

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin 1
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Sektion Molekulare Gastroenterologische Onkologie
(Direktor: Prof. Dr. med. W. E. Fleig)

Molekulargenetische Untersuchungen zur Tumorgenese von Cholangiokarzinomen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Verteidigung am 13.10.2004

Gutachter: Prof. W. Ballhausen

Prof. A. Tannapfel

Prof. M. Hatzfeld

von Eileen Koch

geboren am 03.04.1979 in Halle

urn:nbn:de:gbv:3-000007474

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007474>]

für meine Eltern

Referat und bibliographische Beschreibung

Das Ziel der Arbeit war es, 19 intrahepatischen Cholangiokarzinome zum einen auf Mutationen im Exon 3 von β -Catenin und zum anderen auf Verlust der konstitutionellen Heterozygotie (LOH) am FHIT (Fragile Histidine Triad)-Genlocus mittels der Marker D3S1300 und D3S1234 zu untersuchen. Weiterhin sollte die DNA auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI), welche das Ergebnis eines defekten Mismatch-Reparatursystems ist, mit den Gensonden D2S123, D5S346, D17S250 BAT25 und BAT26 untersucht werden. Im ersten Teil der Arbeit wurde eine Restriktionsenzymanalyse und Sequenzierung des Exon 3 im β -Catenin-Gen durchgeführt. Zur LOH- und MSI-Analyse wurde die DNA von 19 Tumorpräparaten und 15 zugehörigen Proben von Normalgewebe mittels PCR amplifiziert und elektrophoretisch analysiert. Die DNA wurde aus 13 Paraffinschnitten affinitätschromatographisch isoliert. Spezifische genetische Alterationen im Exon 3 des β -Catenin-Gens wurden ausgeschlossen. Bei der FHIT-Genanalyse wurden insgesamt drei LOH-Ereignisse beobachtet. MSI konnte in den untersuchten Proben nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurden in zwei Tumoren LOH-Ereignisse am D5S346 Locus, der sich in unmittelbarer Nähe des APC-Gens befindet, beobachtet. Somit könnte die Inaktivierung des APC-Gens in einigen Fällen zur Entstehung des Cholangiokarzinoms beitragen. Die vorliegende Arbeit schließt somit Mutationen an β -Catenin -und Mismatch-Reparatur-Genen aus, die zur Karzinogenese von Cholangiokarzinomen hätten beitragen können. Die Ergebnisse deuten jedoch an, dass ein Funktionsverlust von APC und FHIT zumindest in einem Teil der Cholangiokarzinome als Ursache der Tumorentstehung gesehen werden muss. Weitere molekulargenetische Untersuchungen sollten andere bekannte Komponenten des Wnt-Signalweges als Ziel haben.

Koch, Eileen: Molekulargenetische Untersuchungen zur Tumorgenese von Cholangiokarzinomen.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 69 Seiten, 2002

MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR TUMORGENESE VON CHOLANGIOKARZINOMEN

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das intrahepatische Cholangiokarzinom	1
1.1.1	Einteilung, Häufigkeit und Symptomatik	1
1.1.2	Risikofaktoren und Pathologie des intrahepatischen Cholangiokarzinoms	1
1.1.3	Diagnose, Therapie und Prognose	3
1.1.4	Genetische Alterationen bei Cholangiokarzinomen	3
1.2	Das β-Catenin-Gen	4
1.2.1	Der Wnt/Wingless-Signalweg	4
1.2.2	Der APC-abhängige β-Catenin-Kernexport	6
1.2.3	Der Multi-Protein-Komplex zur Degradation von β-Catenin	6
1.2.4	Mutationen im β-Catenin	7
1.3	Das FHIT-Gen und LOH (Loss of heterozygosity)	7
1.4	Mikrosatelliteninstabilität (MSI)	9
1.4.1	Das Mismatch-Reparatursystem (MMR)	10
1.4.2	Klassifikation der MSI und verwendete Standardmarker	13
1.5	Fragestellung der Arbeit	13
2	Materialien	15
2.1	Reagenzien	15
2.2	Fertigkits	15
2.3	Lösungen (Puffer)	16
2.4	Geräte	16
3	Methoden	16
3.1	DNA-Isolierung aus Paraffinschnitten	17
3.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	18
3.3	PCR-Bedingungen	20
3.3.1	PCR-Analyse am β-Catenin-Gen (Exon 3)	20

