Aus der Klinik der Inneren Medizin Direktor: Prof. Fleig An der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Sektion: Molekulare Gastroenterologische Onkologie Prof. Ballhausen



Talgdrüsenkarzinome und Muir-Torre-Syndrom

Mikrosatelliteninstabilitäts-Analysen und Mutationsuntersuchungen am CTNNB1-Gen

Zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin

Vorgelegt Der Medizinischen Fakultät Der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von Carsten Decker Geboren am 6. März, 1974 in Greven (Westf.)

Gutachter: Herr Prof. Dr. rer.nat. Dr. med. habil. Wolfgang Ballhausen Herr Prof.Dr.med.habil. Gernot Duncker Herr Prof. Dr. L. Holbach

verteidigt am 16.04.2003

Meinen Eltern

<u>Referat</u>

In der vorliegenden Arbeit wurden 18 sehr seltene Talgdrüsenkarzinome (TDK) aus der Universitäts-Augenklinik Erlangen auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI), sowie auf Mutationen im Tumorsuppressor-Gen: Beta-Catenin untersucht, von denen 17 verwertbare Ergebnisse lieferten. Es wurde mit den Methoden der PCR und der D N A-Sequenzierung gearbeitet. Da es sich bei dem Untersuchungsmaterial um paraffin-fixierte Schnitte handelte, mußten die genannten Methoden erst an diese Bedingungen angepasst werden. MSI gilt als Hinweis auf Mutationen in den sogenannten Mismatch-Repair-Genen, welche für die Entfernung von fehlerhaft gepaarten Basen der DNA zuständig sind.

Im Rahmen der Untersuchungen konnte bei 16 der verwertbaren 17 Tumoren MSI ausgeschlossen werden, hingegen wurde ein Tumor als hochgradig mikrosatelliteninstabil eingestuft, ein weiterer Tumor wurde nicht untersucht. Die Beta-Catenin-Untersuchungen erbrachten ebenfalls keine Hinweise auf Mutationen im untersuchten Genbereich, obwohl hier Einschränkungen im Bezug auf die Beurteilbarkeit gelten müssen.

Eine in der Augenklinik Erlangen durchgeführte Untersuchung auf Mutationen im neuerlich entdeckten FHIT-Gen, die entscheidend auf den Ergebnissen dieser Arbeit fußte, konnte jedoch bei einigen als mikrosatellitenstabil klassifizierten Talgdrüsenkarzinomen fehlende FHIT-Protein-Expression nachweisen, hingegen war in dem mikrosatelliteninstabilen Tumor eine FHIT-Protein-Expression nachweisbar. Es konnte also im untersuchten Kollektiv eine Korrelation hergestellt werden zwischen MSI und FHIT-Protein-Expression bzw. Mikrosatellitenstabilität (MSS) und fehlender FHIT-Protein-Expression. Somit könnte das FHIT-Gen bei der Tumorentstehung von Talgdrüsenkarzinomen beim Menschen eine wichtige Rolle spielen. D.h. TDK könnten auf der Basis der MSI, oder eines Verlustes der FHIT-Expression entstehen. Da es sich hierbei überwiegend um ältere Patienten gehandelt hat, erscheint eine Ausschaltung bei diesen eher sporadisch entstandenen Tumoren wahrscheinlich. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse werden die Grundlage bilden für Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven.

Decker, Carsten, "Talgdrüsenkarzinome und Muir-Torre-Syndrom" Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 81 Seiten, 2001

Thema: Talgdrüsenkarzinome und MTS

Mikrosatelliteninstabilitäts-Analyse und Mutationsuntersuchungen am CTNNB1-Gen

1 EI	INLE	ITUNG	1
1.1	Überł	blick	1
1.2	Muir-	Torre-Syndrom	2
1.2.1	Epi	demiologie	2
1.2.2	Def	inition	2
1.2.3	Gei	netik	2
1.2.4	The	erapie	3
1.2.5	Pro	gnose	3
1.2.6	Ext	surs Talgdrüsen	3
1.2.7	Der	male Manifestationen des MTS	4
1.2	2.7.1	Übersicht	4
1.2	2.7.2	Das Talgdrüsenadenom	5
1.2	2.7.3	Das Talgdrüsenepitheliom	5
1.2	2.7.4	Talgdrüsenkarzinome	6
1.2	2.7.5	Das Keratoakanthom	7
1.3	Herdi	täres Nicht-Polypöses Kolonkarzinom (HNPCC) (Syn. Lynchl oder II	, Cancer Family
Syndro	me , C	FS)	8
1.3.1	Epi	demiologie und Definition	8
1.3.2	HN	PCC und FAP	9
1.3.3	Am	sterdam-Kriterien	10
1.3.4	Dia	gnose	10
1.3.5	The	erapie und Prävention	10
1.3.6	Pro	gnose	10
1.3.7	Ger	netische Ursachen	10
1.3.8	Mis	smatch-Repair-System (MMR)	11
1.3	3.8.1	Mutationsursachen	11
1.3	3.8.2	MMR-Funktion	11
1.3	3.8.3	MMR-Mutationen	12
1.3	3.8.4	Repetitive Sequenzen	12
1.3	3.8.5	Sekundär betroffene Gene	13
1.3.9	Mil	crosatelliteninstabilität	13
1.3.1	0 I	Heterozygotie	14
1.3	3.10.1	Definition "Heterozygotie"	14
1.3	3.10.2	Verlust der Heterozygotie	14

1.3.11	Mikrosatelliteninstabilität vs. Verlust von Heterozygotie (LOH)	15
1.3.12	2 Weitere Reparaturmechanismen	15
1/	Doroguliartar Wat Pathway	16
1.4	Definition	10
1.4.2	Definition Polymen-Polymosis	16
1.4.2	Die Familiäre Adenomatöse Polnosis Coli (FAP)	16
1.1.5	3.1 Epidemiologie	16
1.1	3.2 Definition	17
1.4	3.3 Diagnose	17
1.4	.3.4 Verlauf und Prognose	17
1.4	.3.5 Therapie	17
1.4	.3.6 Genetische Ursachen	18
1.4.4	Konstitutionelle Beta-Catenin-Aktivierung	19
1.4	.4.1 Definition	19
1.4	.4.2 Subtypen	19
1.4	.4.3 Funktion	19
1.5	Fragestellung der Arbeit	21
2 M	ATERIAL	22
2.1	Zubehör	22
2.1.1	Technisches Zubehör	22
2.1.2	Verbrauchsmaterial	22
2.1.3	Chemikalien und Enzyme	22
2.2	Komplettsysteme	23
2.3	Elektrophorese	23
2.3.1	Allgemeines zu den Agarosegelen	23
2.3.2	Acrylamidgelelektrophorese (Licor)	23
2.3.3	Licor- Versuchsbedingungen	24
2.3.4	Molekulargewichtsmarker	25
0 MA		00
3 111	ETHODEN	26
3.1	Extraktion der DNA aus den Paraffinschnitten	26
3.1.1	Extraktions-Kit	26
3.1.2	DNA-Konzentrationsbestimmung	26
3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
3.2.1	Allgemeines	26
3.2.2	Bedeutung der einzelnen Temperaturschritte der PCR	26
		V

3.3	Oligonukleotide	27
3.4	DNA-Extraktion aus Agarosegelen: Jetsorb-System	27
3.5	Sequenzierung	28
3.6	DNA -Restriktion	29
4 E	RGEBNISSE	31
4.1	Chromosomale Lokalisation, Primeranlagerung und Etablierung der Bedingungen	31
4.1.	1 Chromosomale Lokalisation und Primeranlagerung Fehler! Textmarke ni	cht definiert.
4.1.2	2 Etablierung der Mg 2+-Konzentrationen für MSI- Analyse	44
4.1.	3 Etablierung der Primermenge:	45
4.1.4	4 Etablierung der Annealing-Temperaturen für MSI-Primer	45
4.1.:	5 Etablierung der Taq-Polymerasemenge für folgende MSI-Primer	46
4.1.0	6 Etablierung des Ansatzvolumens für MSI-Analysen	46
4.1.′	7 Etablierung der DNA-Konzentrationen für MSI-Analysen	47
4.2	Optimierung der PCR-Bedingungen (Paraffinschnitte)	48
4.3	Temperaturprofile	48
4.4	Etablierung der PCR für die Analyse von CTNNB1, Exon 3	49
4.4.	1 Etablierung der Mg 2+-Konzentrationen	49
4.4.2	2 Etablierung der Primer-Konzentrationen	50
4.4.3	3 Etablierung der Anlagerungstemperatur	50
4.4.4	4 Taq-Polymerase-Konzentration	51
4.4.:	5 Etablierung des Ansatzvolumens	51
4.4.	6 Etablierung der DNA-Konzentration für die Analyse von CTNNB1, Exon 3	51
4.5	Optimierungen der PCR-Bedingungen an Paraffinschnitten	51
4.6	Temperaturprofil der PCR-Reaktion (Primerpaar) MSCAT3R / 3S)	52
4.7	Optimierung des Restiktionsenzym-Verdaus (R-Verdau)	52
4.8	Ergebnisse der Analysen	53
4.8.	1 MSI-Analyse Abbildungen	54
4.8.2	8.2 Ergebnisse der MSI-Analysen	
4.8.3	3 Gesamtergebnistabelle MSI	59

4.9	Beta-C	Catenin-Untersuchung	60
4.9	.1 Erge	ebnisse Hinf1-Verdau	60
4.9	.2 Seq	uenzierreaktion	62
4.10	Klinis	che Daten	63
4.1	0.1 E	pidemiologische Struktur des Patientengutes	63
4.1	0.2 P	atientenbezogene Daten	64
5	DISKU	SSION	66
5.1	Metho	dische Schwierigkeiten	66
5.1	.1 MS	-Analyse (PCR)	66
5.1	.2 Amj	plifikation des Exon 3 des Beta-Catenin-Gens (CTNNB1)	67
:	5.1.2.1	PCR	67
:	5.1.2.2	Restriktionsverdau (R-Verdau)	67
:	5.1.2.3	Sequenzierreaktion	67
5.2	MSI-A	nalyse und β–Cateninuntersuchung vs. Klinik	67
5.3	Aussag	gen und Einschränkungen	68
6	LITER	ATUR	70
Abb	ildung	sverzeichniss	
Abbil	dung 1	Talgdrüsentumoren Quelle: MacKie R., "Benigne und maligne Tumoren der Haut",	
		S.250 Abb.12.22, Hippokrates, 1990	4
Abbil	dung 2	Quelle: erm\images\Large\275sebadeno1.jpg&template=izoom	
		Foto 1 Oberes Augenlid, (von Mark S. Brown, M.D., University of South Alabama	
		Medical Center.) Foto 2 Oberes Augenlid, conjunktival, (von Mark S. Brown, M.D.,	
		University of South Alabama Medical Center)	6

	Chivelong of South Thubunha Moulour Conten.)	0
Abbildung 3	Foto 4 Histologisches Bild eines Kerathoakanthoms mit typischem ,zentralen	
	Krater und Keratinpfropf (Übersichtsvergrößerung)	7
Abbildung 4	Exulzeriertes Kolonkarzinom Quelle: Classen et al., 1998	9
Abbildung 5	Schema : MMR-Funktion	12
Abbildung 6	Repetitive Sequenzen	13
Abbildung 7	Allelverlust durch Chromosomenbrüche	14
Abbildung 8	Foto gestielter Dickdarmpoly Foto: Polyposis coli Quelle : Classen et al., 1998	
	Quelle :http://www.bioscience.org/news/scientis/catenin.htm	16
Abbildung 9	Verteilung der Mutationen im APC-Gen; Quelle Wagener, 1999	18
Abbildung 10	Tumorprogression Quelle: Vogelstein, 1993	19
Abbildung 11	APC-Beta-Catenin-Interaktion	20
Abbildung 12	pUC 19 DNA-Marker	25
Abbildung 13	Restriktionsenzymverdau (HinfI) des PCR- Fragmentes aus CTNNB1, Exon 3	29
		VII

Abbildung 14	MSH2-Locus	31
Abbildung 15	Primerlagerung BAT26	32
Abbildung 16	Primerlagerung D2S 123	34
Abbildung 17	Chromosom 3-CTNNB1-Locus	36
Abbildung 18	Primeranlagerung CTNNB1, Exon 3	37
Abbildung 19	Chromosom BAT25-Locus	38
Abbildung 20	Primeranlagerung BAT25	39
Abbildung 21	APC-Locus	40
Abbildung 22	Primeranlagerung D5S346	41
Abbildung 23	Chromosom 17-D17S250-Locus	42
Abbildung 24	Chromosom 17-D17S250-Locus	43
Abbildung 25	Etablierung der Magnesiumkonzentration	44
Abbildung 26	Etablierung der Magnesiumkonzentration	45
Abbildung 27	Etablierung der Annealingtemperatur	45
Abbildung 28	Etablierung der DNA-Konzentration für MSI-Analysen	47
Abbildung 29	Etablierung der Mg2+-Konzentration	49
Abbildung 30	Etablierung der Primerkonzentration	50
Abbildung 31	Etablierung der Annealingtemperatur	50
Abbildung 32	Etablierung der DNA-Konzentration	51
Abbildung 33	Restriktionsverdau Zeitkurve	52
Abbildung 34	Restriktionsverdau Negativ- und Positivkontrollen	53
Abbildung 35	MSI-Untersuchung Locus BAT25	54
Abbildung 36	MSI- Untersuchung Locus BAT26	55
Abbildung 37	MSI Prüfung Pat.20	56
Abbildung 38	MSI-Prüfung Patient 15	56
Abbildung 39	Ergebnisse Restriktionsverdau	60
Abbildung 40	Ergebnisse Restriktionsverdau	60
Abbildung 41	Ergebnisse Sequenzierung R, Normal/ Tumorkontrollen sowie Probe 10T	62

Abkürzungen

APC	Adenomatöse Polyposis Coli Gen
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli
KK	Kolorektale Karzinome
NSAID	Nicht steroidale Antiphlogistika
Tcf	T-Zell-Faktor
TDK	Talgdrüsenkarzinome
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
PCR	Polymerasekettenreaktion
LOH	Verlust der Heterozygotät ("Lost of Heterocygosity")
MMR	D N A-Reparatursystem ("Mismatch-Repair")
HNPCC	Hereditäres Nicht-Polypöses Kolon-Karzinom
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
CFS	Lynchsyndrom ("Cancer family syndrom")
FHIT	Fragile histidine triad
Ca	Karzinom
SCC	Squamosa-Zell-Karzinom (Spinaliom)

1 Einleitung

1.1 Überblick

Talgdrüsenkarzinome sind sehr seltene, maligne Hauttumoren (Bailet et al., 1992; Burgdorf et al., 1990), die vorzugweise okulär oder extraokulär im höheren Lebensalter auftreten (Garbe et al., 1997) und unbehandelt zum Tode führen (Altmeyer; 1995). In der Literatur sind nur wenige Hundert Talgdrüsenkarzinome beschrieben (Akthar et al., 1999). Im Rahmen des ebenfalls sehr seltenen MUIR-TORRE-Syndroms (MTS), von dem nur wenige hundert Fälle beschrieben wurden (Akthar et al., 1999), können sie sich jedoch bereits im Jugendalter manifestieren. Als MTS wird das gemeinsame Auftreten von Talgdrüsentumoren und anderen visceralen Neubildungen, wie beispielsweise des häufigen kolorektalen Karzinoms bezeichnet. Bei Tumoren, die im Rahmen des MTS diagnostiziert wurden, konnte auf genetischer Ebene Mikrosatelliteninstabiltät (MSI) nachgewiesen werden. MSI gilt als Hinweis auf Mutationen in einem bestimmten zelleigenen Reparatursystem, dem Mismatch-Repair-System (MMR). Ein MMR-Defekt wird als ursächlich für ein häufiges familiäres Kolonkrebssyndrom angesehen (Konishi et al., 1996), dem Hereditäten Nicht-Polypösen Kolonkarzinom (HNPCC) oder Lynchsyndrom, welches für 3-4% aller Kolonkarzinome verantwortlich ist (Mecklin, 1987). Ein MMR-Defekt wirkt jedoch wie eine "konstitutionelle Mutagenexposition". Somit kann es in der Folge zu Mutationen in weiteren Genen kommen, die an der Zellproliferation und Apoptoseregulation beteiligt sind (Wagener et al., 1999; Yuasa, 2000; Rubinfeld et al., 1993). Ein wichtiger Regelkreis ist diesbezüglich der sogenannte Wnt-Pathway, in dem zwei Proteine eine Schlüsselrolle übernehmen: zum einen das β - Catenin (Molenaaret al., 1996; Behrens et al., 1996) als Protoonkogen und zum andern das APC-Gen (Mioshi et al., 1992; Powell et al., 1992) als Tumorsuppressorgen. Ist eines dieser beiden Genprodukte einer Zelle mutiert, kann das Zellwachstum außer Kontrolle geraten und die Zelle maligne transformieren.

In dieser Arbeit wurden 18 Talgdrüsenkarzinome auf Mikrosatelliteninstabilität sowie Mutationen im β -Catenin-Gen untersucht. Indirekt konnten des weiteren Aussagen zu Mutationen an einzelnen MMR-Genen und zum Allelverlust (LOH) getroffen werden.

1.2 Muir-Torre-Syndrom

1.2.1 Epidemiologie

Das MTS ist eine sehr seltene Erkrankung, von der in der Literatur nur 205 Fälle berichtet werden (Akthar et al., 1999). Es handelt sich um eine genetisch determinierte Krankheit, die als eine Manifestation des Lynch-II-Syndroms (Syn. Cancer Family Syndrome, CFS) betrachtet werden kann (Lynch et al., 1981).

