahnmutationen in den betroffenen Patientenproben. Von einem fehlenden Vorkommen in der gesunden Bevölkerung ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie und den neuesten Literaturdaten nicht mehr auszugehen. Die Varianten Pro640Ala und Pro640Ser waren je einmal im Patientengut der hier vorliegenden Studie aufgetreten.

Es konnte desweiteren ein deutlicher Rückgang der Interaktionen mit MSH2 Proteinen bei einem Vorliegen der Pro640Ser Variante nachgewiesen werden, nicht jedoch bei einem Vorliegen der Pro640Ala Variante. Dies ist vermutlich auf den Austausch einer nicht-polaren Aminosäure mit einer polaren Aminosäure im Falle der Variante Pro640Ser zurückzuführen (Sun X., 2002:6029). Auch wird die Möglichkeit einer Destabilisierung des MMR-Komplexes bei gleichzeitigen Aminosäureaustauschen an den angesprochenen Stellen geschlussfolgert (Sun X., 2002:6030).

Diese Ergebnisse, insbesondere der vorliegende Wildtypverlust im Tumor, zusammen mit auffälliger Familienanamnese und nachgewiesener funktioneller Bedeutung, lassen trotz des Auftretens im Kontrollkollektiv der vorliegenden Studie und im Kontrollkollektiv der Literatur (Jagmohan-Changur S., 2003:156) eine weitergehende Bedeutung der Variante Pro640Ser vermuten. Vorstellbar wäre dabei eine mögliche Koinzidenz mit einer weiteren Variante, die dann schließlich die pathogene Wirkung auslöst.

Wichtiger Ansatzpunkt weiterer Untersuchungen ist hier sicherlich die Interaktion der Exonuklease-1 mit den Mismatch-Repair-Genen, die, als Resultat von Mutationen, mögliche Instabilitäten auslösen kann. Dieser Zusammenhang liegt nahe, da bereits die Verbindung zwischen dem HNPCC-Syndrom und mehreren MMR-Genen, insbesondere MSH2 und MLH1 hergestellt werden konnte.

In jedem Fall sind hier noch weitere Untersuchungen auch in Hinsicht auf die funktionelle Bedeutung der verschiedenen Mutationen sinnvoll.

Zusammenfassend ist es aufgrund der vorliegenden Daten eher unwahrscheinlich, dass das Exonuklease-1 Gen eine wesentliche Rolle in der Genese des HNPCC-Syndroms spielt. Als Kofaktor oder auch im Rahmen von Karzinomen ausserhalb des HNPCC-Syndroms lässt es sich jedoch noch nicht völlig ausschließen.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde eine mögliche Bedeutung des Exonuklease-1 Gens für die genetische Prädisposition von familiär auftretenden Magen- und Kolonkarzinomen in Assoziation mit dem HNPCC-Syndrom untersucht. Hierzu wurden 48 Patienten mit Magen-, Kolon- oder HNPCC-assoziierten Karzinomen, auffälliger Familienanamnese im Sinne der Bethesda-Kriterien (siehe 2.2.2) und ohne Mutationen in den Mismatch-Repair-Genen bzw. ohne hochgradige MSI im Tumor, einer Mutationsdetektion durch die DHPLC-Methode unterzogen. Die Bedeutung dieser Methode wurde ebenfalls ausgewertet.

Es konnten verschiedene Polymorphismen und zwei Varianten (Pro640Ala und Pro640Ser), welche bereits als Keimbahnmutationen im Zusammenhang mit dem HNPCC-Syndrom beschrieben worden waren (Wu Y., 2001:1582), festgestellt werden. Die Variante Pro640Ser trat jedoch auch mit 4/96 im vorliegenden Kontrollkollektiv auf und in einer zeitgleich stattfindenden Untersuchung von Jagmohan-Changur (Jagmohan-Changur S., 2003:156) konnte die Variante Pro640Ala ebenfalls im Kontrollkollektiv nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint eine pathogene Bedeutung der Varianten fraglich, sie kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, insbesondere bei Variante Pro640Ser. Die betroffene Patientin erfüllt mehrere Kriterien, die auf eine pathogene Bedeutung hinweisen. So zeigte sich bei der LOH-Untersuchung ein Wildtypverlust im Tumorgewebe, die anamnestischen Daten weisen auf eine erbliche Komponente hin und der Variante Pro640Ser wird nach neuesten Erkenntnissen eine funktionelle Bedeutung zugeschrieben (Sun X., 2002:6026-6030). Somit scheinen weitere Untersuchungen sinnvoll. Die Bedeutung des Exonuklease-1 Gens im Zusammenhang mit HNPCC ist aufgrund der Ergebnisse dieser Studie nicht vorrangig, vorstellbar wäre jedoch eine Koinzidenz mit einer weiteren Variante, die dann die pathogene Wirkung auslöst.