3.3.2	LOH-Analysen am FHIT-Genlocus	20
3.3.3	MSI-Analysen	21
3.4	Restriktionsanalyse von DNA	22
3.5	Analytische Gelelektrophorese	23
3.5.1	Agarosegele	23
3.5.2	Polyacrylamidgele für Restriktionsanalysen	24
3.5.3	Polyacrylamidgele für die Sequenzierung	25
3.5.4	Polyacrylamidgele für LOH- und MSI-Analysen	26
3.6	Reinigung von PCR-Produkten	27
3.6.1	PEG-Fällung	27
3.6.2	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	27
3.7	Sequenzierung mittels PCR nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger	28
4	Ergebnisse	30
4.2	Restriktionsenzymverdau von PCR-Produkten des β-Catenin-Gens	30
4.3	Sequenzierung von β-Catenin-Sequenzen	32
4.4	LOH-Analyse am FHIT-Genlocus	34
4.5	MSI-Analysen	36
5	Diskussion	42
5.1	Hypothese zur Karzinogenese von Cholangiokarzinomen	42
5.2	Mutationen im β-Catenin- oder APC-Gen und die Stellung des E-Cadherins	44
5.3	Aktivierung/Inaktivierung von Wnt-Komponenten in Cholangiokarzinomen	46
5.4	Bedeutung der MSI für die Genese von Cholangiokarzinomen	48
5.5	Korrelation zwischen LOH am FHIT-Gen und dem p53-Mutationsstatus	49
5.6	Ausblick	51
6	Zusammenfassung	52
7	Literaturverzeichnis	53
8	Thesen	

Verzeichnis der Abkürzungen

ALM	Agarose Loading Mix
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovine Serum Albumin
CC	Cholangiocarcinoma
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dsh	Dishevelled
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FALM	Formamid Loading Mix
FHIT	Fragile Histidine Triad
Frz	Frizzled
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
IRD	Infra Red Dye
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LOH	Loss of Heterozygosity
MMR	Mismatch-Reparatursystem
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NES	Nuclear Export Sequences
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TCF	T Cell Factor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

Tris	Trishydroxymethylethyldiamin
UV	Ultraviolett
Wnt	Wingless

Einheiten:

bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
Da	Dalton
G	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
min	Minute
nm	Nanometer
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
V	Volt

Vorsätze:

k	10^3	(Kilo)
m	10^{-3}	(milli)
μ	10^{-9}	(mikro)
n	10^{-12}	(nano)
p	10^{-15}	(piko)

Nukleotide:

A Adenin

C Cytosin

G Guanin

T Thymin

1 Einleitung

1.1 Das intrahepatische Cholangiokarzinom

1.1.1 Einteilung, Häufigkeit und Symptomatik

Die intrahepatischen kleinen und mittleren Gallengänge, welche die Gallekanalikuli mit den extrahepatischen Gängen verbinden, entstehen entwicklungsgeschichtlich aus primitiven Hepatozyten (sog. Stammzellen), die sich zu Gallengangsepithelzellen umdifferenzieren. Die extrahepatischen Gallengänge entstehen aus dem Ductus hepatopancreaticus. Cholangiokarzinome (CCs) der intra- und extrahepatischen Gallengänge entstehen durch maligne Transformation (Wittekind & Tannapfel, 1999).

Das Cholangiom gehört zu den bösartigen Lebertumoren. Es ist ein primäres Leberkarzinom, welches von den intrahepatischen Gallengängen ausgeht und sich sowohl klinisch als auch morphologisch vom Leberzellkarzinom unterscheidet (Thomas, 1998).

Man unterscheidet zwischen intra- und extrahepatischen Karzinomen.

Die intrahepatischen Gallengangskarzinome machen etwa 5-10 % aller primären bösartigen Lebertumoren aus. Männer erkranken häufiger als Frauen. Das Durchschnittsalter liegt bei 55 Jahren (Wittekind & Tannapfel, 1999).

Symptome sind Gewichtsverlust, Inappetenz, schmerzlose, selten palpable Vergrößerung der Gallenblase (Courvoisiersches Zeichen), Fieber, Schüttelfrost, Ikterus, Pruritus, aber auch abdominelle Schmerzen (Hermann et al., 1994; Adler et al., 1999).