Männer und Frauen sind von dieser Erkrankung betroffen. In den USA beträgt das Verhältnis 3:2 .

Das Erkrankungsalter erstreckt sich vom jungen bis zum höheren Erwachsenenalter. Der Median liegt bei 53 Jahren (Horenstein et al., 2001).

Es wird den Genodermatosen mit extrakutaner maligner Manifestation zugeordnet (Rona MacKie, 1990).

1.2.2 Definition

Als MTS wird bezeichnet:

Das gemeinsame Auftreten eines Talgdrüsentumors in 100% der Fälle mit oder ohne Keratoakanthom (23% der Fälle; Akthar et al., 1999) in Zusammenhang mit einer gastrointestinalen Neoplasie (61%; Akthar et al., 1999) wie beispielsweise eines kolorektalen Karzinoms (50%) oder einer anderen visceralen Neubildung, zum Beispiel

Genitaltumoren (22 %; Akthar et al., 1999). Am häufigsten ist hier bei Frauen das Endometriumkarzinom in 15% der Fälle vertreten (Cohen et al., 1991).

Weitere Manifestationen sind intestinale Polypen (25%; Horenstein et al., 2001), M.Bowen der Vulva (Stewart et al., 1977), Brustkrebs, Lymphom, Leukämie, Bronchialkarzinom, Chondrosarkom und Speicheldrüsentumoren. Es handelt sich um ein autosomal-dominant vererbtes Leiden (Horenstein et al., 2001).

Die Hautmanifestation kann dabei der gastrointestinalen malignen Erkrankung vorausgehen, gleichzeitig auftreten oder nach ihr manifest werden. Letzteres ist am häufigsten der Fall.

Manifestation des Hauttumors:

vor	22 %
während	6 %
nach	56 %

visceralem Auftreten der Neoplasie (Akthar et al., 1999)

1.2.3 Genetik

Die im Rahmen des MTS auftretenden Tumoren sind aufgrund ihres weniger aggressiven Wachstums mit einer günstigeren Prognose verbunden (Schwartz et al., 1995) als außerhalb des MTS auftretende Tumoren. Kruse et al., 1998 konnte zeigen, dass 100% von MTS -Tumoren, die mit Talgdrüsenkarzinomen assoziiert waren, hohe genomische Instabilität aufweisen ("MSI high"). Dabei handelte es sich bei 69% um Kettenabbruchmutationen. Dies ist auf Mutationen in den wichtigen DNA-Reparatur-Genen zurückzuführen: MSH2 (85%) und im MLH 1 Gen (11%), die auf den kurzen Armen des 2.(2p) und 3.(3p) Chromosoms liegen. Sie sind auch bei einem anderen familiären Krebssyndrom dem HNPCC von Mutationen betroffen. Fong et al., 2000 berichtet vom Auftreten eines MTS-ähnlichen Tumorverteilungsmusters bei Ausfall ("knockout") eines tumorsuppressorähnlichen Genes, des FHIT-Gens, an kanzerogenexponierten Mäusen.

1.2.4 Therapie

Die Therapie besteht in der operativen Entfernung der Tumoren, desweiteren Behandlung mit Retinoiden.

1.2.5 Prognose

Zur Prognose lässt sich sagen, dass 60% der Patienten Metastasen entwickeln bei einer mittleren 12-Jahres Überlebenszeit von 50% (Horenstein et al., 2001). Von den im Rahmen des MTS auftretenden dermalen Tumoren sind Talgdrüsentumoren in der vorliegenden Arbeit von Bedeutung. Sie sollen im Folgenden näher erläutert werden.

1.2.6 Exkurs Talgdrüsen

Talgdrüsen liegen im Korium der Haut. Sie bestehen aus in Lappen angeordneten Drüsenzellen (Sebozyten) und duktalen Zellen im Ausführungsgang. Die Talgdrüsenfunktion ist eng verbunden mit der physiologischen Ausprägung des Haares. Bei Degeneration des Haares bilden sich auch die Talgdrüsen zurück (Prinzhorn et al., 1920).

1.2.7 Dermale Manifestationen des MTS

1.2.7.1 Übersicht

Einordnung der Tumoren

Die Herkunft der Talgdrüsenkarzinome lässt sich folgendermaßen innerhalb der Hauttumoren systematisieren: (siehe Abbildung)



Abbildung 1

Talgdrüsentumoren Quelle: MacKie R., "Benigne und maligne Tumoren der Haut", S.250Abb.12.22, Hippokrates, 1990

Häufige Vertreter der nicht-melanösen Dermato-Tumoren sind das Basalzellkarzinom (Basaliom), welches in den USA den Hauttumor mit der höchsten Inzidenz darstellt (Miller et al., 1994), das Spinaliom und das Kerathoakanthom.

Als Neubildungen der Sebozyten sind hier bekannt:

- das Talgdrüsenadenom (Syn. Adenoma sebopharum)
- das Talgdrüsenepitheliom, welches als Zwischenstufe in der Entwicklung zwischen Adenoma sebopharum und Talgdrüsenkarzinom gilt
- das Adenocarcinoma sebaceum (Altmeyer, 1995).

Äthiologische Faktoren für kutane Malignome



1.2.7.2 Das Talgdrüsenadenom

Das Talgdrüsenadenom ist ein seltener, gutartiger Tumor aus differenzierten Sebozyten. Es erscheint makroskopisch als ein weniger als ein Zentimeter großer, glatter, derber, runder, erhabener Knoten oder als gelbe Papel im Gesicht oder im Haarbereich (Sterry et al., 1992), oder aber am Stamm (Horenstein et al., 2001).

Das Adenoma sebaceum tritt bei älteren Menschen auf. Es gilt als charakteristischer Marker für das MTS und weist ein typisches Verteilungsmuster auf:

Im Rahmen des MTS dominiert eine Manifestation am Körperstamm, während bei der sporadischen Form vor allem der Kopfbereich betroffen ist (Horenstein et al., 2001).

1.2.7.3 Das Talgdrüsenepitheliom

Das Talgdrüsenepitheliom hat seinen Altersgipfel nach dem 50. Lebensjahr, tritt in Gesicht und Ohrregion auf, imponiert histologisch in großen, gelappten Zellformationen. Es besitzt basaliomähnliche Elemente (Altmeyer et al., 1995)

1.2.7.4 Talgdrüsenkarzinome

(Syn.Talgdrüsenadenokarzinom, Adenocarcinoma sebaceum, Carcinoma sebaceum, sebaceous carcinoma)





Foto 2: oberes Augenlid, von konjunktival

Foto 1: oberes Augenlid Foto1+2 : Talgdrüsenkarzinom makroskopisch Abbildung 2 Quelle: erm\images\Large\275sebadeno1.jpg&template=izoom Foto 1 Oberes Augenlid, (von Mark S. Brown, M.D., University of South Alabama Medical Center.) Foto 2 Oberes Augenlid, conjunktival, (von Mark S. Brown, M.D., University of South Alabama Medical Center.)

Bei Talgdrüsenkarzinomen handelt es sich um eine sehr seltene Neoplasie der Hautanhangdrüsen (Talgdrüsen) (Bailet et al., 1992; Burgdorf et al., 1990). In der Literatur sind nur wenige Hundert Fälle von TDK beschrieben (Akthar et al., 1999). Es handelt sich um einen epithelialen, malignen Tumor, der sich üblicherweise im Alter von 70 Jahren in okulärer oder extraokulärer Form (Garbe et al., 1997) manifestiert, und der von den Talgdrüsenzellen ausgeht (Altmeyer, 1995). Am Auge und im Rahmen des MTS tritt es allerdings schon im Jugendalter auf. Das MTS betrifft Frauen häufiger als Männer (Omura et al., 1990), und Orientalen häufiger als Kaukasier (De Potter et al., 1993). Häufigste Lokalisation ist fazial-okulär am Augenlid, wobei die Talgdrüsen des Oberlids, ZEISSsche und Meibomsche Drüsen betroffen sein können (Bailet et al., 1992; Burgdorf et al., 1990). Aber auch andere Lokalisationen sind möglich, wie beispielsweise Nase, Augenbrauen, Lippe, Schläfe, Körperstamm (Altmeyer et al., 1995) und Fuß bzw. Penis (Horenstein et al., 2001). TDK erscheinen als solitäre, nodulärzystische Tumoren mit oft jahrelangem Bestehen (Steffen et al., 1994) und sind deshalb leicht mit Chalazionen zu verwechseln (Omura et al., 1990). Histologisch imponieren unregelmäßig lobulär angeordnete, undifferenzierte, atypische Tumorzellen mit eosinophilem Zytoplasma, die zentral-lobulär schaumig erscheinen. Makroskopisch zeigt sich ein 0,5-5 cm großer, rötlich-livide oder gelb gefärbter, knotig-derber, rasch, infiltrativ (Garbe et al., 1997) und teilweise ulzerierend (Steffen et al., 1994) wachsender Tumor.

Prognostisch ungünstig metastasiert das Talgdrüsenkarzinom innerhalb 1-2 Jahren nach Manifestation zunächst in die regionalen und dann in die viszeralen Lymphknoten (Altmeyer, 1995). Die Therapie besteht in der radikalen operativen Exzision, evtl. Ausräumung der regionalen Lymphknoten und der Gabe von Retinoiden (Bollag et al., 1992; Gollnick et al., 1991).

1.2.7.5 Das Keratoakanthom

Bei Keratoakanthomen handelt es sich um Tumoren, die dem Squamosazellkarzinom (SCC) oder Spinaliom der Haut sehr ähnlich sind und sich teilweise in Klinik und Histologie mit ihm überschneiden.

Es erscheint als schnell wachsende, hyperkeratotische, rötliche Papel mit einem eingedellten Hornpfropf, die, nachdem sie eine Größe von 2-4 cm erreicht hat, für einige Monate im Wachstum sistiert und sich schließlich im Gegensatz zum SCC spontan zurückbildet (Spontanregression) (MacKie, 1990) und eine Narbe zurücklässt. Sie kommen in der Regel im höheren Lebensalter vor (MacKie, 1990).



Abbildung 3

Foto 4 Histologisches Bild eines Kerathoakanthoms mit typischem ,zentralen Krater und Keratinpfropf (Übersichtsvergrößerung)

1.3 Herditäres Nicht-Polypöses Kolonkarzinom (HNPCC) (Syn. LynchI oder II, Cancer Family Syndrome, CFS)



Häufigkeiten von Keimbahn-Mutationen in kolorektalen Karzinomen

1.3.1 Epidemiologie und Definition

Das HNPCC ist eine relativ häufige, autosomal-dominant vererbbare Erkrankung. Es zeichnet sich durch ein erhöhtes Risiko für das frühe Auftreten von Karzinomen aus und ist Ursache für 3-4% aller Kolonkarzinome (Mecklin, 1987; Lynch et al., 1991), die in der BRD mit einer Inzidenz von 25/ 100 000 Einwohner (Classen et al., 1998) den häufigsten malignen Tumor des Gastro-Intestianaltraktes bzw. in den USA unter Ausschluss der Hauttumoren das zweithäufigste Karzinom überhaupt darstellen (Classen et al., 1998). Zum HNPCC zählen in erster Linie gastrointestinale Tumoren, Genitaltumoren und einige andere. Am häufigsten entwickeln sich Kolonkarzinome mit einem Lebenszeitrisiko von über 80% (Lynch et al., 1991; Kinzler et al., 1998), davon 60-70% im proximalen Kolon bzw. bei Frauen das Endometriumkarzinom mit einem Lebenszeitrisiko (LZR) von 20%. Das gemittelte Manifestationsalter liegt zwischen 40-66 Jahren. Erstbeschreiber war WARTHIN im Jahre 1913, und Lynch definierte in den Siebziger Jahren das nach ihm benannte Syndrom. Es wurden zwei Typen vom Lynchsyndrom unterschieden: LYNCH I, ohne extrakolonische Manifestation und LYNCH II, mit extrakolonische Manifestation (Kinzler et al., 1998).

Karzinom	mittl.LZR	Rel.Risiko	Mittleres Mani-	
Lokalisation			festationsalter	
			(Jahre)	
Kolon und Rektum	80%(bis 70 LJ.)		46	
Endometrium	20%(bis 70 LJ.)		46	
Magen		4,1	54	
Ovarien		3,5	40	
Jejunum		25	53	
Hepatobiliär		4,9	66	
Niere		3,2	66	
Ureter		22	56	

Lebenszeitrisiko (LZR), relatives Risiko und mittleres Erstmanifestationsalter beim HNPCC

Quelle: Kinzler et Vogelstein, 1998



Abbildung 4 Exulzeriertes Kolonkarzinom Quelle: Classen et al., 1998

1.3.2 HNPCC und FAP

Das HNPCC muß von der FAP abgegrenzt werden. Im Gegensatz zu dieser wesentlich selteneren, aber nicht weniger gut erforschten Erkrankung, kommt es zu dem prämalignen Zwischenstadium des Auftretens von Hunderten von Polypen, von denen schließlich, dem Modell der "Klonalen Evolution" (Wagener, 1999) entsprechend, einer oder mehrere sich über eine weitere Anhäufung von Mutationen zum Kolonkarzinom entwickeln können.

Nicht so beim HNPCC. Hier kommt es in einem Vorstadium allenfalls zu einigen, wenigen Polypen, die sich jedoch durch eine rasche Progression zum Karzinom auszeichnen (Lanspa et al., 1990; Jass, 1992; Kinzler et Vogelstein, 1998).

1.3.3 Amsterdam-Kriterien

Um das HNPCC klinisch fassbar zu machen entwickelte man die Amsterdam-Kriterien. Sie geben Auskunft zur Familienanamnese und tragen dem frühen Manifestationsalter des Kolonkarzinoms Rechnung (Vasen et al. 1991).

- 1. Mindestens 3 Verwandte mit bestätigtem Kolonkarzinom
- 2. Mindestens einer dieser muß ein Verwandter ersten Grades der übrigen sein
- 3. FAP ist ausgeschlossen
- 4. Mindestens zwei aufeinander folgende Generationen sind betroffen
- 5. Min. eine Kolonkarzinom-Manifestation unter 50. Lebensjahr

1.3.4 Diagnose

Die Diagnose stützt sich im Wesentlichen auf folgende Punkte:

Die Amsterdam-Kriterien, molekulargenetische Untersuchungen bzw. die Anamnese, die digital-rektale Untersuchung, der Hämokulttest, der Kolon-Doppelkontrasteinlauf bzw. teilweise oder totale Koloskopie, die Oberbauchsonographie und die Knochenszintigraphie (Flasnoecker et al., 1999; Classen et al., 1998)

1.3.5 Therapie und Prävention

Die Therapie des HNPCC besteht in:

- genetischem Screening von Verdachtsfällen (Familienanamnese) (Jarvinen et al., 1995)
- Koloskopische Überwachung in 3-jähigem oder kürzerem Intervall (Jarvinen et al., 1995)
- prophylaktische oder therapeutische Kolonteilresektion (Kinzler et Vogelstein, 1998)

1.3.6 Prognose

Obwohl das histologisch schlecht differenzierte Bild des Kolonkarzinoms im Rahmen des HNPCC ein aggressiveres Verhalten vermuten lassen würde, ist es mit einem längeren Überleben verbunden (Lynch et al., 1991).

1.3.7 Genetische Ursachen

Ursächlich für das Auftreten des HNPCCs ist ein MMR -Gendefekt. Als hinweisend gilt hier der molekularbiologische Nachweis von MSI. 95 % der HNPCC -Tumoren wiesen MSI auf, wobei hingegen nur 13-24 % von invasiven sporadischen Kolonkarzinomen MSI aufwiesen (Konishi et al., 1996).

Die Amsterdam-Kriterien sind nicht zu hundert Prozent verläßlich, da Patienten Mutationen in den HNPCC-Genen aufwiesen, jedoch nicht mit den Amsterdamkriterien übereinstimmten.

Ebenso erweist sich der molekulargenetische Nachweis des HNPCC nicht als einfach.

- Es sind zwar nahezu alle (95%) HNPCC-Tumoren MSI positiv, jedoch sind auch 13-24% der sporadischen Kolonkarzinome mikrosatelliteninstabil.
- Direkte Sequenzierung der HNPCC-Gene ist einerseits sehr aufwendig, andererseits lässt es Mechanismen wie "Alternatives Splicing" außer acht, welches wiederum zu veränderter oder aufgehobener Proteinfunktion führen kann.

1.3.8 Mismatch-Repair-System (MMR)

1.3.8.1 Mutationsursachen

An der DNA entstehen laufend Schäden. Neben den exogenen Schäden durch Strahlung, alkylierende Substanzen etc. kommt es aber auch zu Schäden, die durch fehlerhaftes Arbeiten der Polymerase (f= 10 hoch -12) entstehen. Diese werden in der Regel durch spezielle, kerneigene Reparatursysteme erkannt und behoben.