Bei der Anwendung der DHPLC-Methode erwies sich diese als schnelle und sehr sensitive Methode der Mutationsdetektion. Es konnten in der vorliegenden Studie 14 von 15 DNA-Varianten allein mit den von der Computersoftware vorgeschlagenen DHPLC-Bedingungen ermittelt werden. Dabei waren zusätzlich in einigen Fällen durch unterschiedliche Muster in den Elutionschromatogrammen, die einzelnen Varianten voneinander unterscheidbar. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist eine zusätzliche Interpretation des Schmelzverhaltens des zu untersuchenden DNA-Fragments anhand der von der

Computersoftware erstellten Schmelzkurve zu empfehlen. Damit und bei Auswertung der Chromatogramme durch erfahrenes Personal, scheint diese Methode in Zukunft eine wichtige Rolle beim Mutationsscreening von größeren Mengen an DNA-Material in kurzer Zeit und mit geringem Arbeitsaufwand zu spielen.

8. Literaturverzeichnis

- 1) *Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M*, Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994; 54:1645-1648
- 2) *Aarnio M.*, Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Int. Journal of Cancer* 1997; 74:551-555
- 3) *Alam NA, Gorman P, Jaeger EEM, Kelsell D, Leigh IM, Ratnavel R, Murdoch ME, Houlston RS, Aaltonen LA, Roylance RR, Tomlinson IPM*, Germline deletions of Exo 1 do not cause colorectal tumors and lesions which are null for Exo 1 do not have microsatellite instability. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2003; 147:121-127
- 4) *Albano WA, Recabaren JA, Lynch HT, Campell AS, Mailliard JA, Organ CA, Lynch JF, Kimberling WJ*, Natural history of hereditary cancer of the breast and colon. *Cancer* 1982; 50:360-363
- 5) *Al-Taie O, Mörk H, Seufert J, Treis H, Jakob F, Scheurlen M*, Hereditäres Non-Polyposis kolorektales Karzinom. *Medizinische Klinik* 2001; 96(9):529-538
- 6) *Amin NS, Nguyen M-N, Oh S, Kolodner RD*, Exo 1 dependent mutator mutations: model system for studying functional interactions in mismatch repair. *Mol. Biol. Cell.* 2001;21(15):5142-5155
- 7) *Argueso JL, Smith D, Yi J, Waase M, Sarin S, Alani E*, Analysis of conditional mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MLH 1 gene in mismatch repair and in meiotic crossing over. *Genetics* 2002; 160(3):909-921
- 8) *Becker N*, Epidemiologie bösartiger Erkrankungen. In *Onkologische Chirurgie, Siewert JR*, Kapitel 5, Springer Verlag 2001:49-63
- 9) *Bevan S. und R.S.Houlston*, Genetic predisposition to gastric cancer. *Q J Med* 1999; 92:5-10
- 10) *Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S*, A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Research* 1998; 58:5248-5257
- 11) *Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A*, Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature* 1994; 368:258-261
- 12) *Charbonnier F, Olschwang S, Wang Q, Boisson C, Martin C, Buisine M-P, Puisieux A, Frebourg T*, MSH2 in contrast to MLH1 and MSH6 is frequently inactivated by exonic and promoter rearrangements in HNPCC. *Cancer Res* 2002; 62:848-853
- 13) *Dürig M*, Kolon und Rektum. In: "Duale Reihe Chirurgie", *Henne-Bruns D., Dürig M., Kremer B.*, Thieme 2001; 391-431
- 14) *Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R*, The human mutator gene homologue MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell.* 1993; 75:1027-1038
- 15) *Friedberg EC*, How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2001; 1:22-33
- 16) *Gayther SA, Goringe KL, Ramus SJ, Huntsman D, Roviello F, Grehan N, Machado JC, Pinto E, Seruca R, Halling K, MacLeod P, Powell SM, Jackson CE, Ponder BAJ, Caldas C*, Identification of germline E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res* 1998; 58:4086-4089