1.1.2 Risikofaktoren und Pathologie des intrahepatischen Cholangiokarzinoms

Bei etwa 20 % der CCs findet sich ein bindegewebiger Umbau (Kaczynski et al., 1996). Bei 60 % wird zusätzlich eine Cholelithiasis gefunden. Es wird eine Assoziation mit dem Leberparasiten *Clonorchis sinensis spec.* vermutet, da das CC häufiger in orientalischen Ländern sowie in Süd-Ostasien gefunden wurde. Weitere Risikofaktoren sind Colitis ulcerosa, PSC (Primär Sklerosierende Cholangitis), Persistenz von

Salmonella typhimurium, kongenitale Fibrose, polyzystische Lebererkrankung, Caroli-Syndrom (Ektasie der intrahepatischen Gallenwege infolge kongenitaler Dysplasie der Gallengangwand), Choledochuszysten, Thorotrast (intravenöses Röntgenkontrastmittel), orale Kontrazeptiva und andere Steroide (Wittekind & Tannapfel, 1999).

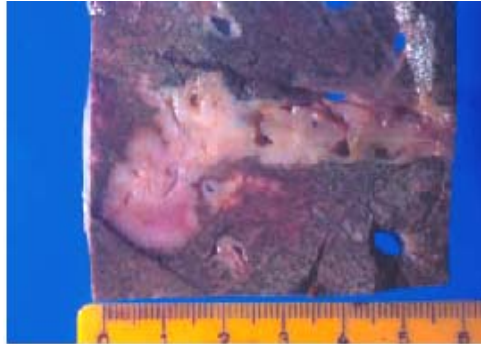


Abb. 1
Intrahepatisches Cholangiokarzinom (nach Tannapfel & Wittekind, 2001).

CCs sind solitäre, grau-weiße Herde (teilweise erkennt man Satelliten), die einen hohen Bindegewebsgehalt mit zentraler Narbenbildung aufweisen (siehe Abbildung 1). In der Nachbarschaft des Tumors können zystische Erweiterungen der Gallengänge vorkommen und das den Tumor umgebende Gallengangsepithel zeigt oft atypische Hyperplasien und Veränderungen, die als „Carcinoma in situ“ bezeichnet wurden. Die CCs sind meist Adenokarzinome, die eine drüsige Differenzierung zeigen, bestehend aus kleinen, kuboidalen epithelialen Zellformationen, die an Gallengangsepithel erinnern und Muzin sezernieren (siehe Abbildung 2) (Wittekind & Tannapfel, 1999). Der Tumor zeigt nur vereinzelt Gefäßeinbrüche, er metastasiert bevorzugt auf lymphogenem Wege (Thomas, 1998).

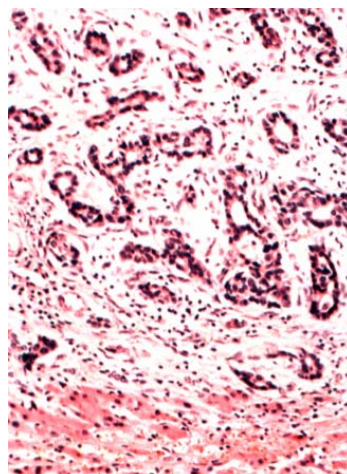


Abb. 2
Gallengangskarzinom:
Die Tumorzellen wachsen drüsiger und das Bindegewebe ist kräftig entwickelt (nach Thomas, 1998).

1.1.3 Diagnose, Therapie und Prognose

Die Laborwerte zeigen oft Befunde einer Cholestase mit Erhöhung der γ -Glutamyltranspeptidase und der alkalischen Phosphatase, während die Transaminasen entweder normal oder nur gering erhöht sind. Bei der Diagnostik von Rezidiven spielen die Tumormarker CA₁₉₋₉ (engl.: Carbohydrate Antigen) und CEA (Carcino-Embrionales Antigen) eine Rolle (Kubicka & Manns, 2000).

Bildgebende nicht-invasive Verfahren sind Sonographie, CT und MRT. Invasive Methoden zur Diagnose sind ERC (Endoskopisch Retrograde Cholangiographie), endoskopischer Ultraschall, intraduktaler Ultraschall (IDUS), Positronenemissionstomographie (PET) mit Hilfe eines Glukosederivats, das in Tumoren akkumuliert, PTC (Perkutane Transhepatische Cholangiographie) und MRCP (Magnetresonanz-Cholangio-Pankreatikographie) (Adler et al., 1999).