1.3.8.2 MMR-Funktion

Stellvertretend wird die Funktion dieser für kleinere DNA-Schäden von 2-4 Basen am Modell von E.coli erläutert: Nach der Verdopplung der DNA-Stränge in der S (Synthese)-Phase des Zellzyklus ist der jeweils neu synthetisierte Strang noch nicht (vollständig) methyliert (= hemimethylierte DNA). Dies wird von dem sogenannten MutH-Protein erkannt: Es bindet an den schon methylierten Strang. Ein weiteres Protein MutS bindet an den Ort der Mutation. MutS und MutH assoziieren und weitere Bestandteile des MMRs werden rekrutiert. Dies aktiviert die latente Endonukleaseaktivität des MutH, die den nicht methylierten, also neuen Strang schneidet. Die Helicase II entwindet den Doppelstrang, und der fehlerhafte, nicht-methylierte DNA-Strang wird durch die 5'-3 oder die 3'-5'Exonuclease abgebaut. Jetzt synthetisiert die DNA-Polymerase III einen neuen Strang an dem verbliebenen methylierten, und die DNA-Ligase verbindet schließlich den neuen Strang mit dem Reststück des verbliebenen.

Beim Menschen entspricht:

MutL Homolog	MLH1
MutS Homolog	MSH2+MSH6
PMS	Postmeiotic Segregation Increased Protein"

Quelle: Wagener, 1999



Abbildung 5 Schema : MMR-Funktion

1.3.8.3 MMR-Mutationen

Beim HNPCC sind hauptsächlich folgende vier MMR -Gene mutiert:

hMSH2 3-42%	Chromosom 2p, 15-16	MutS Homolog
hMLH1 14-83%	Chromosom 3p 21,	MutL Homolog
PMS1 2%	Chromosom 2q, 31	MutL
PMS2 4%	Chromosom 7p, 22,	MutL

Quelle: Liu et al. 1995 et 1996 ; Peltomäki et de la Chapelle, 1997

1.3.8.4 Repetitive Sequenzen

Repetitive Sequenzen sind solche Basenabfolgen, die eine ständige Wiederholung, entweder eines Nukleotides(z.B. Poly-A), oder aber mehrerer Nukleotide darstellen (z.B. CA-Sequenzen, "CA-Repeats"(Thibodeau et al., 1993; Dietmaier et al., 1997). Sie stellen in zweierlei Hinsicht eine Gefahr für die genomische Stabilität dar: Einerseits begünstigen sie Deletionen (kontrahiert) oder Zugewinn (extrahiert) (Wagener, 1999) einzelner Basen (sogenanntes "Verlesen" der DNA-Polymerase), andererseits sind Polynucleotidsequenzen erhöhter Gefahr ausgesetzt durchzubrechen. So begünstigen sie ebenfalls Deletionen, und damit auch Leserasterverschiebungen, die ihrerseits häufig zu Stopp- ("Nonsense") oder "Missense"-Mutaionen führen (Wagener, 1999). Dies ist auch dann möglich, wenn Mutationen innerhalb von Introns, also in nicht direkt für die Proteinkodierung zuständigen Genbereichen liegen.



Abbildung 6

Repetitive Sequenzen

1.3.8.5 Sekundär betroffene Gene

In der Folge werden somit Gene am häufigsten betroffen sein, in denen selbst oder in deren direkter Nachbarschaft für Mutationen besonders anfällige Bereiche liegen, z.B. Repetitive Sequenzen . Dies ist bei dem somit indirekt untersuchten MSH2-Gen der Fall. Ein MMR-Ausfall wiederum kann zur ausfallenden oder verminderten Funktion von Genen führen, die an der Steuerung von Zellwachstum und Apoptose beteiligt sind. Beim HNPCC sind dies u.a. Mutationen:

85-90% 57%	(bei Kolonkarzinomen) (bei Adenomen) im TGFß-Rezeptor II-Gen, welche proliferationshemmend auf Epithel	s lien wirkt
40%	im Beta-Catenin, ein Protoonkogen, welches die Zellproliferation förder	t
10%	im APC, ein Tumorsuppressorgen, welches beim Kolonkarzinom als	
	Tumorsuppressorgen eine sogenannte Türwächter ("Gatekeeper")-Funkt	ion
	übernimmt	

HNPCC Mutationen Quelle: Wagener et al., 1999; Planck et al., 2000, Markowitz et al., 1995; Yuasa et al., 2000

1.3.9 Mikrosatelliteninstabilität

Unter MSI (früher:MIN+ oder RER "Replication Error Phenotype") versteht man Längenvariationen repetitiver Sequenzen, die zur inkorrekten Weitergabe genetischer Information an die Tochterzellen führen (Dietmaier et al., 1997). Es wird unterschieden zwischen hoher (mehr als 20% instabile Loci), und niedriger MSI (weniger als 10% instabile Loci) (Thibodeau et al., 1993; Dietmaier et al., 1997, Jass et al., 1999). Zum Nachweis von MSI sind insbesondere monomorphe (Zhou et al., 1998) Marker geeignet, also solche, die eine große Stabilität bezüglich ihrer Länge innerhalb Population aufweisen, da sie schon aus der Tumorprobe allein (Zhou et al., 1998) Aussagen über die Mikrosatellitenstabilität zulassen. Zu ihnen zählen die Mononucleotidrepeats BAT 25 und BAT 26. Sie zeichnen sich außerdem durch hohe Sensitivität aus (Dietmaier et al., 1997, Jass et al., 1999; Zhou et al., 1998). Aus einer Studie zur vereinfachten MSI-Analyse schlug BROCKER et al., 1997 vor, an einem Fünfersatz ("Panel") von Mono,- und Dinucleotidrepeats Tumoren auf MSI hin zu untersuchen.

Es wurde folgende Klassifikation vorgenommen: Beim Vorliegen von zwei oder mehr von fünf instabilen Loci = MSI hoch ("high").

Beim Vorliegen von nur einem von 5 instabilen Loci: MSI niedrig ("low").

Beim Vorliegen von keinem instabilen Locus Mikrosatellitenstabilität (MSS).

Ist die MMR-Maschinerie auf Grund von Schäden in den einzelnen genannten Genen nicht in vollem Umfang funktionsfähig, so treten die beschriebenen DNA-Schäden auf bzw. werden nicht von selbiger behoben.

1.3.10 Heterozygotie

1.3.10.1 Definition "Heterozygotie"

Kommt ein Gen in zwei unterschiedlichen Ausprägungen vor (Allele), so spricht man von Heterozygotie.

1.3.10.2 Verlust der Heterozygotie

Geht ein Allel ein und desselben Gens verloren (Deletion), so spricht man von "Verlust der Heterozygotie", engl. "Lost of Heterocyosity", kurz LOH. Durch diesen Mechanismus kann z.B. ein Wildtyp-Allel eines Tumorsuppressorgens (z.B. APC) verloren gehen (siehe Abb. 7). Somit würde in der Acrylamidgelelektrophorese eine Bande des heteromorphen Markers fehlen. Das verbleibende, von Mutation betroffene Gen könnte somit seiner regulatorischen Funktion nicht mehr nachkommen und es käme über weitere Zwischenschritte zur Tumorentwicklung bzw. Progression.



Abbildung 7

Allelverlust durch Chromosomenbrüche

1.3.11 Mikrosatelliteninstabilität vs. Verlust von Heterozygotie (LOH)

MSI ist invers korreliert mit LOH auf den Chromosomen 5q, 17p, 18q, aber positiv mit der Überlebenszeit (Thibodeau, 1993).

1.3.12 Weitere Reparaturmechanismen

Das MMR-System ist nicht der einzige DNA-Reparaturmechanismus. Für verschiedenartige DNA-Schäden gibt es verschiedene zelleigene Reparaturmechanismen (Quelle:Wagener,1999):

- Basenexzisionssystem---monofunktionelle Glycosylasen. Sie entfernen fehlerhafte Basen
- Nukleoid-Excisions-Reparatursystem (NER)---für u.a.UV-induzierte DNA-Schäden
- Homologe Rekombination
- End-zu-End Verbindung ("end-joining")

All diese Veränderungen führen schließlich über Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen bzw. Aktivierung von Protoonkogenen zum ganzen oder teilweisen Verlust der Zellproliferationskontrolle bzw. Apoptosehemmung. Hierbei spielen noch weitere Mutationen wie z.B. K-ras, p53 und andere eine wichtige Rolle.

1.4 Deregulierter Wnt-Pathway

1.4.1 Definition

Der "Wnt-Pathway", abgeleitet von Wnt = "Wingless" in Analogie zu einem ähnlichen Mechanismus bei Drosophila, ist ein Enzymgefüge, das der Kontrolle von Wachstum, Apoptose und Proliferation der Zelle dient, und ein Bindeglied zwischen Zellinnerem und ihrer Umgebung herstellt. Viele komplizierte Regelkreise mit An- und Abschaltung von Enzymen und Rezeptoren etc. spielen hierbei eine Rolle. Zwei wesentliche, insbesondere im Rahmen dieser Arbeit wichtige Genprodukte, sollen im folgenden Erläuterung finden: Zum einen das APC – Genprodukt und zum anderen das Beta-Catenin.

1.4.2 Definition Polypen-Polyposis

Als Polyposis wird das Auftreten von mehr als 50-100 Polypen bezeichnet, während bei einer geringeren Anzahl dieser gutartigen Tumoren von "Polypen" gesprochen wird (Classen et al., 1998).





Abbildung 8	Foto gestielter Dickdarmpoly	Foto: Polyposis coli	
	Quelle : Classen et al., 1998		
	Quelle :http://www.bioscience.org/news/scientis/catenin.htm		
	Dickdarmpolypen		

1.4.3 Die Familiäre Adenomatöse Polposis Coli (FAP)

1.4.3.1 Epidemiologie

Bei der FAP handelt es sich um eine seltene, autosomal-dominant erbliche Erkrankung, die mit einer Häufigkeit von f=1/7000 (Kinzler et Vogelstein, 1996) auftritt, und weniger als 1-3 % aller Kolonkarzinome ausmacht (Kinzler et Vogelstein, 1998; Lynch et al., 1991).

Bereits um die vorletzte Jahrhundertwende war die FAP als familiäre Erkrankung bekannt (Kinzler et Vogelstein, 1996), obwohl sie erst vor eineinhalb Dekaden mit einer Deletion des Chromosoms 5q in Verbindung gebracht wurde (Herrera et al., 1986; Bodmer et al., 1987).

1.4.3.2 Definition

Typischerweise entwickeln FAP-Patienten Hunderte oder Tausende von Adenomatösen Kolonpolypen in der zweiten bis dritten Lebensdekade. Der Median liegt bei 40 Jahren (Giardiello et al., 1995). Die einzelnen Polypen haben im Vergleich zu sporadischen Polpen des Kolons kein erhöhtes Risiko maligne zu entarten, sondern alleine die große Anzahl der Polypen bedingt das erhöhte Dickdarmkarzinomrisiko (Kinzler et Vogelstein, 1998). Ebenfalls treten bei einem Hauptteil der Patienten extrakolonische Manifestationen auf, wie zum Beispiel: Osteome, Desmoid-(Haut)-Tumoren, sowie Tumoren der Retina, des Hirns, des Magens und der Schilddrüse (Kinzler et Vogelstein, 1996; Giardiello et al., 1995). Es gibt allerdings keinen einheitlichen Phänotyp. Sie lassen sich histo-pathologisch unterteilen in tubuläre, villöse und tubulo-villöse Adenome, wobei die tubulären multipel auftreten, während die villösen gewöhnlich als Solitärgeschwülste erscheinen und häufiger maligne entarten. Je größer ein Polyp, desto größer ist seine Tendenz sich maligne zu transformieren (Classen et al., 1998).

1.4.3.3 Diagnose

Die Diagnose wird endoskopisch-histologisch gestellt. Erbringt die Koloskopie den Verdacht auf ein Polyposis-Syndrom, werden also mehr als 100 Polypen gesehen und ca. 10 von ihnen histologisch untersucht und als Adenome charakterisiert, so ist eine adenomatöse Polyposis gesichert (Flasnoecker et al., 1999). Im Zusammenhang mit einer positiven Familien- und Eigenanamnese bzw. molekulargenetischen Untersuchungen wird schliesslich die FAP diagnostiziert.

1.4.3.4 Verlauf und Prognose

Bei der FAP handelt es sich um eine obligate Präkanzerose. Dementsprechend ist der Verlauf ohne adäquate Behandlung sehr ungünstig. Ausserdem besteht ein erhöhtes Entartungsrisiko für Neoplasien des Gastro-Intestinaltraktes bzw. extraintestinaler Tumoren wie der Gallenwege, Pankreas, Leber, Nebenieren oder der Schilddrüse u.a.(Flasnoecker et al., 1999).

1.4.3.5 Therapie

Chirurgisch wird die totale Proktokolektomie durchgeführt. Bei Jugendlichen erfolgt eine engmaschige, mindestens 2-jährliche endoskopische Kontrolle (Flasnoecker et al., 1999; Classen et al., 1998) sowie der Test auf okkultes Blut im Stuhl (Hämokulttest). Zur Nachsorge gehört eine halbjährliche bzw. jährliche endoskopische Untersuchung sowie der Hämokulttest. In vielen Fällen wird eine postoperative Strahlenbehandlung und adjuvante Chemotherapie (5-Flourouracil u.a) durchgeführt (Flasnoecker et al., 1999; Classen et al., 1998). Des weiteren wurde Regression von Adenomen unter NSAID- bzw. Antioxidantien-Behandlung beobachtet (Flasnoecker et al., 1999)

1.4.3.6 Genetische Ursachen

1)

Das APC-Gen ist ein Tumorsuppressorgen, welches als "Torwächter" (engl."gatekeeper") bezeichnet wird (Kinzeler et Vogelstein, 1996), da es schon sehr früh und in gleicher Häufigkeit bei Kolonadenomen und Kolonkarzinomen mutiert ist. In der Adenom-Karzinomsequenz ist es somit in kleinen und benignen Neubildungen des Kolons ebenfalls schon ausgeschaltet. Das ist sowohl bei sporadischen Kolonkarzinomen aufgrund von Spontanmutationen als auch bei den familiären Kolonkarzinomen der Fall. 80% der sporadischen Kolonkarzinome weisen somatische Mutationen im APC-Gen auf (Powell et al., 1992 et 1993; Jen et al., 1994;).

2)

Ursächlich sind hierfür verschiedene Arten von Kettenabbruch-Mutationen verantwortlich: 80% der sporadischen Kolonkarzinome und ebenfalls 85% der FAP-Tumoren des Kolonkarzinoms besitzen folgende Mutationen



Verteilung der Mutationen im APC-Gen; Quelle Wagener, 1999

Abbildung 9 Erläuterung:

Dargestellt ist die APC cDNA in ihrer Zusammensetzung durch 15 Exons. Die Zahlen stellen die Condon-Positionen dar, von N- nach C-terminal. Rote Zahlen sind die Codonpositionen der gefundenen Mutationen, die Länge der Striche entspricht der Häufigkeit (f) der Mutation in Relation zu allen gefundenen Mutationen.

3)

LOH spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der kolorektalen Karzinogenese. Geht der lange Arm von Chromosom 5 verloren, und ist das verbliebene Wildtyp-Allel des APCs ebenfalls inaktiviert, kommt es zur verminderten Konzentration des APC-Genprodukts in der Zelle. Es wird damit ebenfalls inaktiviert (Herrera et al., 1986; Bodmer et al., 1987). 4)

Das APC -Protein ist ein zytoplasmatisches und kernständiges Molekül , das aus 2843 Aminosäuren besteht (Smith et al., 1993; Munemitsu et al., 1994; Wagener, 1999) und es besitzt eine spezifische Bindungsdomäne für eine Serin-Threonin-Kinase, die GSK3ß, und weitere für Beta-Catenin (Rubinfeld et al., 1993 et 1996; Munemitsu et al., 1995). Beta-Catenin als zellproliferationsförderndes und apoptosehemmendes Protein vermittelt seine Wirkung über Aktivierung von HMG-Box-Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie im Kern (Molenaar et al., 1996; Behrens et al., 1996). Herunterreguliert wird Beta-Catenin durch Phosphorylierung im Komplex mit APC und damit dem Proteosomen-Abbau zugeführt (siehe auch Abb.11).



Abbildung 10 Tumorprogression Quelle: Vogelstein, 1993

Erläuterung:

Die Zelle akkumuliert während ihrer klonalen Expansion verschiedene Gendefekte, die dann letztendlich zum Karzinom bzw. zur Metastasierung führen. Eine der frühesten Mutationen ist die APC-Inaktivierung. Es folgen genetische Veränderungen an K-ras, bis schliesslich relativ spät p53-Mutationen folgen.

1.4.4 Konstitutionelle Beta-Catenin-Aktivierung

1.4.4.1 Definition

Der Name Catenin definiert sich über die Assoziation dieser Proteine zu den <u>Ca</u>2+-abhängigen <u>Adherinen</u> (<u>Cadherine</u>), welche als Adhäsionsmoleküle in den Zonulae adhaerentes (Wagener, 1999) bei der Zell-Zell-Adhärenzverbindung eine wichtige Rolle spielen (Kawanishi et al., 1995).

Das Beta-Catenin bindet an eine Untergruppe der Cadherine, und zwar an das E- ("Epitheliale")-Cadherin. Man unterscheidet zwischen Alpha- Beta- und Gamma-Catenin.

1.4.4.2 Subtypen

- Alpha-Catenin verbindet als assoziiertes Protein E-Cadherin, als transmembranöses Strukturprotein mit Aktinfilamenten (Ozawa et al., 1990).
- **Beta-Catenin** bildet eine "Brücke" zwischen Alpha-Catenin und E-Cadherin. Dies geschieht über seinen N-terminalen Teil (Kawanishi et al., 1995;).
- Gamma-Catenin, auch als Plakoglobin bezeichnet ist dem Beta-Catenin sehr ähnlich.