- 17) *Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE*, E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998; 392:402-405
- 18) *Herold G.*, Gastroenterologie. In: "Innere Medizin". Gerd Herold und Mitarbeiter 2002:352-500
- 19) *Holinski-Feder E, Müller-Koch Y, Friedl W, Moeslein G, Keller G, Plaschke J, Ballhausen W, Gross M, Baldwin-Jedele K, Jungck M, Mangold E, Vogelsang H, Schackert H-K, Lohse P, Murken J, Meitingner T*, DHPLC mutation analysis of the hereditary nonpolyposis colon cancer genes hMLH1 and hMSH2. *J.Biochem.Biophys.Methods* 2001; 47:21-32
- 20) *Huang SC, Lavine JE, Boland PS, Newbury RO, Kolodner R, Pham T-TT, Arnold CN, Boland CR, Carethers J*, Germline characterisation of early-aged onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Journal of Pediatrics* 2001; 138(5):629-635
- 21) *Jagmohan-Changur S, Poikonen T, Vilkki S, Launonen V, Wikman F, Orntoft TF, Moller P, Vasen H, Tops C, Kolodner RD, Mecklin JP, Järvinen H, Bevan S, Houlston RS, Aaltonen LA, Fodde R, Wijnen J, Karhu A*, Exo1 variants occur commonly in normal population: Evidence against a role in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 2003; 63:154-158
- 22) *Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, Lane MR, Lanspa SJ, Lynch HT*, Pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Anticancer Res* 1994; 14:1631-1634
- 23) *Jass JR*, Pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann. N. Y. Acad. Scie.* 2000; 910:62-71
- 24) *Keller G*, Hereditary aspects of gastric cancer. *Pathologia* 2002; 94:229-233
- 25) *Keller G, Vogelsang H, Becker I, Hutter J, Ott K, Candidus S, Grundei T, Becker K-F, Mueller J, Siewert JR, Höfler H*, Diffuse type gastric and lobular breast cancer in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *American Journal of Pathology* 1999; 155:337-342
- 26) *Lamberti C, Caspari R, Friedl W, Sauerbruch T, Propping P*, Erbliches Kolonkarzinom: Symptomatik, Diagnostik und Krebsvorsorge. *Deutsches Ärzteblatt* 1996; 93, Heft 21:1398-1403
- 27) *Lauren P*, The two historical main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta path. et microbial. scandinav.* 1965; 64:31-49
- 28) *Lee B-I, Wilson DM*, The RAD2 domain of human exonuclease 1 exhibits 5' to 3' exonuclease and flap structure-specific endonuclease activities. *J Biol Chem* 1999; 274(53):37763-37769
- 29) *Lee B-i, Nguyen LH, Barsky D, Fernandes M, Wilson DM*, Molecular interactions of human Exo1 with DNA. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(4):942-949
- 30) *Liu B, Parsons RE, Hamilton SR, Petersen JM, Lynch HT, Watson P, Markowitz S, Willson JKV, Green J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B*, hMSH2 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res* 1994; 54:4590-4594
- 31) *Löhnert M, Schaube H*, Magen und Duodenum. In: "Duale Reihe Chirurgie". *Henne-Bruns D., Dürig M., Kremer B.*, Thieme 2001; 313-379
- 32) *Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF*, Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC. *Int. Journal of Cancer* 1996; 69(1):38-43
- 33) *Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR*, Genetics, natural history, tumor spectrum and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104:1535-1549
- 34) *Lynch HT, Watson P, Krieglger M, Lynch JF, Lanspa SJ, Marcus J, Smyrk T, Fitzgibbons RJ Jr, Cristoforo G*, Differential diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 1988; 31:372-377

- 35) *Marra G, Boland CR*, DNA repair and colorectal cancer. *Gastroenterology clinics of North America* 1996; 25(4):755-770
- 36) *Mecklin J-P, Ponz de Leon M*, Epidemiology of HNPCC. *Anticancer Res* 1994; 14(4B):1625-1630
- 37) *Peltomäki P*, DNA mismatch repair and cancer. *Science direct* 2001; 77-85
- 38) *Peltomäki P, Vasen HFA*, Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. *Gastroenterology* 1997; 113(4):1146-1158
- 39) *Peltomäki P*, Deficient DNA mismatch repair:a common etiologic factor for colon cancer. *Human molecular genetics* 2001; 10(7):735-740
- 40) *Petrides PE*, Gendiagnostik und Gentherapie. In: "Biochemie und Pathobiochemie", *Löffler G und Petrides PE*, Springer Verlag, 1998, 6.Auflage, 317-355
- 41) *Ponz de Leon M, Sassatelli R, Benatti P, Roncucci L*, Identification of hereditary nonopolyposis colorectal cancer in the general population. *Cancer* 1993; 71:3493-3501
- 42) *Qiu J, Qian Y, Chen V, Guan M-X, Shen B*, Human Exonuclease 1 functionally complements its yeast homologues in DNA recombination, RNA primer removal and mutation avoidance. *J.Biol.Chem.*1999; 274(25):17893-17900
- 43) *Riede U-N, von Herbay A, Schaefer H-E*, Dickdarm. In: "Allgemeine und spezielle Pathologie". Thieme 1999; 4.Auflage, 718-734
- 44) *Riede U-N, Herbay A, Schaefer H-E*, Magen. In: "Allgemeine und spezielle Pathologie". Thieme 1999; 4.Auflage, 689-705
- 45) *Rüschhoff J, Roggendorf B, Brasch F, Mathiak M, Aust DE, Plaschke J, Mueller W, Poremba C, Kloor M, Keller G, Muders M, Blasenbrenn-Vogt S, Rümmele P, Müller A, Büttner R*, Molekulare Krebsdispositionsdiagnostik am Beispiel des kolorektalen Karzinoms. *Pathologie* 1998; 19:269-278
- 46) *Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S*, A national cancer institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J.Natl.Cancer Institute* 1997; 89:1758-1762
- 47) *Rudolph JG, White S, Sokolsky C, Bozak D, Mazzanti C, Lipsky RH, Goldman D*, Determination of melting temperature for variant detection using DHPLC: a comparison between an empirical approach and DNA melting prediction software. *Genetic testing* 2002; 6(3):169-176
- 48) *Schmutte C, Sadoff MM, Shim K-S, Acharya S, Fishel R*, The interaction of DNA mismatch repair proteins with human exonuclease 1. *J.Biol.Chem.*2001; 276(35):33011-33018
- 49) *Schmutte C, Marinescu RC, Sadoff MM, Guerrette S, Overhauser J, Fishel R*, Human exonuclease1 interacts with the mismatch repair protein hMSH2. *Cancer Res* 1998; 58(20):4537-4542
- 50) *Schofield MJ, Nayak S, Scott TH, Du C, Hsieh P*, Interaction of the Mut S and Mut L at a DNA mismatch. *J.Biol.Chem.*2001; 276:28291-28299
- 51) *Statistisches Bundesamt*, Statistisches Jahrbuch 1998 für die BRD. Stuttgart: Metzler Poeschel, 1999
- 52) *Sun X, Zheng L, Shen B*, Functional alterations of human exonuclease 1 mutants identified in atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. *Cancer Res* 2002; 62:6026-6030
- 53) *Takashima H, Boerkoel CF, Lupski JR*, Screening for mutations in a genetically heterogeneous disorder: DHPLC versus DNA sequence for mutation detection in multiple genes causing Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Genet. Med.* 2001; 3:335-342