Behandelt werden die Karzinome operativ, mit einer Chemo- oder Strahlentherapie sowie adjuvant und supportiv (Drainage und Stents) (Kubicka & Manns, 2000).

Die 5-Jahres-Überlebensrate aller Gallenblasen- und Gallengangskarzinome liegt bei knapp 5 %, sie beträgt 0 % für nicht radikal resezierbare Patienten und knapp 5 % für komplett resezierte Tumoren. Bei Zufallsbefund nach einer Cholezystektomie überleben 15 % der Fälle fünf Jahre (Hermann et al., 1994). Die 5-Jahres-Überlebensrate nach formal kurativer Leberteilektomie mit Pfortaderresektion beträgt 65 % (Jonas et al., 1999).

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten CCs handelt es sich um intrahepatisch entfernte Adenokarzinome.

1.1.4 Genetische Alterationen bei Cholangiokarzinomen

Die am häufigsten beschriebenen genetischen Veränderungen in Cholangiokarzinomen betreffen die Gene: K-Ras, c-Myc, APC, C-erbB2, C-Met, Bcl2 und p53 u.a. (Voravud et al., 1989; Tannapfel et al., 2000; Suto et al., 2000; Boberg et al., 2000).

Cong et al. (2000) untersuchten 22 Cholangiokarzinome und fanden bei 19 Fällen genetische Veränderungen in den APC- (68,8 %), p53-(37,5 %), DCC- (Deleted in Colon Cancer) und OGG1- (8-Hydroguanine-specific DNA Glycosylase) Genen.

Tannapfel et al. (2000) beobachteten bei 15 von 41 (37 %) Cholangiokarzinomen Mutationen (Transition, Transversion) im p53-Gen. Auch Kang et al. (1999) konnten bei 40 Cholangiokarzinomen genetische Veränderungen in den APC-, p53- und K-Ras-Genen nachweisen, wobei 14 Fälle Mutationen im p53-Gen zeigten und in 10 Fällen eine Überexpression beobachtet wurde. LOH-Analysen am APC-Gen ergaben bei 4 von 17 (23,5 %) Fällen ein positives Ergebnis. Im K-Ras-Gen (Codon 12) wurde bei 9 Fällen eine Mutation entdeckt.

1.2 Das β -Catenin-Gen

Das β -Catenin-Gen, lokalisiert auf Chromosom 3p21.3-p22 (Kraus et al., 1994), ist ein Proto-Onkogen, das zum Onkogen aktiviert werden kann (Morin et al., 1997). Es besteht aus 16 Exons und erstreckt sich über 23,2 kb im menschlichen Genom.

Es kodiert für ein Protein mit dem Molekulargewicht 88 kDa (Ozawa et al., 1989). Das Protein besteht aus einer N-terminalen Domäne, welche die Phosphorylierungsstellen für die GSK3 β (Glykogen-Synthase-Kinase 3 β) enthält, aus einer C-terminalen Domäne, die für die Signaltransduktion benötigt wird, sowie aus einer zentralen Domäne, die aus 13 repetitiven Einheiten, den sogenannten Armadillo-Motiven, die 42 Aminosäuren lang sind, besteht.

Das β -Catenin ist ein bifunktionelles Protein, das an der Zelladhäsion mit beteiligt ist und im Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle spielt (Bienz, 1999).

β -Catenin bindet an E-Cadherin und α -Catenin. Cadherine sind Adhäsions- und Signalmoleküle. Verlust von E-Cadherin beeinflusst Morphogenese und invasives Wachstum. α -Catenin ist ein an Aktin bindendes Protein, welches E-Cadherin über β -Catenin mit dem Zytoskelett verbindet (Wagener, 1999).