1.4.4.3 Funktion

Unabhängig von seiner Bindung an E-Cadherin ist Beta-Catenin als Signaltransduktor von der Zellperipherie in den Kern bekannt. Es vermag also Signale (Mitogene), die von außen über den Wnt-Rezeptor auf die Zelle einwirken, zu vermitteln. Dies geschieht im Kern durch Bindung an den T-Cell-Faktor (Tcf) /Lef (Planck et al.,

2000; Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996), einem Transkriptionsfaktor. Dieser Komplex bindet an die DNA und ermöglicht so ein Ablesen von bestimmten wachstumsfördernden Genen (c-Jun, c-Fos, AP1). Es handelt sich also um die Funktion eines Protoonkogens (siehe auch Abb.11).



Abbildung 11APC-Beta-Catenin-InteraktionDas Catenin-Gen liegt auf Chromosom 3p22-p21.3.

Erläuterung:

Im Abbildung 11 dargestellt ist die Interaktion zwischen dem APC-Protein und Beta-Catenin. Im linken Teil der Darstellung erkennt man die Bindung zwischen APC, Beta-Catenin und der Serin-Threonin-Kinase GSK3ß. Letztere vermag somit das Beta-Catenin zu phosphorylieren (Symbol "P"), und damit über den Proteosomen-Pathway den Abbau zu ermöglichen. Somit kann die zellproliferationsfördernde Wirkung des Protoonkogens Beta-Catenin kontrolliert werden.

Im rechten Bildteil ist verändertes APC-Protein bzw. verändertes Beta-Catenin dargestellt. Die Bindungsdomänen für die gegenseitige Interaktion sind im dargestellten Fall mutiert (*), so dass die Komplexbildung APC-Beta-Catenin- GSK3B, die zur Phosphorylierung des Beta-Catenins erforderlich ist, nicht stattfinden kann. Das Beta-Catenin bindet im Kern unter Vermittlung der Transkriptionsfaktoren Lef/Tcf an die DNA, und vermittelt das Ablesen von proliferationsfördernden Genen. Erhöhte Aktivität des Beta-Catenins stellt somit eine Ursache unkontrollierten Zellwachstums dar.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten 18 Patientenproben von Talgdrüsenkarzinomen auf MSI hin untersucht werden und zwar mittels der Marker BAT25 und BAT26. Wie Bocker et al., 1997 konstatierten, können bereits mittels Analysen dieser beiden Loci zuverlässige Angaben zum Mikrosatellitenstatus gestellt werden. Drei weitere Loci wurden in die Analysen mit einbezogen.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurden einige dieser Talgdrüsenkarzinome mittels Amplifizierung , Restriktionsenzymverdaus und Sequenzierung im Exon 3 des β -Catenin-Gens untersucht.

2 Material

2.1 Zubehör

2.1.1 Technisches Zubehör

Agarosegelkammer	OWL Separation Syst., Portsmouth, USA	
Automatische Pipette	Drummond Scientific Co., Broomall, USA	
Biodoc Analyse, Whatman	Biometra, Göttingen	
Digital Printer,	Sony, Tokyo, Japan	
Erlenmeyerkolben	VWR Brand, Merck Eurolab AG, D-Dietikon	
Genanalyseapparatur "Licor"	Licor Inc, Lincoln, USA	
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen	
Mastercycler "Personal"	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg	
Mastercycler "Gradient"	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg	
Mikrowelle "Automatic"	Bosch, Stuttgart	
Pipetten "Research"	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg	
Spektralphotometer "SmartSpec 3000"	BIO Rad, Hercules, CA, USA	
Trafo	Turnhout, Belgien	
Vortex "Minishaker"	IKA Works, Wilmington, NC, USA	
Waage	Scaltec Instruments, Heiligenstadt	
Wasserbad "Fisherbrand"	Fisherscientific, Schwerte	
Zentrifuge "Minispin"	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg	
Zentrifuge Biofuge "Stratos"	Kendo Laboratory Products, Osterode	

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Reaktionsgefässe

Pipettenspitzen Säuberungstücher "Kimwipes Lite" Reaktionsgefässe "Tubes"

2.1.3 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid Ammoniumperoxodisulfat Agarose Agarose "Low-Melt" Borsäure Bromphtenolblau Desoxynucleotide DNA-Polymerase "Superscript II", EDTA "Titriplex III Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldendorf Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldendorf Kimberly-Clark Corporation Neenah, WI, USA Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldendorf

National Diagnostics, Hessle-Hull, GB Carl Roth, Karlsruhe Eurogentec, Bel-SA Biozym GmbH, Hess.Oldendorf Carl-Roth, Karlsruhe Sigma-Aldrich Gmbh, Steinheim Boeringer, Mannheim Gibco-Lifetechnologies, Gaithersburg, USA E.Merck, Darmstadt

Eisessig	E.Merck, Darmstadt
Ethanol abs.	E.Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	E.Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich Gmbh, Steinheim
Loading Dye Solution	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Molekulargewichtsmarker "pUC 19"	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Magnesiumchlorid	Gibco-Lifetechnologies, Gaithersburg, USA
PCR-Puffer	Gibco-Lifetechnologies, Gaithersburg, USA
Tris	Carl-Roth, Karlsruhe
Xylol	E.Merck, Darmstadt

2.2 Komplettsysteme

Jetsorb DNA-Extraktion Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
Qiamp DNA-Mini Kit	Quiagen GmbH, Hilden
Sequenzier Kit Seq.ThermE2	Epicentre Technologies Madison, WI, USA

2.3 Elektrophorese

2.3.1 Allgemeines zu den Agarosegelen

Geladene Teilchen wandern im elektrischen Feld. So wandern die positiv geladenen Kathionen zur negativen Kathode und die negativen organischen Anionen wie beispielsweise die DNA-Fragmente zur positiven Anode. Die PCR-Produkte werden in Nähe der Kathode auf das Gel aufgebracht und wandern dann durch das Gel hindurch. Durch die auftretenden Wechselwirkungskräfte zwischen den Bestandteilen des Gels und den wandernden Teilchen bewegen sich diese in Abhängigkeit von der Größe unterschiedlich schnell fort. Größere Fragmente erscheinen deshalb nach einer bestimmten Zeit näher an der Kathode (Nähe Startpunkt), wo hingegen kleinere D N A-Stücke zur gleichen Zeit sich dichter an der Anode befinden. Die in den Abbildungen gezeigten Gele sind so ausgerichtet, dass sich die Kathode oben und die Anode unten befindet, so dass sich die Fragmente also in Laufrichtung "nach unten" durch das Gel bewegen. Größere Fragmente befinden sich also oben in der Abbildung, während kleinere weiter unten zu finden sind.

2.3.2 Acrylamidgelelektrophorese (Licor)

Licor-Apparatur Funktion

Das LICOR-System nutzt die Infrarotfluoreszenz (IR), um D N A zu detektieren. In der Polymerasekettenreaktion wird ein mit IRD ("Infra Red Dye")-Farbstoff gekennzeichneter Primer an die Amplifikationsprodukte gebunden. Diese Fragmente werden ihrer Größe nach im Acrylamidgel (6%ig) aufgetrennt. Eine Feststofflaserdiode regt die markierten DNA-Fragmente zur Fluoreszenz an, so bald sie das Detektionsfenster passieren. Ein automatisch fokussierendes Fluoreszenzmikroskop, welches eine Feststoff-Silikon-Fotodiode enthält, fährt laufend das Gel in seiner Breite ab und sammelt so Daten. Diese Daten werden von der Software zu einem Gesamtbild zusammengefügt, welches als Bandenmuster erscheint. Das Absorbtionsmaximum beträgt je nach verwendetem Fluoreszenz-Farbstoff entweder 795nm (IRD 800) oder 685nm (IRD 700). (LICOR-Sequencing Manual, Einführung, LICOR, Inc, 1999)

2.3.3 Licor-Versuchsbedingungen

Die Elektrophosebedingungen der MSI-Analysen betrugen wie folgt:

	Beta-Catenin	MSI-Analyse
	Sequenzierung	
Gelgröße	41cm	25cm
Acrylamidgel	6%	6%
Spannung	1000V	1200V
Stromstärke	35 A	25A
Temperatur	50°C	55°C
Vorlaufzeit	0:30h	0:30h
Laufzeit	9:00h	5:00h
Geschwindigkeit	mittel	mittel

Elektrophoresebedingungen

Die Messungen erfolgen mittels Infrarot-CO2-Laser bei 795nm bzw. 685nm

2.3.4 Molekulargewichtsmarker

Als Molekulargewichtsmarker wurde verwendet "pUC19 DNA /MspI (HpaII) Marker". Zur Herstellung dieses Markers, der eine Mischung aus DNA verschiedener Fragmentgrößen im Bereich von 501-26 Basenpaaren darstellt, wird pUC 19-DNA mit MspI verdaut, extrahiert, gefällt und erneut in 10mM Tris-HCl an 1mM EDTA gelöst.

Es ergibt sich in der Elektrophorese folgendes Bild:



Abbildung 12 pUC 19 DNA-Marker

3 Methoden

3.1 Extraktion der DNA aus den Paraffinschnitten

3.1.1 Extraktions-Kit

Das QIAamp DNA Mini Kit- System beruht auf dem Prinzip der Auflösung der Eiweiße mit Proteinase K, DNA –Bindung an eine spezielle Ionenaustauscher-Matrix, und nach verschiedenen Waschvorgängen Abgabe der DNA an ein geeignetes Medium. Die paraffinfixierten Tumor- und Normalproben mit einer Probenmenge von ca. 30 Miligramm wurden von den Ojektträgern entfernt und in folgender Weise behandelt:

- A- Zugabe von 180µl Pufferlösung und Proteinase K, Inkubation bei 56°C
- B- Zugabe von 200µl einer zweiten Pufferlösung, Inkubation bei 70°C
- C- Zugabe von 200µl Ethanol
- D- Bindung der DNA an ein Matrixsystem innerhalb einer Säule
- E- Zwei Waschschritte
- F- Lösung der DNA in bi-destilliertem Wasser (DDW)

3.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei Kontrolle gegen einen Nullwert: Doppelt Destilliertes Wasser ohne D N A.

3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.2.1 Allgemeines

Bei der PCR handelt es sich um eine von Muleris et al., 1986 entdeckte Methode DNA-Fragmente von bis zu 12 Kilobasen zu vervielfältigen. Eine spezielle hitzebeständige DNA-Polymerase aus Thermophilus aquaticus, einem Mikroorganismus, welcher in heißen Quellen lebt, amplifiziert dabei in gesteurten Temperaturschritten die Amplifikation der Ausgangs-DNA.

3.2.2 Bedeutung der einzelnen Temperaturschritte der PCR

A-Initiale Denaturierung

Hier werden die ganz oder teilweise miteinander verbundenen DNA – Einzelstränge voneinander getrennt. Dieser Schritt ist notwendig, damit eine fehlerfreie Anlagerung im nächsten Schritt erreicht werden kann. Er ist insbesondere bedeutungsvoll, da gerade der Beginn der millionenfachen Amplifikation über das Endprodukt und dessen Spezifität entscheidet.

B- Primer-Anlagerung ("Annealing")

Die Oligonukleotide (Primer) suchen sich bei dieser relativ niedrigen Temperatur (zwischen 50°C -60°C) ihr komplementäres DNA –Teilstück und lagern sich dort an.

C-Elongation

Durch Erhöhung der Temperatur auf 72°C gelangt der Ansatz in den Optimalbereich für das Arbeiten der Taq-DNA-Polymerase. Diese beginnt komplementär zur Matrizen-D N A, Nukleotide an den neu entstehenden Strang zu knüpfen. Nach Beendigung dieses Schrittes wird erneut denaturiert.

D-Wiederholung Zyklenanzahl

Die Zyklen bestehen aus den Phasen A - C und werden üblicherweise zwischen 25 und 40 mal wiederholt. Dadurch wird ein exponentielles Anwachsen der Endproduktmenge erreicht, so daß das untersuchte Fragment in der Elektrophorese durch Ethidiumbromid nachweisbar wird.

E-Abschliessende Elongation

Alle nicht abgeschlossenen Verlängerungen der neuen DNA-Stränge werden durch diesen Schritt vervollständigt und durch Abkühlung des Ansatzes auf +4°C wird eine weitere Reaktion nahezu vollständig unterbunden.

3.3 Oligonukleotide

D2S123 u	5`aaa cag gat gcc tgc ctt ta 3`	D2S123d 5'gga ctt tcc acc tat ggg ac 3'Dinucleotid-		
Repeat, polymorph				
BAT26.1	5'tga eta ett ttg aet tea gee 3'	BAT26.2 5'aac cat tca aca ttt tta acc c 3'		
-Mononucleotid-Repeat, monomorph				
BAT25.1	5'tcg ctt caa aga atg taa gt 3'	BAT25.2 5'tct gca ttt taa cta tgg ctc 3'		
-Mononucleotid-Repeat, monomorph				
D5S346u	5`act cac tct agt gat aaa tcg 3`	D5S346d 5'agc aga taa gac agt att act agt t 3'		
-Mononucleotid-Repeat, monomorph				
D17S250u	5`gga aga atc aaa tag aca at 3`	D17S250d 5`gct ggc cat ata tat att taa acc 3'		
-Dinucleotidrepeat, polmorph				
MSCAT3S 5` tgt aaa acg acg gcc agt gct gat ttg atg gag ttg gac atg g 3`				
MSCAT3R 5' cag gaa aca gct atg acc cca gct act tgt tct tga gtg aag g 3'				
-CTNNB1, Exon 3				

3.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen: Jetsorb-System

Das Prinzip des Jetsorb-Systems zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen zur Spezifizierung des PCP-Produktgemisches beruht auf der Bindung der DNA an spezielle Glasperlen, die in einer Suspension vorliegen, und die anschliessende Aufreinigung bzw. Abgabe der DNA an ein geeignetes Lösungsmittel. Im einzelnen erfolgen die Schritte (Jetsorb Protokoll, Genomed GmbH, 1994):

- A- Auflösung des Agarosegels durch Schüttel-Mixen (Vortex)
- B- DNA –Bindung an Glasperlen mittels Inkubation bei 50 °C
- C- Waschschritte, Trocknung
- D- Elution der gereinigten D N A
3.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung beruht auf der Tatsache, dass die DNA-Polymerase solange den komplementären Strang zu verlängern vermag, bis sie ein verändertes Nucleotid (Didesoxynucleotid, dd NTP) einbaut. Danach stoppt die Reaktion durch Kettenabbruch (Sanger et al., 1977). Wird bei der Sequenzierreaktion eine bestimmte Mindestzeit eingehalten, so liegen bis zu einer bestimmten Fragmentlänge alle möglichen Fragmentgrößen bis zu dieser vor, d.h. jeweils mit einem Längenunterschied von einer Base zueinander. Diese Mischung unterschiedlicher Fragmentgrößen lässt sich schließlich in der

Acrylamidgelelektrophorese bis auf eine Base Unterschied genau auftrennen, so dass sich die Basenabfolge der untersuchten DNA erkennen lässt. Der Ablauf besteht aus den unter "PCR" beschriebenen Temperaturschritten. Diese sahen bei der Sequenzierreaktion des CTNNB1-Gen, Exon 3 folgendermaßen aus: (siehe nächste Seite)

Spezielle Sequenzier-Bedingungen

Initiale Denaturierung		95°C	5 min
Denaturierung		95°C	0:30 min
Annealing	30 Zyklen	50°C	0:15 min
Elongation		70°C	1 min

Temperaturprofil der PCR-Reaktion (SEQ)

3.6 DNA – Restriktion

Bei Restriktion der DNA wurde das PCR-Produkt bei 37°C für 10 min. inkubiert, danach die Reaktion mittels Zugabe von 0,5 μl 0,5M EDTA und Kühlung auf 4°C gestoppt.

CTNNB1-Gen, Exon 3, HinfI-Schnittstellen (gantc; zwischen g und a)



Abbildung 13 Restriktionsenzymverdau (HinfI) des PCR- Fragmentes aus CTNNB1, Exon 3

Lokalisation SW-48 – Mutation (CTNNB1, Exon 3, Codon 33)

Erläuterung:

Die Restriktionsendonuclease Hinf 1 schneidet das oben gezeigte Amplimer an den beiden mit Pfeilen gekennzeichneten Stellen. Es entstehen im oben gezeigten Fall folgende drei Fragmentgrößen:

Gesamtlänge des PCR-Fragmentes :	266 bp
Erstes Fragment:	100 bp
Zweites Fragment:	7 bp
Drittes Fragment:	159 bp

Tritt allerdings in der Erkennungssequenz der Restriktionsendonuclease "gantc" (rot unterlegt) eine Mutation (*) auf, so schneidet das Enzym an dieser Stelle nicht. Im Falle einer Mutation im Codon 33, Exon 3 des Beta-

Catenin-Gens von " tct" zu "tat" wird also diese mögliche Schnittstelle nicht erkannt und es entstehen im Hinfl-Verdau dieser Proben nur noch folgende zwei Fragmente:

Erstes Fragment :	100bp + 7bp = 107 bp
Zweites Fragment:	159 bp

Das erste Fragment des Normalfalles verlängert sich bei Ausfall der ersten Schnittstelle um weitere 7 bp. Das mittlere Fragment entfällt, da es bereits Teil des ersten ist, und das zweite Fragment weist eine Länge von 159 bp auf wie in der Normalgewebeprobe.