- 54) *Tishkoff DX, Boerger AL, Bertrand P, Filosi N, Gaida GM*, Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Exo1: a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94:7487-7492
- 55) *Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, Hemmerle C, Brieger A, Raedle J, Plotz G, Jiricny J, Marra G,*, Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology* 2002;122:211-219
- 56) *Tsubouchi H, Ogawa H*, Exo1 roles for Repair of DNA double-strand breaks and meiotic crossing over in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 2000; 11(7):2221-2233
- 57) *Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AE, Srivastava S*, Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(4):261-268
- 58) *Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT*, New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1999; 116:1453-1456
- 59) *Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT*, The international collaborative group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Des. Colon Rectum* 1991; 34:424-425
- 60) *Vasen HFA*, What is hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Anticancer Res* 1994; 14(4B):1613-1616
- 61) *Wagner T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E, Muhr D, Pages S, Sandberg T, Caux V, Moeslinger R, Langbauer G, Borg A, Oefner P*, Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. *Genomics* 1999; 62:369-376
- 62) *Watson P, Lynch HT*, The Tumor Spectrum in HNPCC. *Anticancer Res* 1994; 14(4B):1635-1639
- 63) *Wei K, Clark AB, Wong E, Kane MF, Mazur DJ, Parris T, Kolas NK, Russell R, Hou H, Kneitz B, Yang G, Kunkel TA, Kolodner RD, Cohen PE, Edelmann W*, Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes Development* 2003; 17(5):603-614
- 64) *Wilson DM, Carney JP, Coleman MA, Adamson AW, Christensen M, Lamerdin JE*, HEX1: A new human Rad2 nuclease family member with homology to yeast exonuclease1. *Oxford J.* 1998; 26(16):3762-3768
- 65) *Wu Y, Berends MJW, Post JG, Mensink RGJ, Verlind E, van der Sluis T, Kempinga C, Sijmons RH, van der Zee AGJ, Hollema H, Kleibeuker JH, Buys CHCM, Hofstra RMW*, Germline mutations of EXO 1 gene in patients with HNPCC and atypical HNPCC forms. *Gastroenterology* 2001; 120:1580-1587
- 66) *Young J, Barker M, Fraser L, Walsh MD, Spring K, Biden KG, Hopper JL, Leggett BA, Jass JR*, Mutation searching in colorectal cancer studies:experience with a denaturing high-pressure liquid chromatography system for exon-by-exon scanning of tumor suppressor genes. *Pathology* 2002; 34:529-533

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Höfler für die Möglichkeit zur Bearbeitung dieser interessanten Thematik. Ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Gisela Keller für die zuverlässige Betreuung in allen Bereichen und Frau Susanne Plaschke für die große Hilfe bei der praktischen Durchführung der Laborarbeit.

Ein großes Dankeschön auch an meine Eltern und Nick für die fortwährende Unterstützung und konstruktive Kritik.