1.2.1 Der Wnt/Wingless-Signalweg

Sekretiertes Wnt (Glykoprotein) bindet an den Frizzled-Rezeptor (Wodarz & Nusse, 1989). Dies führt zur Phosphorylierung von Dishevelled (Dsh) durch die Kasein-Kinase II (Polakis, 2000), welches mit Axin assoziiert und dadurch die Phosphorylierung spezifischer Substrate durch die GSK3 β hemmt (Itoh et al., 1998; Kishida et al., 1999;

Lee et al., 1999; Peters et al., 1999; Smalley et al., 1999). Spezifische Substrate der GSK3 β sind das β -Catenin, APC und Axin. Nicht-phosphoryliertes β -Catenin wird nicht degradiert, sondern akkumuliert im Zytoplasma und wandert in den Kern, wobei es wahrscheinlich die Bindung von Importin- β an Kernporen nachahmt, um in den Kern zu gelangen (Bienz, 1999; Yokoya et al., 1999; Fagotto et al., 1998). Im Kern bindet β -Catenin an Mitglieder der TCF/LEF-Familie (T Cell Factor, Lymphoid Enhancer Factor), bei denen es sich um Transkriptionsfaktoren handelt. Dadurch wird die Transkription nachgeschalteter Gene eingeleitet (siehe Abbildung 3) (Behrens et al., 1996).

Zielgene des β -Catenin-LEF/TCF-Signalwegs sind u.a. das c-MYC-Onkogen und das D1-Cyclin-Gen (He et al., 1998; Tetsu & McCormick, 1999). Deren unkontrollierte Genexpression führt zum Verlust der Zellzykluskontrolle.

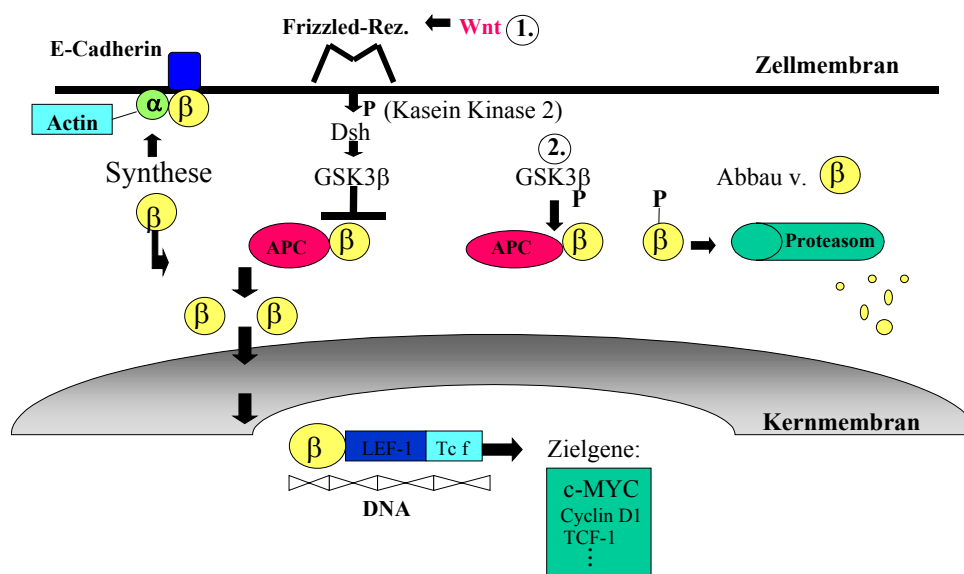


Abb. 3
Modell der posttranslationalen Regulation von β -Catenin. Durch das Wnt-Signal assoziiert Dishevelled mit Axin und hemmt die GSK3 β , wodurch β -Catenin nicht phosphoryliert wird, sondern akkumuliert und in den Kern wandert (1.). Ohne Wnt-Signal wird β -Catenin nach der Phosphorylierung durch die GSK3 β abgebaut (2.). Details im Text siehe oben.

1.2.2 Der APC-abhängige β -Catenin-Kernexport

APC (Adenomatöse Polyposis Coli) ist das Produkt des APC-Tumorsuppressorgens (Wagener, 1999). Es bindet β -Catenin sowohl im Zytoplasma als auch im Kern und transportiert es zur Plasmamembran. Dort bindet β -Catenin entweder an E-Cadherin, wenn es zugänglich ist, oder an Axin, mit dem es dann den Multi-Protein-Komplex bildet (Bienz, 1999).