4 Ergebnisse

4.1 Chromosomale Lokalisation, Primeranlagerung



Schema Chromosom 2- MSH 2- Locus Quelle: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgibin/Entrez/maps.cgi?ORG=hum &CHR=2&maps=loc, morbid, gene&query=MSH2&VERBOSE=O N&ZOOM=10

Abbildung 14 MSH2-Locus

Erläuterung:

In der Abbildung erkennt man links den langen und kurzen Arm des Chromosoms 2 (Ideogramm). Der mit Rot unterlegte Ausschnitt des kurzen Arms 2p16-2p22 ist im rechten Bildteil vergrößert dargestellt. Fett gedruckt ist der MSH2 Lokus auf 2p22-21.



Schema Primerlagerung BAT 26.1



Schema Primerlagerung BAT 26.2

Erläuterung

Das Schema zeigt die Primersequenz des Primers BAT 26 und die der komplementären Basenabfolge der genomischen DNA lokalisiert auf Chromosom 2, an die sich der Primer anlagert. Die repetitive Sequenz Poly-"A", wenige Dutzend Basen in 3'-Richtung gelegen, ist 26 mal wiederholt und wird sowie umliegende Basen ebenfalls kopiert. In dem unteren Teil des Schemas ist die Anlagerung des zweiten Primers an den +Strang zu sehen. Beide Primer binden jeweils an eine spezifische Lolkalisation auf und abwärts der zu amplifizierenden Sequenz. Nur DNA Abschnitte zwischen diesen beiden primerspezifischen Sequenzen werden amplifiziert. Die Primer werden bei der Reaktion verbraucht und müssen deshalb im Überschuss vorhanden sein genauso wie die verwendeten Desoxynucleotide (dNTPs), aus denen das " enzymatisch amplifizierte" PCR-Fragment gebildet wird.



Schema Primeranlagerung Locus D2S123u



Schema Primeranlagerung Locus D2S123d

Erläuterung

Im oberen Bildteil sieht man einen Ausschnitt aus der DNA-Sequenz des Chromosoms 2, an das sich der Primer anlagert.

Das Schema zeigt die Primersequenz des Primers D2S123 und die der komplementären Basenabfolge der genomischen DNA lokalisiert auf Chromosom 2, an die sich der Primer anlagert. Die Repetitive Sequenz Poly-"CA", wenige Dutzend Basen in 3'-Richtung gelegen, ist 13 bzw. 15 mal wiederholt und wird sowie umliegende Basen ebenfalls kopiert. In dem unteren Teil des Schemas ist die Anlagerung des zweiten Primers an den +Strang zu sehen. Beide Primer binden jeweils an eine spezifische Lokalisation auf und abwärts der zu amplifizierenden Sequenz. Nur DNA Abschnitte zwischen diesen beiden primerspezifischen Sequenzen werden amplifiziert. Die Primer werden bei der Reaktion verbraucht und müssen deshalb im Überschuss vorhanden sein.

Gleiches gilt für die verwendeten Desoxynucleotide (dNTPs), aus denen das " enzymatisch amplifizierte" PCR-Fragment gebildet wird.



Abbildung 17 Chromosom 3-CTNNB1-Locus

Erläuterung:

In der Abbildung erkennt man links den langen und kurzen Arm des Chromosoms 3 (Ideogramm). Der mit Rot unterlegte Ausschnitt des kurzen Arms 3p21ist im rechten Bildteil vergrößert dargestellt. Fett gedruckt ist der CTNNB1 Lokus auf 3p21.



Schema Primerlagerung CTNNB1, Exon 3 MSCAT3S



Schema Primerlagerung CTNNB1, Exon 3 MSCAT3R

Abbildung 18 Primeranlagerung CTNNB1, Exon 3

Erläuterung:

Das Schema zeigt die Primersequenz des Primers MSCAT3S und die der komplementären Basenabfolge der genomischen DNA lokalisiert auf Chromosom 3, an die sich der Primer anlagert, einen Abschnitt aus dem CTNNB1-Locus sowie umliegende Basen ebenfalls kopiert. In dem unteren Teil des Schemas ist die Anlagerung des zweiten Primers an den +Strang zu sehen. Beide Primer binden jeweils an eine spezifische Lokalisation auf und abwärts der zu amplifizierenden Sequenz. Nur DNA Abschnitte zwischen diesen beiden primerspezifischen Sequenzen werden amplifiziert. Die Primer werden bei der Reaktion verbraucht und müssen deshalb im Überschuss vorhanden sein.

Gleiches gilt für die verwendeten Desoxynucleotide (dNTPs), aus denen das "enzymatisch amplifizierte" PCR-Fragment gebildet wird.



SchemaChromosom BAT 25-Locus Quelle: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/m aps.cgi?ORG=hum&CHR=4&MAPS=ideogr[4pter:4qter],cntg[0.00:202182334.00],loc[-4q12:-4q12]&GOTO=3630.25ISCN

Abbildung 19 Chromosom BAT25-Locus

Erläuterung:

In der Abbildung erkennt man links den langen und kurzen Arm des Chromosoms 4 (Ideogramm). Der mit Rot unterlegte Ausschnitt 4p15.3- 4q25 ist im rechten Bildteil vergrößert dargestellt. Fett gedruckt ist die BAT 25-Lokalisation auf 4q12.



Schema Primerlagerung BAT 25.1



Schema Primerlagerung BAT 25.2

Abbildung 20 Primeranlagerung BAT25

Erläuterung

Das Schema zeigt die Primersequenz des Primers BAT25 und die der komplementären Basenabfolge der genomischen DNA lokalisiert auf Chromosom 4, an die sich der Primer anlagert, einen Abschnitt aus dem Chromosom 4q12 sowie umliegende Basen ebenfalls kopiert. In dem unteren Teil des Schemas ist die Anlagerung des zweiten Primers an den +Strang zu sehen. Beide Primer binden jeweils an eine spezifische Lokalisation auf und abwärts der zu amplifizierenden Sequenz. Nur DNA Abschnitte zwischen diesen beiden primerspezifischen Sequenzen werden amplifiziert. Die Primer werden bei der Reaktion verbraucht und müssen deshalb im Überschuss vorhanden sein.

Gleiches gilt für die verwendeten Desoxynucleotide (dNTPs), aus denen das "enzymatisch amplifizierte" PCR-Fragment gebildet wird.



Schema Chromosom 5-APC-Locus Quelle: <u>http://www.ncbi.nim.nih.gow/cgi-bin/Entre.z/</u> <u>maps.cgi</u>?org=hum&chr=5&MAPS=gene,loc[140454582. 13:144273749.87]&QUERY=APC&QSTR=apc

Abbildung 21 APC-Locus

Erläuterung:

In der Abbildung erkennt man links den langen und kurzen Arm des Chromosoms 5 (Ideogramm). Der seitlich mit Rot gekennzeichnete Ausschnitt des kurzen Arms 5p21-22 ist im rechten Bildteil vergrößert dargestellt. Fett gedruckt ist der APC-Lokus auf 5p21.



Schema Primerlagerung D5S346u



Schema Primerlagerung D5S346d

Erläuterung:

Das Schema zeigt die Primersequenz des Primers D5S346 und die der komplementären Basenabfolge der genomischen DNA lokalisiert auf Chromosom 5, an die sich der Primer anlagert. Der repetitive Abschnitt "CA" sowie umliegende Basen werden ebenfalls kopiert. In dem unteren Teil des Schemas ist die Anlagerung des zweiten Primers an den +Strang zu sehen. Beide Primer binden jeweils an eine spezifische Lokalisation auf und abwärts der zu amplifizierenden Sequenz. Nur DNA Abschnitte zwischen diesen beiden primerspezifischen Sequenzen werden amplifiziert.



Quelle:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/maps.cgi?CHR=1 7&MAPS=loc%5B2194309.50%3A87579761.00%5D%2Cmorbid%5B0. 00%3A4950.00%5D%2Cgene%5B-%3A-%5D&BEG=17q11.2&END=17q12

Abbildung 23 Chromosom 17-D17S250-Locus

Erläuterung:

In der Abbildung erkennt man links den langen und kurzen Arm des Chromosoms 17 (Ideogramm). Der mit Rot unterlegte Ausschnitt des langen Arms 17q12-q11+2 ist im rechten Bildteil vergrößert dargestellt. Fett gedruckt ist der D17 S250 Locus.



Schema Primeranlagerung D17S250u



Schema Primeranlagerung D17S250d

Abbildung 24 Chromosom 17-D17S250-Locus

Erläuterung

Das Schema zeigt die Primersequenz des Primers D17S250 und die der komplementären Basenabfolge der genomischen DNA lokalisiert auf Chromosom 17, an die sich der Primer anlagert. Der repetitive Abschnitt "CA" sowie umliegende Basen werden ebenfalls kopiert. In dem unteren Teil des Schemas ist die Anlagerung des zweiten Primers an den +Strang zu sehen. Beide Primer binden jeweils an eine spezifische Lokalisation auf und abwärts der zu amplifizierenden Sequenz. Nur DNA Abschnitte zwischen diesen beiden primerspezifischen Sequenzen werden amplifiziert. Etablierung der PCR-Bedingungen für die MSI- Analyse.

4.1.1 Etablierung der Mg 2+-Konzentrationen für MSI- Analyse

Die Mg2+-Konzentration wurde in folgenden Verdünnungsstufen variiert: Von 1-10µl/ Ansatzvolumen



 $10\ 9\ 8\ 7\ 6\ 5\ 4\ 3\ 2\ (\mu l) \quad 10\ 9\ 8\ 7\ 6\ 5\ 4\ 3\ 2\ (\mu l)$

Etablierung der Magnesiumkonzentration

Abbildung 25 Erläuterungen:

In der linken Abbildung ist die Bande des spezifischen PCR-Produktes D2S123 einer Leukozytenkontroll-DNA eines gesunden Probanden (Kontolle 1) zu erkennen.

Mit steigender Mg2+-Zugabe von 2-10 μ l (c = 4- 20 mmol/ μ l) nimmt die Intensität der Bande zu. Jedoch wird bei geringerer Konzentration die Bande dafür schärfer.

In der rechten Abbildung ist die Bande des Primersets D2S123, einer weiteren Leukozyten -DNA-Kontrolle (Kontrolle2) abgebildet. Mit steigender Mg2+-Zugabe (c= 4-20 mmol/µl) werden die Intensitäten zwar stärker, jedoch inhomogener als bei der zuerst gezeigten Kontrolle.

Die Mg2+-Zugabemengen für die übrigen MSI-Primer wurden in gleicher Weise etabliert.

Etablierte Mg2+-Konzentrationen für die Primer:

BAT 25	2,5µl/25µl Ansatz
BAT 26	2,5µl/25µl Ansatz
D2S 346	2,5µl/25µl Ansatz
D17 S250	1,0µl/25µl Ansatz
D5S 123	4,0µl/25µl Ansatz

4.1.2 Etablierung der Primermenge:

Die Primer-Konzentration wurde in folgenden Verdünnungsstufen variiert:

 $4\text{-}0,5\mu l\,/\,25\mu l\text{-}Ansatzvolumen$ entsprechend 0,2-1,6 pmol/µl



Etablierung der Magnesiumkonzentration

Etablierung der Primerkonzentration

Erläuterung:

Die Banden des Locus D5S346 stellen sich heterozygot dar. In dieser Abbildung erscheinen sie nahezu ohne Unterschied gleich intensiv. Allerdings gibt es bei Zugabemengen unterhalb von 1,5 µl wiederholt nicht-funktionierende PCRs. Somit wurden die Primer-Konzentrationen für alle Loci bei 2 µl-Zugabemenge etabliert.

Etablierte Primermengen:

BAT 25	2µl
BAT 26	2µl
D2S 346	2µl
D17 S250	2µl
D5S 123	2µl

4.1.3 Etablierung der Annealing-Temperaturen für MSI-Primer

Die Temperatur wurde in folgendem Bereich variiert: von 51-61°C



Etablierung der Annealingtemperatur

Erläuterung:

In der Abbildung sind 11 PCR-Ansätze über einen Anlagerungstemperatur-Gradienten von 10 Grad Celsius im Bereich von 51-61 ° C mit dem Primerset D17S250 an Kontroll-DNA(San) etabliert worden. Das Temperaturoptimum für speziell diesen Primer liegt bei 52 ° C, da die Bande bei dieser Temperatur am schärfsten zu erkennen ist. In gleicher Weise wurden auch die Bedingungen für alle übrigen Primer etabliert.

Etablierte Annealingtemperaturen für folgende locusspezifische Primer-Kombinationen

(DNA aus Leukozyten):

BAT25	52°C bei 35 Zyklen
BAT26	60°C bei 35 Zyklen
D2S346	52°C bei 35 Zyklen
D17S250	52°C bei 35 Zyklen
D5S123	52°C bei 35 Zyklen

4.1.4 Etablierung der Taq-Polymerasemenge für folgende MSI-Primer

Etablierte Taq-Polymerase-Konzentrationen (25µl-Ansätze):



4.1.5 Etablierung des Ansatzvolumens für MSI-Analysen

Durch Vergrößerung des Ansatzvolumens von anfänglich 12,5µl auf 25 µl konnte eine höhere Stabilität der Ergebnisse erreicht werden. Aus Gründen der Resourcenschonung wurde auf 50 µl-Ansätze verzichtet. Die etablierten Ansatzvolumina sahen wie folgt aus:

Ansatzvolumina



4.1.6 Etablierung der DNA-Konzentrationen für MSI-Analysen

Die DNA-Konzentration wurde in folgenden Verdünnungsstufen variiert: 0,0002-2,0ng/ µl



Abbildung 28Etablierung der DNA-Konzentration für MSI-Analysen*Der Lokus D5S 346 ist in der westlichen Population gewöhnlich heterozygot (f= 80%)

Erläuterung:

In der Kontrolle 1 (KO 1) ist der Primer D5S346 gezeigt,

bei DNA- Verdünnungen von 0,0002-2,0 ng/ µl bzw. 0,001-0,4 ng /Ansatz.

In der ersten Abbildung bei c0 0,0002 ng/µl ist die Verdünnung der DNA so hoch, dass das eine Allel dieses heterozygoten Locus durch den Verdünnungseffekt nicht mehr im Ansatz vorhanden ist (Pfeil). Nur das 2. Allel wird abgebildet. Die 2. Kontrolle (Ko.2) zeigt keine auffälligen Intensitätsveränderungen. Hier zeigt die Kontrolle bezüglich des Locus D5S346 ein homozygotes Allel. Zu erkennen sind außerdem die Abrutschbanden

4.2 Optimierung der PCR-Bedingungen (Paraffinschnitte)

Die Bedingungen wurden in gleicher Weise wie 4.2 beschrieben verändert und optimiert. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dieser Optimierung dargestellt:

Primer	c(Mg2+)	Annealing-T	c(Primer)	c(Taq)	V(µl)	DNA -Menge
		(°C)				
BAT25	5mmol/µl An-	54°C bei 35	0,8pmol/µl	0,08 U	25µl	0,0002-2ng/
	satz	Zyklen				μl
BAT26	5mmol/µl An-	60°C bei 35	0,8pmol/µl	0,08 U	25µl	0,0002-2ng/
	satz	Zyklen				μl
D2S346	5mmol/µl An-	54°C bei 35	0,8pmol/µl	0,08 U	25µl	0,0002-2ng/
	satz	Zyklen				μl
D17S250	2mmol/µl An-	54°C bei 35	0,8pmol/µl	0,08 U	25µl	0,0002-2ng/
	satz	Zyklen				μl
D5S123	8mmol/µl An-	54°C bei 35	0,8pmol/µl	0,08 U	25µl	0,0002-2ng/
	satz	Zyklen				μl

Gesamt PCR-Bedingungen

4.3 Temperaturprofile

Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Zyklus-Denaturierung	95°C	0:45 min	
Annealing	54°C	0:45 min	35 Zyklen
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	1 min	
Temperaturprofil der PCR-Reakt	tionen (Loci B.	AT25, D2S 123, D17S250, I	D5S346)
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	_
Denaturierung	95°C	0:45 min	
Annealing	60°C	0:45 min	35 Zyklen
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	1 min	

Temperaturprofil der PCR-Reaktionen (Locus BAT 26)

4.4 Etablierung der PCR für die Analyse von CTNNB1, Exon 3

4.4.1 Etablierung der Mg 2+-Konzentrationen



Unspezifische Banden

266 bp-Bande (spezifisch)

**MGM = MolkulargewichtsmarkerpUC 19



Erläuterung:

Dargestellt sind PCRs am Exon 3 des CTNNB1-Locus MSCAT bei verschiedenen Mg2+Zugaben von Mg2+= 0,5µl-5µl. Molekulargewichtsmarker (MGM) ist pUC 19 mit den eingezeichneten Fragmentgrößen von 501 bp -67 bp. Die Zugabemenge wurde mit 3,5µl (c = 3,5mmol/l) festgelegt. Bei größeren Zugaben von Mg2+ ist das Signal zwar stärker, aber die Schmierbanden sind dort zu kräftig. Im Bereich niedrigerer Zugabemengen von 0,5-3,0µl ist jedoch das spezifische Signal zu schwach.

Etablierte Mg2+-Mengen für Primer:

MSCAT 3S /MRCAT 3R 3.5 mmol/l

4.4.2 Etablierung der Primer-Konzentrationen

Die Primer-Konzentration wurde in folgenden Verdünnungsstufen variiert:

1,0µl-4,0µl/ 25µl-Ansatz



Abbildung 30Etablierung der PrimerkonzentrationErläuterung:

1 sehen ist die Bande, einer Normalkontrol

Zu sehen ist die Bande einer Normalkontrolle. Rechts neben dem Molekuargewichtsmarker (MGM) erkennt man:

bei 1 µl Primerzugabe : keine Bande

bei 4 µl Primerzugabe: maximale Intensität des PCR-Produktes

Die Bande erscheint doppelt, da neben der oberen spezifischen Bande zusätzlich eine Primerwolke darunter zu sehen ist.