APC enthält in seinem N-Terminus ein Kern-Export-Signal (NES, Nuclear Export Sequences), das auf einen CRM1/Exportin-abhängigen Transport hinweist. Leptomycin, ein spezifischer Hemmstoff des Transports, induzierte die Anreicherung von APC im Kern, wobei auch β -Catenin gehäuft im Kern gefunden wurde (Henderson, 2000). Inaktivierung dieses Kern-Export-Signals durch Mutation beeinträchtigt den β -Catenin-Export und damit dessen Abbau erheblich (Rosin-Arbesveld et al., 2000).

1.2.3 Der Multi-Protein-Komplex zur Degradation von β -Catenin

Der Komplex besteht aus Axin, APC, GSK3 β und β -Catenin, wobei Axin als Gerüstprotein agieren könnte (siehe Abbildung 4) (Bienz, 1999). Axin erleichtert die Phosphorylierung von β -Catenin und APC durch die GSK3 β . Durch die APC-Phosphorylierung wird die Affinität zu β -Catenin erhöht. Axin selbst wird auch phosphoryliert (Hart et al., 1998; Ikeda et al., 1998; Rubinfeld et al., 1996).

Axin enthält im C-Terminus die DIX-Domäne (siehe Abbildung 4), die verantwortlich ist für die Assoziation mit Dishevelled und für die Dimerisierung, welche für den Abbau von β -Catenin notwendig ist (Kishida et al., 1999; Sakanaka & Williams, 1999; Hsu et al., 1999; Smalley et al., 1999).

Überexprimiertes Axin kann trotz mutierten APC den Abbau von β -Catenin unter bestimmten Umständen induzieren (Behrens et al., 1998; Nakamura et al., 1998). Phosphoryliertes β -Catenin bindet an eine Untereinheit des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes und wird dadurch für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert (Kitagawa et al., 1999; Hart et al., 1999; Winston et al., 1999; Liu et al., 1999; Maniatis, 1999).

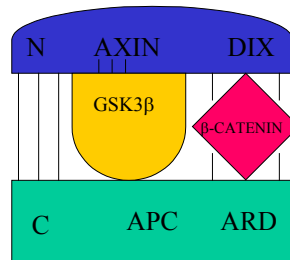


Abb. 4

Komplex bestehend aus Axin (N=N-Terminus, DIX=Domäne, die an Dishevelled bindet), APC (C=C-Terminus, APC=Domäne, die an Armadillo-Motive bindet), β -Catenin und GSK3 β . Axin ist ein Gerüstprotein, das die Phosphorylierung von APC, β -Catenin und sich selbst durch die GSK3 β erleichtert. Näheres im Text siehe oben.

1.2.4 Mutationen im β -Catenin

Mutationen in verschiedenen Komponenten des Komplexes, wie β -Catenin, Axin und APC können zur Akkumulation von β -Catenin und damit zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen.

Mutationen im β -Catenin selbst wurden bei Kolon-, Prostata-, Leber- und Endometriumkarzinomen, sowie bei Karzinomen der Ovarien und bei Medulloblastomen beschrieben (Palacios & Gamallo, 1997; Morin et al., 1997; Ilyas et al., 1997; Kitaeva et al., 1997; Iwao et al., 1998; Sparks et al., 1998; Voeller et al., 1998; Miyoshi et al., 1998; Fukuchi et al., 1998; Zurawel et al., 1998).

Dabei wurden Punktmutationen in Aspartat 32, Serin 33, Glycin 34, Serin 37, Threonin 41 und Serin 45 gefunden (Chan et al., 1999). Diese Aminosäuren stellen Phosphorylierungsstellen der GSK3 β dar, die alle in einer von Exon 3 kodierten Domäne liegen (Peifer et al., 1994; Yost et al., 1996; Orford et al., 1997).

1.3 Das FHIT-Gen und LOH (Loss of Heterozygosity)

Das FHIT-Gen (Fragile Histidine Triad) ist lokalisiert auf dem Chromosomenabschnitt 3p14.2. Es besteht aus zehn Exons, wobei nur Exon fünf bis neun für Proteine kodieren. Das Gen beinhaltet die FRA3B-Region (>600 kb) und die t (3;8) (p14.2; q24.1) Translokationsstelle, die mit dem familiären Nierenkarzinom assoziiert ist und zwischen Exon drei und vier liegt (siehe Abbildung 5). Die Länge der genomischen DNA des Gens beträgt 1 Mb und die Transkriptlänge ist 1,1 kb. Das Protein besteht aus 147

Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 16,8 kDa. Die Histidin-Trias, eine Domäne der HIT-Proteinfamilie, befindet sich auf Exon acht (Huebner et al., 1998a; Cohen et al., 1979; Ohta et al., 1996; Barnes et al., 1996; Lima et al., 1997).