4.4.3 Etablierung der Anlagerungstemperatur



Abbildung 31 Etablierung der Annealingtemperatur

Erläuterung:

Die Etablierung der Anlagerungstemperatur brachte im Temperaturbereich von 64 +/- 5 °C für das Primerpaar keine erkennbaren Unterschiede.

Etablierte Annealing-Temperaturen für Primer:

MSCAT 3S/ MRCAT 3R 64°C

4.4.4 Taq-Polymerase-Konzentration

Bei der Taq-Polymerase-Konzentration wurde die in der Literatur angegebene Menge verwendet (c= 0,08 U/ µl).

4.4.5 Etablierung des Ansatzvolumens

Beim Ansatzvolumen wurden 50µl-Ansätze verwendet (grössere Ausbeute)

4.4.6 Etablierung der DNA-Konzentration für die Analyse von CTNNB1, Exon 3

Die DNA-Konzentration wurde in folgenden Verdünnungsstufen variiert: von 0,0002-50ng/µl



MGM 1 0,5 0,2 0,001 0,0005 μl

Abbildung 32 Etablierung der DNA-Konzentration

Etablierte D N A Konzentrationen für:

MSCAT 3S/ MRCAT 3R $c = 0,0002-2ng / \mu l$

4.5 Optimierungen der PCR-Bedingungen an Paraffinschnitten

Beta-Catenin-PCR Bedingungen nach Optimierung (Paraffinschnitte), Überblick Bei erster PCR:

Primerpaarc(Mg2+)Annealing-T(°C)c(Primer)c(Taq)V(μ)DNA -MengeMSCAT3,5 mmol/l Ansatz64°C / 35 Zyklen0,8pmol/μl0,67U/ 50μl50μl0,0002-2ng/μl3S/3R

PCR-Bedingungen Beta-catenin, Exon 3

Nach Übertrag aus Agarosegel (2.PCR)

Primerpaar	c(Mg2+)	Annealing-T(°C)	c(Primer)	c(Taq)	V(µl)	DNA -Menge
MSCAT	1,5 mmol/l Ansatz	64°C / 35 Zyklen	0,8pmol/µl	0,67U/ 50µl	50µl	0,000250ng/µl
3S/3R						

4.6 Temperaturprofil der PCR-Reaktion (Primerpaar) MSCAT3R / 3S)

Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	1 min	
Annealing	64°C	1 min	> 35 Zyklen
Elongation	68°C	1 min	J
Finale Elongation	68°C	5 min	

Temperaturprofil Beta-Catenin, Exon3-PCR

4.7 Optimierung des Restiktionsenzym-Verdaus (R-Verdau)

Die Restriktionsdauer wurde im Bereich von 1-10 min optimiert:



Optimierung des Restriktionsenzymverdaus:

In Abbildung 33 ist eine Zeitkurve (t = 0-10 min) der restriktionsenzymatischen Spaltung eines PCR-Fragmentes einer Länge von 266 bp aus dem CTNNB1-Gen, Exon 3 (oberer Pfeil) dargestellt. Die Intensität der Ausgangsbande (266bp) nimmt mit Zunahme der Spaltungszeit kontinuierlich ab. Darunter sind die Spaltprodukte der DNA-Restriktion zu erkennen (Klammer). Diese bilden noch keine einheitliche Bande, da die Laufzeit im Agarosegel für eine Trennung dieser relativ geringen Fragmentgrößen-Unterschiede noch nicht ausreicht. Unten im Gel ist die Primerbande zu sehen (unterer Pfeil). Ganz links sieht man den Molekulargewichtsmarker (MGM).



MGM SW- Ko.1 SW- SW Ko.1 Ko.1 48-R -R 48 48-R-R

Abbildung 34 Restriktionsverdau Negativ- und Positivkontrollen

Die Abbildung zeigt von links nach rechts folgende Spuren:

- 1. Spur Molekulargewichtsmarker
- 2. Spur Positivkontrolle "SW-48" nach inkompletter DNA- Restriktion
- 3. Spur Negativkontrolle "Ko.1" nach kompletter Restriktion
- 4. Spur Positivkontrolle "SW-48" vor DNA-Restriktion
- 5. Spur Positivkontrolle "SW-48" nach inkompletter DNA- Restriktion (s.o)
- 6. Spur Negativkontrolle "Ko.1" nach kompletter Restriktion
- 7. Spur Negativkontrolle "Ko.1" vor DNA-Restriktion

Wie unter 3.6 erläutert, entstehen durch Spaltung des PCR-Fragmentes aus CTNNB1, Exon 3 folgende Fragmentgrößen (von oben nach unten im Gel zu sehen):

Ausgangsfragment:	266 bp
Mittleres Fragment:	159 bp
Fragment bei "SW-48"-Mutation:	107 bp
Fragment bei Negativkontrolle:	100 bp

4.8 Ergebnisse der Analysen

4.8.1 MSI-Analyse Abbildungen

Ergebnisse der MSI-Analyse an den folgenden Loci zeigte:



Abbildung 35 MSI-Untersuchung Locus BAT25

Erläuterung:

Zu erkennen sind die MSI-Analysen von Tumorproben der Patienten 1-20 am Locus BAT25 unter optimierten PCR-Bedingungen. Der monomorphe Mononucleotid-Repeat erschien bei Mikrosatellitenstabilität (MSS) als nur eine Hauptbande. Die begleitenden Banden sind Abrutschbanden, die auf fehlerhaftes Arbeiten der Taq-Polymerase zurückzuführen sind. Liegt eine MSI vor, so erkennt man eine zusätzliche Hauptbande, die sich deutlich von den übrigen Abrutschbanden abhebt (Patient Nr.20). Diese Analyse zeigt somit an diesem Locus Mikrosatellitenstabilität bei 12 von 18 Patienten und MSI bei nur einem Patienten. Diese Ergebnisse waren überraschend, da andere Autoren bei mit dem Muir-Torre-Syndrom assoziierten Talgdrüsenkarzinomen überwiegend MSI und nicht MSS festgestellt hatten (vgl. 1.2.3).



Abbildung 36 MSI- Untersuchung Locus BAT26

Zu erkennen sind die MSI-Analysen von Tumorproben der Patienten 1-20 am Locus BAT26 unter optimierten PCR-Bedingungen. Der monomorphe Mononucleotid-Repeat erschien bei Mikrosatellitenstabilität (MSS) als nur eine Hauptbande. Die begleitenden Banden sind Abrutschbanden, die auf fehlerhaftes Arbeiten der Taq-Polymerase zurückzuführen sind. Liegt eine MSI vor, so erkennt man eine zusätzliche Hauptbande, die sich deutlich von den übrigen Abrutschbanden abhebt (Patient Nr.20). Diese Analyse zeigt somit an diesem Locus Mikrosatellitenstabilität bei 16 von 18 Patienten und MSI bei nur einem Patienten. Auch diese Ergebnisse waren überraschend, da andere Autoren bei mit dem Muir-Torre-Syndrom assoziierten Talgdrüsenkarzinomen überwiegend MSI und nicht MSS festgestellt hatten (vgl. 1.2.3). Insgesamt lässt sich durch die MSI-Analyse dieser beiden Loci also die Aussage treffen, dass nur einer der 18 Patienten als hochgradig mikrosatellitenistabil eingestuft werden kann, während die übrigen 16 Patienten sich als mikrosatellitenstabil erwiesen. Eine Probe konnte nicht amplifiziert und analysiert werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die MSI-Analysen einzelner Patienten.



Abbildung 37 MSI Prüfung Pat.20

Erläuterung:

Zu erkennen sind die MSI-Analysen des als hochgradig mikrosateliteninstabil eingestuften Patienten. Am Locus D5S346 im Normalgewebe sieht man Heterozygotie, die durch unterschiedliche maternale und paternale Allele hervorgerufen wird (verschiedene Fragmentlängen). Hingegen zeigt das Tumorgewebe nur noch Homozygotie an diesem Locus. Es hat also ein Allelverlust (LOH) stattgefunden, der hier ein Indikator ist, für eine Deletion eines Teils (5q) des Chromosoms 5. Hier liegt auch das bei Kolonkarzinomen häufig mutierte APC-Gen (vgl. 4.1). Die monomorphen Marker BAT25 und BAT26 zeigen MSI.



Abbildung 38 MSI-Pr

MSI-Prüfung Patient 15

Erläuterung Abb. 15:

Die MSI-Analyse des Patientenmaterials Nr.15 zeigt bei den monomorphen Markern BAT25 und BAT26 sowohl im Tumor als auch im Normalgewebe nur eine Hauptbande (siehe Abb. 38 und 39). Die hier zusätzlich zur Bande des Tumorgewebes gezeigte Normalbande ist zur MSI-Statusbeurteilung nicht nötig und wird an dieser Stelle nur exemplarisch gezeigt. Weiterhin sind zwei polymorphe Marker, (vgl.3.3), D17S250 und D2S123 dargestellt. Ihre Beurteilung erfordert den direkten Vergleich von Tumor- und Normalgewebe, da sie in der Bevölkerung sowohl als homozygot als auch als heterozygot erscheinen können. Sie sind also polymorph. Beide Marker erscheinen im Vergleich von Normalgewebe gegen Tumorgewebe als gleichartig: sind also mikrosatellitenstabil. Dies bestätigten die Ergebnisse der Analyse der monomorphen Marker.

4.8.2 Ergebnisse der MSI-Analysen

Die 18 Talgdrüsenkarzinome (TDK), von denen mindestens 10 in die klinische Diagnose des MTS fielen (4.10.2), wurden anhand von zwei monomorphen Markern (BAT25, BAT 26) auf MSI hin untersucht. Monomorphe Marker sind innerhalb einer Population bezüglich ihrer Homo- oder Heterozygotät weitestgehend konstant. Abweichungen von dem vorherrschenden Bandenmuster müssen als Instabilität gewertet werden. Es entfällt also der bei polymorphen Markern notwendige Vergleich zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe. Es können somit Aussagen zur Mikrosatellitenstabilität (MSS) allein aus dem Tumorgewebe getroffen werden. Dafür sind die Marker BAT 25 und BAT 26 ausreichend (Bocker et al., 1997, Dietmaier et al., 1997). Dies war von Vorteil, da von einigen Patienten kein Normalgewebe zur Verfügung stand. Die MSI-Analysen der 19 Tumorproben ergaben folgende Ergebnisse:

Monomorphe Marker

Bei den monomorphen Markern konnte bei 16 von 18 Tumorproben MSI ausgeschlossen werden. Eine Tumorprobe wies hochgradige MSI auf (MSI-high) da hier beide monomorphen Marker BAT 25 und BAT 26 instabil waren, sich also in der Gelelektrophorese zwei Hauptbanden darstellten. Eine weitere Tumorprobe war nicht beurteilbar, da kein PCR-Produkt gebildet werden konnte. Im Einzelnen ließ sich für den Locus BAT 25 bei 12 von 18 TDK eine Instabilität ausschließen (MSS), 4 der 18 Proben waren nicht eindeutig interpretierbar, und bei einer Probe ließ sich kein PCR-Produkt nachweisen. Hingegen wies eine Tumorprobe MSI auf (Patient Nr. 20). Für den Locus BAT 26 konnte in 16 von 18 Tumorproben eine MSI ausgeschlossen werden, ein TDK wies MSI auf (Patient Nr. 20), und bei einer Probe war kein PCR-Produkt feststellbar.

Polymorphe Marker

Polymorphe Marker sind solche, die in einer Population sowohl in homozygoter Form als auch in heterozygoter Form vorkommen. In einem mikrosatelliteninstabilen Individuum dieser Population kommt jedoch nur eine Ausprägung vor: entweder Homozygotie oder Heterozygotie. Verliert eine Zelle jedoch ein maternales oder paternales Allel dieses Locus, so kann es zum Verlust der Heterozygotie (LOH) kommen, die zweite Bande würde dann in der Gelelektrophorese verschwinden (siehe auch 1.3.10). Die polymorphen Marker stellten sich aufgrund der Probenqualität als schwer amplifizierbar dar, so dass die PCR hier nur an zweien von 18 Patienten möglich war:

Patient Nr. 15 erwies sich am Locus D2S123 und D17S250 sowohl im Normalgewebe als auch in der Tumorprobe als heterozygot, das Bandenmuster erschien gleichartig, so dass hier MSI und Allelverlust (LOH) ausgeschlossen werden können. Patient Nr. 20 zeigte am Locus D5S346 den Verlust eines Allels (LOH, vgl. 1.3.10) im Tumorgewebe, so dass nur eine Hauptbande zu sehen war, während das Normalgewebe sich als heterozygot darstellte. Dieser Locus liegt in unmittelbarer Nähe des Tumorsuppressor-Gens APC (siehe 1.4.3.6), welches somit von einer Mutation betroffen sein könnte. Die Beurteilung des Normalgewebes und Tumorpaares des Locus D2S123 erschien aufgrund der schlechten Bildqualität der Tumorprobe schwierig.

Zusammenfassend ließ sich also bei 16 von 18 der Tumorproben mittels Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse der monomorphen Marker eine MSI ausschließen, während sie sich bei nur einer Tumorprobe bestätigte (Patient Nr. 20). Die Beurteilbarkeit der polymorphen Marker erwies sich als schwierig, wobei zu zwei Patienten Aussagen getroffen werden konnten. Bei einem Patienten (Patient Nr.15) konnte MSI und LOH an zwei Loci ausgeschlossen werden, während der durch die monomorphen Marker als mikrosatelliteninstabil bestätigte Patient (Patient Nr. 20) zusätzlich im Locus D5S346 einen Allelverlust (LOH) zeigte, welches auf einen APC-Gen-Defekt hin-

weist. Aussagen zum Locus D2S123, der in Nachbarschaft zum MSH2- Gen, eines wichtigen Mismatch-Repair-Gens (MMR-Gen) liegt, erwiesen sich die Proben dieses Patienten jedoch als nicht eindeutig beurteilbar.

	Monomorp	Monomorphe Marker		Polymorphe Marker				
Patient	BAT 25	BAT 26	D 2S 123	D17 S250	D5S 346	MSI		
Nr.	MSI /MSS	MSI / MSS	MSI/LOH	MSI/ LOH	MSI/LOH	Gesamt		
1	-	-						
2	-	-						
3	-	-						
4		-						
5	-	-						
6	-	-						
7	-	-						
10	-	-						
11	-	-						
12	-	-						
13	-	-						
14	0	-						
15	-	-			0 0			
16	0	-						
17	0	-						
18	-	-						
19								
20	+	+		0 0	+ +	+		

4.8.3 Gesamtergebnistabelle MSI

Legende: + = positiv; - = negativ; O = keine eindeutige Aussage möglich,

MSI =mikrosatelliteninstabil MSS = mikrosatellitenstabil;

keine Eintragung = Nichtfunktionieren der PCR

4.9 Beta-Catenin-Untersuchung

4.9.1 Ergebnisse Hinf1-Verdau









Ergebnisse Restriktionsverdau

Erläuterung der vorangehenden Abbildungen:

Zu erkennen sind in den beiden Abbildungen Tumorproben der bezeichneten 7 Patienten. Es ist jeweils das CTNNB1, Exon 3 PCR-Produkt vor der Restriktionsspaltung (V) und nach der Restriktionsspaltung (R) zu sehen. Die jeweiligen Fragmentgrößen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Links ist der Molekulargewichtsmarker (MGM) aufgetragen. Wie unter 3.6 ausgeführt erkennt man die folgenden Fragmentgrößen:

Ausgangsfragment : 266 bp

Spaltprodukte : 159 bp, 100bp

Das 7 bp- Fragment ist im Agarosegel aufgrund seiner Größe nicht mehr darstellbar. Die schwache Bande unterhalb der 100 bp-Bande täuscht ein etwas verkürztes Spaltprodukt vor. Es handelt sich jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach um Primer-Dinucleotide. Durch eine Kontrolluntersuchung konnte im direkten Vergleich die Größe des Fragmentes der Doppelbande als 100 bp-Fragment bestätigt werden. Somit ist das kürzere Fragment der Doppelbande artefiziell.

Patient	Mutation
10	-
11	-
12	-
14	-
16	-
17	-
18	-
Gesamt	0

Übersicht über die Ergebnisse der HinfI-Restriktion

Der Restriktionsverdau brachte folgende Ergebnisse:

Bei 7 von 18 Patienten war genügend aufgereinigtes PCR-Produkt der CTNNB1-Exon 3- Amplifikation vorhanden, so dass ein Hinfl-Restriktionsverdau duchgeführt werden konnte. Wie in den Abbildungen zu erkennen, wurde das eingesetzte PCR-Produkt von 266 bp-Länge in drei Fragmente minderer Größen gespalten: 159 bp, 100 bp, 7 bp. Im Falle einer Mutation im untersuchten Genbereich hätte sich die Länge und Anzahl der Spaltprodukte des Restriktionsverdaus verändert. Das Screening auf die häufige Mutation im Exon 3, Codon 33 des Beta-Catenin-Gens (CTNNB1) erbrachte jedoch keine derartigen Hinweise. Bei dieser Mutation ist anstelle der Abfolge "tet" ein "tat" durch Punktmutation in diesem Bereich aufgetreten. Somit vermag das Hinfl-Enzym diese Stelle nicht mehr zu erkennen (vgl.3.6). Das hat zur Folge, dass kein 7 bp-Fragment entsteht, sondern ein 107 bp-langes Fragment, welches sich in der Elektrophorese knapp oberhalb der 100 bp- Bande (Pfeil) dargestellt hätte (vgl. 4.8).

4.9.2 Sequenzierreaktion



AC GT AC GTACGT N-Ko Sw-48 10T

Abbildung 41 Ergebnisse Sequenzierung R, Normal/ Tumorkontrollen sowie Probe 10T

Ergebnisse Sequenzierung

Die Sequenzierung des CTNNB1-Locus, Exon 3 wurde an fünf verschiedenen Tumorschnitten von den insgesamt 18 Patienten durchgeführt. Exemplarisch ist in der Abbildung die Sequenzierung an Patient Nr. 10 dargestellt.

Links daneben ist die entsprechende Negativkontrolle (Normalgewebe, N-Ko) bzw. die Positivkontrolle der Kolonkrebszelllinie "SW-48" aufgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung waren nicht eindeutig zu beurteilen. Bei der nicht mutierten Kontrolle (Negativkontrolle) erscheint in Exon 3, Codon 33 (Pfeil) in mittlerer Codon-Position ein "g" (siehe N-Ko.). In der Sequenzierung des Patienten Nr. 10 erscheint als zusätzliche schwache Bande (Pfeil) im Codon 33, Exon 3 ein "t". Diese könnte ein Hinweis auf Mutationen in diesem Bereich sein, ist jedoch eher artefiziell, da die Banden nicht eindeutig zu beurteilen waren. Wie bei der Positivkontrolle (SW 48) zu erkennen ist, ist hier im Exon 3, Codonposition 33 an zweiter Stelle das "g" durch ein "t" ersetzt (Pfeil). Dies ist als Punktmutation von "g" zu "t" zu betrachten. Bei den gezeigten Sequenzierungen handelt es sich um reverse Sequenzierungen , die sich also nicht auf den + Strang, sondern auf den –Strang beziehen, somit erscheint statt der im +Strang zuerkennenden "c" zu "a"-Mutation in dieser reversen Sequenzierung des –Stranges eine "g" zu "t"-Mutation.

Patient	Mutation
1	-
2	-
6	-
10	-
17	-
Gesamt	0

Erläuterung:

Wie exemplarisch an Patient Nr.10 erläutert, ergaben sich u.a aufgrund der schlechten Probenqualität und geringen Menge Probleme der Beurteilbarkeit der Sequenzierungen. Es konnte jedoch an den fünf untersuchten Proben keine Mutation im untersuchten Genbereich festgestellt werden, welches somit die Ergebnisse des Restriktionsverdaus unterstützte.

4.10 Klinische Daten

4.10.1 Epidemiologische Struktur des Patientengutes

Insgesamt handelt es sich um 18 Patienten. Der älteste Patient war bei Erst-Diagnosestellung 83 Jahre alt und der jüngste 25 Jahre. Das Durchschnittsalter betrug 61,7 Jahre, der Altersgipfel liegt zwischen 61-70 Jahren.

Geschlechterverteilung : zu gleichen Teilen männlich und weiblich

Lokalisation des Hauttumors als Erstmanifestation:

17 mal Oberlid, 3 mal Unterlid. Die rechte Seite war 16 mal betroffen

Extradermaler Tumor gesichert bei 10 Patienten. Bestehend aus drei mal kolorektalem Karzinom, zwei mal Bronchialkarzinom, einem hepatozellulären Karzinom, einem Teratokarzinom des Hodens, einem Magenkarzinom, einem Nierenzellkarzinom, einem Prostatakarzinom

In sechs Fällen trat der extradermale Tumor vor dem Talgdrüsenkarzinom auf.
4.10.2 Patientenbezogene Daten

Patient Nr.	Interne Nr.	Interne Nr.	Erstmani-	Erstmani-	Zweit-	Zweitmani-
			festation	Festations-	Manifestation	Festations-
				Alter		Alter
1	8298A					
2	9214C	9472A	TDK	83	Bronchial-Ca	87
3	9616A					
4	9740T					
5	16331B		Hoden-	25	TDK	38
			Terato-Ca			
6	16521		TDK	58	Hepatozell.Ca	64
7	17271		TDK	67	Nierenzell Ca	78
8	nur Norm	algewebe	vorhanden			
9	nur Norm	algewebe	vorhanden			
10	18750A					
11	18920		TDK	44	Magen Ca	66
12	19198D					
13	22432		TDK	67	Prostata Ca	73
14	22857		Kolorek-	?	TDK	73
			tales Ca			
15	26148TNT		Kolorek-	40	TDK	50
			tales Ca			
16	26916A					
17	27187B					
18	29255A		Prostata Ca	56	TDK	57
					Kolorekt.Ca	58
19	29258A					
20	30539A		Bronchial-	68	TDK	70
			Ca			

In der vorangehenden Tabelle ist der internen Numerierung die Patientennummer (1-20), bzw. das Erst,- und Zweitmanifestationsalter, und die Art der Manifestation zugeordnet. An den fortlaufend numerierten Tumorpatienten "8" und "9", von denen nur Normalgewebe vorhanden war, wurde keine Untersuchung vorgenommen.

Bei den Patienten 1, 3, 4, 10, 12, 16, 17 und 19 war ausschliesslich Tumormaterial der TDK vorhanden. Weitere Angaben bezüglich der o.g Kriterien konnten von der Universitäts-Augenklinik Erlangen, von wo das Probenmaterial stammte, jedoch nicht gemacht werden, sodass in der vorangehenden Tabelle bei diesen Patienten keine Eintragung vorgenommen wurde. Genauere Klinische Daten konnten jedoch zu den restlichen 10 Patienten gemacht werden. Die Angaben sind in der vorangehenden Tabelle vermerkt Sie ließen sich sämtlich dem Muir-Torre-Syndrom zuordnen (zur Definition vgl. 1.2.2).

5 Diskussion

5.1 Methodische Schwierigkeiten

5.1.1 MSI-Analyse (PCR)

Das Alter der Paraffinschnitte, die für diese Untersuchungen zur Verfügung standen, betrug zwischen 10-30 Jahren. Wenn Schnitte, die genomische DNA enthalten, nicht sachgerecht, oder über lange Zeiträume gelagert werden, so kann eine Fragmentierung der DNA eintreten, sei es durch physikalische oder durch chemische Einflüsse (DNAsen, Feuchtigkeit, etc.). Somit liegt der oft schwierige Verlauf der PCRs ebenfalls im Alter der Proben begründet. Einzelne PCRs mussten bis zu 10 mal wiederholt werden, ehe es zu einem verwertbaren, spezifischen PCR-Produkt kam.

<u>Unterschiedliche Fixierungen</u>. Es handelte sich bei allen verwendeten Proben um Paraffin-fixierte Schnitte. Unterschiedliche Protokolle bzw. Inhaltsstoffe und Verunreinigungen (z.B. Phenole) können als Inhibitoren der PCR bzw. DNA-abbauende Substanzen (DNAsen, Radikale,...) zum Ausfall eines spezifischen Amplifikationsproduktes führen.

In einem ersten experimentellen Teil wurde eine <u>Verdünnungsreihe</u> der Proben mit Verdünnungsstufen von bis zu 1:100 (d.h. von ca. 1-2ng/µl auf 0,01-0,02 ng(DNA)/µl im PCR-Ansatzvolumen durchgeführt. Bei einigen PCR-Ansätzen reichten die angewandten Verdünnungen von 1:100 schon aus, um die Konzentration eines vorkommenden Inhibitors soweit zurückzudrängen, dass die PCR ungestört ablaufen konnte. Bei der Mehrheit der Proben war dies jedoch nicht der Fall, und so ist die zum Teil sehr inhomogene Verteilung von funktionierenden PCR-Ansätzen auch zu erklären.

<u>Durch erneutes Ausfällen</u> der DNA und nachfolgendes Lösen in bi-destilliertem Wasser wurde versucht, die Wirkung des Inhibitors abzuschwächen. Diese Aufreinigung blieb aber weitestgehend ohne Erfolg, wie am Ausfall zahlreicher PCR-Reaktionen zu sehen war.

Erst die <u>Senkung der DNA-Konzentration</u> auf ein 2.000 -10.000stel der anfänglich eingesetzten Ausgangskonzentration brachte den gewünschten Erfolg, also die spezifischen Amplifikation der untersuchten Loci. Die Konzentrationen der genomischen DNAs befanden sich in Bereichen, die so gering waren, dass sie einer Anzahl von wenigen Kopien des untersuchten DNA-Abschnittes entsprachen.

Prinzipiell können gerade bei den sehr geringen Konzentrationen der eingesetzten DNAs, auch Verunreinigungen des Probenmaterials mit DNA anderer Herkunft eine Rolle spielen.

Ursachen hierfür können sein:

-Mikrospritzer beim Öffnen der Patienten-Proben-Gefäße oder der Kontroll-Gefäße

-DNA aus z.B. Hautzellen des Untersuchers. Die hohen Temperaturen bei der PCR reichen schon aus,

um genetisches Material aus den versehentlich in die Ansätze geratenen Zellen freizusetzen.

-DNA aus anderen Quellen

5.1.2 Amplifikation des Exon 3 des Beta-Catenin-Gens (CTNNB1)

5.1.2.1 PCR

Aufgrund der bereits in der Amplifikation der repetitiven Sequenzen zur MSI-Analyse im ersten Teil der Arbeit gemachten Erfahrungen bezüglich der Optimalbedingungen, konnten nahezu alle Proben am Locus CTNNB1 amplifiziert werden. Als zusätzliches Problem traten jetzt jedoch unspezifische Banden (Schmierbanden) auf. Um dieses Problem zu beherrschen, wurde ein spezielles Verfahren bei der Amplifizierung angewandt: Dabei wurde das PCR-Produkt aus einer ersten PCR in einen neuen PCR-Ansatz gegeben (1.Verfahren) In einem zweiten Verfahren wurde die spezifische Bande der ersten PCR im Agarosegel mit einem Zahnstocher angestochen und anhaftende DNA des spezifischen PCR-Produktes so erneut amplifiziert (Impfung).

Das erste Verfahren brachte nicht den gewünschten Erfolg, d.h. es war keine spezifische Bande nachweisbar.

Das zweite Verfahren im Zusammenhang mit einer veränderten Mg2+-Konzentration von Mg = $1,5\mu$ l/50 μ l-Ansatz ermöglichte die Amplifikation, so dass spezifische Banden nachweisbar waren.

5.1.2.2 Restriktionsverdau (R-Verdau)

Der Restriktionsverdau ergab als Screening-Methode auf Mutationen im Exon 3 des CTNNB1-Gens keine Hinweise auf Mutationen.

5.1.2.3 Sequenzierreaktion

Der Restriktionsverdau ergab keine Hinweise auf Mutationen. Die Sequenzierung bestätigte diese Situation. Allerdings fiel die Beurteilbarkeit schwer. Ursache hierfür war die zu geringe Menge des spezifischen Fragmentes . Insbesondere durch das Verfahren des Herausschneidens der Banden und die Aufreinigung im JETSORB-Verfahren wird eine Mindestmenge an eingesetztem Amplifikationsprodukt beansprucht, da bei diesem Verfahren ein hoher Anteil von anfänglich eingesetzter DNA verloren geht. Außerdem erschwerten "Blöcke" von Schmierbanden die Beurteilbarkeit .

5.2 MSI-Analyse und β -Cateninuntersuchung vs. Klinik

Mindestens 10 von 18 Patienten fallen unter die klinische Diagnose des Muir-Torre-Syndroms, wobei das Talgdrüsenkarzinom in 5 Fällen die Erstmanifestation und in ebenfalls 5 Fällen die Zweitmanifestation darstellte. Zu der Klinik der restlichen Patienten ließ sich aufgrund der Aktenlage und des langen Zurückliegens der Erkrankungen keine eindeutige Aussage bezüglich der Erstmanifestation treffen. Die Erstmanifestation trat im Durchschnitt verhältnismäßig spät auf, der Altersgipfel liegt zwischen 61-70 Jahren, das Durchschnittsalter beträgt 61,7 Jahre. Nur ein Patient war jünger als 40 Jahre, aber auch er gehörte nicht zum HNPCC-Syndrom, da die für HNPCC untypische Kombination von TDK mit einem Terratokarzinom des Hodens dagegensprach. Bei 16 Patienten konnte eine MSI ausgeschlossen werden, wohingegen ein Patient als mikrosatelliteninstabil bezeichnet werden musste, eine Aussage zu einer β -Catenin-Mutation konnte bei diesem Patienten leider nicht getroffen werden. Allerdings erwiesen sich 7 Patiententumorschnitte als im Hinf1-Verdau nicht beta-cateninmutationsverdächtig. Auch eine direkte Sequenzierung ergab keine auffälligen, eindeutig beurteilbaren Ergebnisse.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es sich bei dem untersuchten Talgdrüsenkarzinomen überwiegend um mikrosatellitenstabile Tumoren handelt, die klinisch dem MUIR-TORRE-Syndrom zugeordnet werden können und wahrscheinlich in überwiegender Anzahl keine Mutationen im CTNNB1-Gen aufweisen.

5.3 Aussagen und Einschränkungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die sehr selten vorkommenden Talgdrüsentumoren von 18 Patienten auf MSI und Beta-Catenin-Mutationen untersucht.

MSI ist allgemein ein Hinweiszeichen auf einen MMR-Defekt, der bei dem HNPCC sehr früh innerhalb der Tumorprogression auftritt. Diesem sind weitere Mutationen nachgeschaltet, beispielsweise Mutationen im APC, K-ras, p53-Gen. Tritt ein kolorektales Karzinom zusammen mit einem Hauttumor wie beispielsweise dem Talgdrüsenkarzinom auf, so spricht man vom MTS. Die unabhängig voneinander gesammelten 18 Proben, von denen eine nicht amplifizierbar war, wiesen überwiegend (16 von 18) keine MSI auf, obwohl sie größtenteils mit extradermalen bzw. kolorektalen Karzinomen assoziiert waren. D.h. also, dass ein MMR-Defekt ursächlich bei der Karzinogenese keine (entscheidende) Rolle gespielt haben wird. Dies ist neu. Kruse et al., 1998 beschrieben MTS-Patienten, die zu 100% MSI in mindestens einem dermalen oder extradermalen Tumor aufwiesen. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass in den hier vorgenommenen MSI-Prüfungen praktisch ausschließlich Mononukleotid-Repeat-Loci, namentlich BAT25 und BAT26 ein auswertbares Ergebnis lieferten. Nur ein Vertreter des Patienten-Kollektive, Patient Nr. 20, wies hohe MSI auf. Er erkrankte an einem Talgdrüsenkarzinom und zwei Jahre darauf an einem Bronchialkarzinom und ist somit ein MTS-Patient. Aufgrund der bisher in der Literatur beschriebenen Fälle wäre zu erwarten gewesen, dass ein Großteil der untersuchten Patienten ebenfalls MSI-positiv gewesen wäre. Das Gegenteil war jedoch der Fall. 16 von 18 Patienten mussten als MSS eingestuft werden, da BAT25 und BAT26 keine Instabilität zeigten. Dem an kolorektalen Tumoren beschriebenen Modell der Interaktion des Tumorsuppressor-Gatekeeper-Gens APC und des Protoonkogens Beta-Catenin zufolge (vgl. 1.4.4.3), können Mutationen sowohl an einer oder mehreren Bindungsdomänen des APCs als auch Mutationen im Beta-Catenin dazu führen, dass das Zellwachstum durch unverhältnismäßig hohe Konzentrationen an Beta-Catenin außer Kontrolle gerät. Bei Kolonkrebszelllinien sind Beta-Catenin -Mutationen mit einer Häufigkeit von bis zu 26% nachgewiesen worden (Ilyas et al., 1997). Für Talgdrüsenkarzinome sind bisher keine Untersuchungen auf Beta-Catenin-Mutationen beim Menschen durchgeführt worden. Da ein MMR-Defekt somit überwiegend als nicht verantwortlich für die Talgdrüsenkarzinogenese angesehen werden kann, wurde im zweiten Abschnitt der Arbeit nach Mutationen im Beta-Catenin-Gen gesucht. Bei 7 von 7 ausgewählten Patienten des im Restriktionsverdau untersuchten Kollektives gab es keine Hinweise auf Mutationen im Beta-Catenin-Gen. Zusätzlich wurde noch versucht, eventuell vorhandene Mutationen in einer sogenannten "Mutation-Cluster-Region" bei 5 Patienten mittels direkter Sequenzierung genauer zu bestimmen . Die Beurteilbarkeit fiel aufgrund schwacher Signale schwer. Es ergab sich aber ebenfalls kein Anhalt für Mutationen im Beta-Catenin-Gen.

Des weiteren konnten Untersuchungen von Prof. Holbach und Mitarbeitern in Erlangen in diese Arbeit mit einfließen. Bei einer Auswahl von 6 der in dieser Arbeit auf MSI und teilweise auf Beta-Catenin-Mutationen getesteten Patienten konnte bei einem Patienten, welcher MSI-positiv war im Tumorgewebe immunhistochemisch FHIT-Gen-Expression nachgewiesen werden. So auch in Normalkontrollen dieses Patienten. Hingegen wiesen 5 Talgdrüsenkarzinome mit MSS eine fehlende FHIT-Gen-Expression auf. FHIT ("Fragil histidine triad") ist protektiv gegen DNA-Doppelstrangbrüche. Es könnte also, falls es von einer Mutation betroffen ist, konstitutiv, die Mutationsrate erhöhen. Der Zusammenhang zwischen Fhit-Gen-Defekt und Hauttumoren wurde durch eine Arbeit von FONG et al., 2000 an FHIT-Knockoutmäusen nachgewiesen. Neben den Gastrointestinalen Tumoren traten zusätzliche Hauttumoren auf. Durch im Rahmen und auf Vorarbeit dieser Arbeit fußende Ergebnisse konnte also erstmals beim Menschen fehlende FHIT-Gen-Expression mit mikrosatellitenstabilen Talgdrüsentumoren in Verbindung gebracht werden.

Zusammenfassend hat diese Arbeit das Ergebnis gebracht, dass die untersuchten Talgdrüsenkarzinome in über 90 % mikrosatenlitenstabil sind (MSS) auf der Basis der beiden getesteten Mononucleotid-Repeats. Nur ein Patient wies in seinem TDK eine hohe MSI auf, die auch in den polymophen CA-Markern bestätigt werden konnte. Ob es sich hierbei um einen HNPCC- Patienten handelt ist fraglich, da bei ihm ein Brochialkarzinom als Erstmanifestation erst im Alter von 68 Jahren auftrat, das TDK schließlich zwei Jahre später manifest wurde (Amsterdam-Kriterien, 1.3.3). Es ist jedoch vorstellbar, dass sich die MSI dieses Patienten auf der Basis ausschließlich somatischer Mutationen ergeben hat.

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse bilden einen kleinen Baustein im Mosaik der höchst komplizierten und multifaktoriellen Karzinogenese der untersuchten Tumoren und bieten eine weitere Möglichkeit, in der Zukunft diese besser zu verstehen und dementsprechend zu behandeln.

6 Literatur

Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA: Life-time risk of different carcinoma in HNPCC syndrome, Int J Cancer 64 (1995) 430-33

Ackerman AB Neoplasms with sebaceous differentiation, Lea and Fibiger, Philadelphia, 1994

Akhtar S, Oza KK, Khan SA, Wright J: Muir-Torre syndrome: case report of a patient with concurrent jejunal and ureteral cancer and a review of the literature. J Am Acad Dermatol 41 (1999) 681-6

Altmeyer P: Bildlexikon Dermatologie. 2.Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1995, S. 885

Bailet JW, Zimmerman MC, Arnstein DP, Wollman JS, Mickel RA: Sebaceous carcinoma of the head and neck. Case report and literature review. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 118 (1992) 1245-9

Behrens J, von Kries JP, Kuhl M: Funktional interaction of beta-catenin with transcription factor LEF-1. Nature 382 (1996) 638

Bocker T, Diermann J, Friedl W, Gebert J, Holinski-Feder E, Karner-Hanusch J, von Knebel-Doeberitz M, Koelble K, Moeslein G, Schackert HK, Wirtz HC, Fishel R, Ruschoff J: Microsatellite instability analysis: a multicenter study for reliability and quality control. Cancer Res 57 (1997) 4739-43

Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. Nature 13 (1987) 614-6 Boland CR: HNPCC. In: Kinzler W, Vogelstein B (Hrsg): Molekular genetics of human cancer. McGraw-Hill, New York, St.Louis, San Francisco, 1998, S.333

Bollag W, Holdener EE: Retinoids in cancer prevention and therapy. Ann Oncol 3 (1992) 513-26

Burgdorf WHC Tumors of sebaceous gland differentiation. In: farmer ER, Hood AF (Hrsg): Pathology of the skin. Appleton and Lange, Norwalk, 1990, S. 615-623

Classen, Diehl, Kochsiek: Innere Medizin. 4.Aufl. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1998, S.636-641

Cohen PR, Kohn SR, Kurzrock R: Association of sebaceous gland tumors and internal malignancy: the Muir-Torre syndrome. Am J Med 90 (1999) 606-13

De Potter P, Shields CL, Shields JA: Sebaceous gland carcinoma of the eyelids. Int Ophthalmol Clin 33 (1993) 5-9

Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J: Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. Cancer Res 57 (1997) 4749-56

Flasnoecker M, Zeitz M: Thiemes Innere Medizin, Thieme, Stuttgart, New York, 1999, S. 607-609

Fong LY, Fidanza V, Zabesi N, Lock LF, Siracusa LD, Mancini R, Siprashivili Z Ottey M, Marin SE, Druck T, McCue PA, Croce CM, Huebner K: Muir-Torre-like syndrome in Fhit-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 97 (2000) 4742-7

Garbe C, Dunner R, Kaufmann R, Tilgen W: Dermatologische Onkologie. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1997, S. 542-545 Giardiello FM, Offerhaus JG: Phenotype and cancer risk of various polyposis syndromes. Eur J Cancer 31A (1995) 1085-7

Gollnick H, Orfanos CE:

Theoretical aspects of the use of retinoides as anticancer agents. In: Marks R (Hrsg): Retinoids in cutaneous malignancy. Blackwell, Oxfort, 1991, S. 41-65

Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA: Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. Am J Med Genet 25 (1986) 473-6

Horenstein MG http:// emedicine.com/derm/topic 275.htm, Stand 02/2001

Ilyas M, Tomlison IPM, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF: Beta-Cateninmutation in cell lines established from human colorectal cancers. Proc Natl Acad Sci USA 94 (1997) 10330-10334

Jarvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P: Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Gastroenterology 108 (1995) 1405-11

Jass JR: Evolution of HNPCC. Int J Colorectal Dis 14 (1999) 194-200

Jass JR, Stewart SM: Evolution of HNPCC. Gut 33 (1992) 783-86

Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. Cancer Res 54 (1994) 5523-6

Kawanishi J, Kato J, Sasaki K, Fujii S, Watanabe N, Niitsu Y: Dysfunction of E-cadherin due to mutation of beta-catenin in a scirrhous gastric cancer cell line. Nippon Rinsho 53 (1995) 1590-4 Kinzler W, Vogelstein B: Molecular genetics of human cancer. Mc Graw-Hill, New York, St. Louis, San Francisco, 1998, S. 567

Kinzler W, Vogelstein B, Colorectal Cancer. Cell 87 (1996) 159-170

Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, KishiN, Iwama T, Mori T, Koike M, Ushio K, Chiba M, Nomizu S, Konishi F, UtsunomiyaJ, Miyaki M. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. Gastroenterology 111 (1996) 307-17

Kruse R, Rütten A, Lamberti C: Muir-Torre Phenotype Has a Frequency of DNA Mismatch-Repair-Gene Mutations similar to That in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Familiers Defined by the Amstedam Criteria. Am J Hum Genet 63 (1998) 63-70

Lanspa ST, Lynch HT, Smyrk TC: Colorectal carcinoma in the Lynch syndrome- results of a colonoscopy screening program. Gastroenterology 8 (1990) 1117-22

Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S: Mismatch repair gen defects in sproadic colorectal cancers with microsatellite instability. Nat Genet 9 (1995) 48-55

Liu B, Parsons R, Papadopoulos N: Analysis of MMR genes in HNPCC. Nat Genet 8 (1996) 54-5

Lynch HT, Lanspa S, Smyrk T, Boman B, Watson P, Lynch J: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control, Part I. Cancer Genet Cytogenet 53 (1991) 143-60

Lynch HT, Smyrk T, Watson P, Lanspa SJ, Boman BM, Lynch PM, Lynch JF, Cavalieri J: Hereditary colorectal cancer. Semin Oncol 18 (1991) 337-66 Lynch HT, Lynch PM, Pester J, Fusaro RM: The cancer family syndrome: rare cutaneous phenotypic linkage of Torre's syndrome. J.A.M.A 141 (1981) 607-11

Markowitz S, Wang J, Myeroff L: Inactivation of type II TGFB-receptor in coloncancer cells with MSI. Science 268 (1995) 1336

Mecklin JP: Frequency of hereditary colorectal carcinoma. Gastroenterology 93 (1987) 1021-5

Miller DL, Weinstock MA: Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. J Am Acad Dermatol 30 (1994) 774-8

Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y: Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. Hum Mol Genet 1 (1992) 229-33

Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M: XTcf- transcription factor mediates beta-catenin induced axis formation in xenopus embryos. Cell 86 (1996) 391

Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P: Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. Proc Natl Acad Sci U S A 92 (1995) 3046-50

Munemitsu S, Souza B, Muller O, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P: The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. Cancer Res 54 (1994) 3676-81

Omura EF

Paraneoplastic syndromes. In: Sams WM Jr, Lynch PJ (Hrsg) Principles and Practice of Dermatology. Chuchill Livingstone, New York, 1996, S. 247-55

Ozawa M, Engel J, Kemler R: Single amino acid substitutions in one Ca2+ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. Cell 63 (1990) 1033-8 Planck M, Wenngren E, Borg A, Olsson H, Nilbert M: Somatic frameshift alterations in mononucleotide repeat-containing genes in different tumor types from an HNPCC family with germline MSH2 mutation. Genes Chromosomes Cancer 29 (2000) 33-9

Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 329 (1993) 1982-7

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW: APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. NatureSep 359 (1998) 235-7

Prinzhorn F: Die Haut und die Rückbildung der Haare beim Nackthunde. Jenaische Zeitung Naturwiss 57/nf 50 (1920) 143-198

Rona M MacKie: Benigne und Maligne Erkrankungen der Haut. Hippokrates, Stuttgart, 1990

Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P: Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. Science 272 (1996) 1023-6

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P: Association of the APC gene product with beta-catenin. Science 262 (1993) 1731-4

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Biotechnology 24 (1977) 104-8

Schwartz RA, Torre DP: The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. J Am Acad Dermatol 33 (1995) 90-104 Smith KJ, Johnson KA, Bryan TM, Hill DE, Markowitz S, Willson JK, Paraskeva C, Petersen GM, Hamilton SR, Vogelstein B: The APC gene product in normal and tumor cells. Proc Natl Acad Sci U S A 90 (1993) 2846-50

Sterry W: Merk Checkliste Dermatologie und Venerologie. Thieme, Stuttgart, New York, 1992, S. 178

Stewart WM, Lauret P, Hemet J, Thomine E, Gueville RM: Multiple kerato-acanthomas and visceral carcinomas: Torre's syndrome. Ann Dermatol Venereol 104 (1977) 622-6

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 260 (1993) 816-9

Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM: The international collaborative group on HNPCC. Dis Colon Rect 34 (1991) 424-25

Wagener: Molekulare Onkologie. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart, New York, 1999, S.58-59,110, 135, 186-190, 209, 228

Yuasa Y: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Nippon Rinsho 58 (2000) 1396-9

Zhou XP, Hoang JM, Li YJ, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M, Lothe RA, Gleeson CM, Russell SE, Muzeau F, Flejou JF, Hoang-Xuan K, Lidereau R, Thomas G, Hamelin R: Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. Genes Chromosomes Cancer 21 (1998) 101-7

7 Anlagen CTNNB1-Gen, Exon 3

intro	on	2154>2218						
		/gene="CTNNB1"						
		/number=6						
1	cccctccctg	gcttttatta	ttacaactct	gtgctttttc	atcaccatcc	tgaatatcta		
61	taattaatat	ttatactatt	aataaaaaga	catttttggt	aaggaggagt	tttcactgaa		
121	gttcagcagt	gatggagctg	tggttgaggt	gtctggagga	gaccatgagg	tctgcgtttc		
181	actaacctgg	taaaagagga	tatgggtttt	ttttgtgggt	gtaatagtga	catttaacag		
241	gtatcccagt	gacttaggag	tattaatcaa	gctaaattta	aatcctaatg	acttttgatt		
301	aactttttt	agggtatttg	aagtatacca	tacaactgtt	ttgaaaatcc	agcgtggaca		
361	atggctactc	aaggtttgtg	tcattaaatc	tttagttact	gaattggggc	tctgcttcgt		
421	tgccattaag	ccagtctggc	tgagatcccc	ctgctttcct	ctctccctgc	ttacttgtca		
481	ggctaccttt	tgctccattt	tctgctcact	cctcctaatg	gcttggtgaa	atagcacaaa		
541	agccaccagc	aggaatctag	tctggatgac	tgcttctgga	gcctggatgc	agtaccattc		
601	ttccactgat	tcagtgagta	actgttaggt	gggttcccta	agggattagg	tatttcatca		
661	ctgagctaac	cctggctatc	atctgctttc	ttggctgtct	ttcagatttg	actttatttc		
721	taaaaatatt	tcaatgggtc	atatcacaga	ttctttttt	ttaaattaaa	gtaacatttc		
781	caatctacta	atgctaatac	tgtttcgtat	ttatagctga	tttgatggag	ttggacatgg		
841	ccatggaacc	agacagaaaa	gcggctgtta	gtcactggca	gcaacagtct	tacctggact		
901	ctggaatcca	ttctggtgcc	actaccacag	ctccttctct	gagtggtaaa	ggcaatcctg		
961	aggaagagga	tgtggatacc	tcccaagtcc	tgtatgagtg	ggaacaggga	ttttctcagt		
1021	ccttcactca	agaacaagta	gctggtaaga	gtattattt	tcattgcctt	actgaaagtc		
1081	agaatgcagt	tttgagaact	aaaaagttag	tgtataatag	tttaaataaa	atgttgtggt		
1141	gaagaaaaga	gagtaatagc	aatgtcactt	ttaccattta	ggataccaaa	tacttaggta		
1201	aatgctgaac	tgtggatagt	gagtgttgaa	ttaacctttt	ccagatattg	atggacagta		
1261	tgcaatgact	cgagctcaga	gggtacgagc	tgctatgttt	ccctgagaca	ttagatgagg		
1321	gcatgcagat	cccatctaca	cagtttgatg	ctgctcatcc	cactaatgtc	cagcgtttgg		
1381	ctgaaccatc	acagatgctg	aaacatgcag	ttgtaaactt	gattaactat	caagatgatg		
1441	cagaacttgc	cacacgtgca	atccctgaac	tgacaaaact	gctaaatgac	gaggaccagg		
1501	taagcaatga	catagctagc	tttttagtct	gctttgaagt	aaatgctcaa	ggggagtagt		
1561	ttcagaatgt	ctacccaata	ccagtacttg	aaaactaacg	atgtttctga	attcctgtat		
1621	tacaggtggt	ggttaataag	gctgcagtta	tggtccatca	gctttctaaa	aaggaagctt		
1681	ccagacacgc	tatcatgcgt	tctcctcaga	tggtgtctgc	tattgtacgt	accatgcaga		
1741	atacaaatga	tgtagaaaca	gctcgttgta	ccgctgggac	cttgcataac	ctttcccatc		
1801	atcgtgaggg	cttactggcc	atctttaagt	ctggaggcat	tcctgccctg	gtgaaaatgc		
1861	ttgggtaaga	aaacatgtca	gaatgcttga	agctaaaaag	tagaagagta	tactcacaat		
1921	atttctgatg	aggctttttt	cttcttccca	gttcaccagt	ggattctgtg	ttgttttatg		
1981	ccattacaac	tctccacaac	cttttattac	atcaagaagg	agctaaaatg	gcagtgcgtt		
2041	tagctggtgg	gctgcagaaa	atggttgcct	tgctcaacaa	aacaaatgtt	aaattcttgg		
2101	ctattacgac	agactgcctt	caaattttag	cttatggcaa	ccaagaaagc	aaggtaagag		
2161	aattattctt	tatgtggttt	tcatggagca	ttggacacct	ccagtgtcat	gtcattcc		

Thesen der Arbeit

- 1) Die untersuchten Talgdrüsenkarzinome lassen sich überwiegend dem Muir-Torre-Syndrom zuordnen
- 2) Die untersuchten Talgdrüsenkarzinome gelten überwiegend als mikrosatellitenstabil
- 3) Es ergaben sich keine Hinweise auf Mutationen im Beta-Catenin-Gen
- 4) Mikrosatellitenstabilität in den untersuchten Talgdrüsenkarzinomen ist mit fehlender FHIT-Gen-Expression positiv korreliert

Lebenslauf				
Geburtsort	Greven (Westf.)			
Geburtsdatum	06. März 1974			
Eltern	Renate Decker, geb. Reineck, Angestellte, Flughafen Münster-			
	Osnabrück			
	Heinz Decker, selbstständiger Kunstschmied- Schlossermeister			
Geschwister	Ralph, Assistenzarzt, Uniklinik, Kiel			
	Matthias, Diakon, Ev. Kirchengemeinde Burgsteinfurt			
Schulischer Werdegang	1980-84 Grundschule, Ladbergen			
	1984-90 Realschule, Greven			
	1990-93 Gymnasium Augustinianum, Greven			
Zivildienst	1993-94 Zivildienst, Kinderkrankenhaus, Norderney			
Hochschulstudium	1995 Studium der Medizin an der MLU Halle-Wittenberg			
	1997 Physikum, MLU Halle-Wittenberg			
	1998 1.Staatsexamen, MLU Halle-Wittenberg			
	1999 Auslandssemester Universität Granada, Spanien			

Eingereichte Publikationen:

American Journal of Ophthalmology

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, daß ich vor dieser Promotion keine Promotionsversuche, weder in Deutschland noch im Ausland unternommen habe.

Danksagungen

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Ballhausen, der diese Promotion ermöglicht hat.

Herzlicher Dank gilt außerdem meiner Anna, meinen Eltern, Ilka, Eric und Andreas für die Ermutigungen und Anregungen.