In vitro ist das Protein eine Diadenosin 5', 5''- P¹, P³ Triphosphathydrolase, die ADP und AMP produziert. Das zentrale Histidin der Trias (H96) ist essentiell für die Hydrolaseaktivität. Weiterhin wird eine Interaktion mit dem Mikrotubulus-System (Funktion bei Zellteilung und Zellproliferation) diskutiert. Seine in vivo Funktion ist unbekannt (Barnes et al., 1996; Lima et al., 1997; Chaudhuri et al., 1999). Das FHIT-Gen ist ein Tumorsuppressorgen, dessen Verlust oder Inaktivierung zur Entwicklung von Tumoren oder zur malignen Progression führt (Sozzi et al., 1998). Das Tumorsuppressor-Signal wird wahrscheinlich durch den Enzym-Substrat-Komplex vermittelt. Die Triphosphathydrolase ist nicht an der Tumorsuppressoraktivität beteiligt (Huebner et al., 1998b).

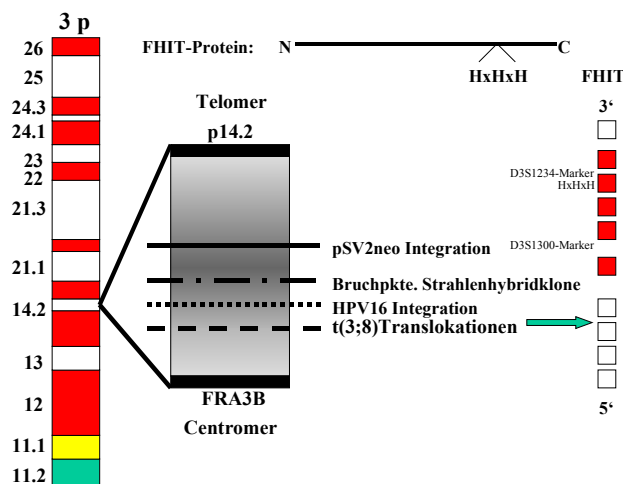


Abb. 5
Die FRA3B/FHIT-Region in der Chromosomen-Bande 3p14.2. Die fragilen Stellen sind schattiert dargestellt. Rechts sind die 10 Exons (weiß für nicht kodierende und rot für kodierende Exons) zu sehen. Details im Text siehe oben.

Die FRA3B-Region ist extrem anfällig für genetisches Rearrangement. Aphidicolin-behandelte (Hemmung der DNA-Polymerase) Hybride wurden mit exogener Plasmid-DNA transfiziert und die DNA wurde bevorzugt in die Region 3p14.2 integriert (Rassool et al., 1991). Besonders empfindlich reagiert diese Region auf Umweltkarzinogene wie Zigarettenrauch und Asbest (Nelson et al., 1998).

Die höchste Expressionsrate von FHIT-Transkripten und dem Protein wurde in Epithelzellen und Epithelgewebe beobachtet (Ohta et al., 1996; Druck et al., 1997).

Deletionen und veränderte Transkripte wurden in verschiedenen Tumorarten gefunden (Lunge, Brust, Hals-Rachen, Gastrointestinaltrakt, Ösophagus und Cervix) (Huebner et al., 1997).

Die FHIT-Inaktivierung wird durch Deletion beider FHIT-Allele verursacht und durch Fehler im Reparatursystem sowie durch Doppelstrangbrüche infolge von Karzinogendisposition getriggert. Deletionen sind häufiger als Punktmutationen (Druck et al., 1997; Inoue et al., 1997).

Loss of Heterozygosity (LOH) wird definiert als kompletter oder teilweiser Verlust von einem chromosomalen Locus eines Tumorsuppressorgens (Piao et al., 1997). Ein LOH lässt sich am besten beurteilen, wenn das Gen oder der benachbarte Marker im heterozygoten Zustand vorliegt, der durch Fragmente unterschiedlicher Größe typisierbar ist. Der Unterschied in den Intensitäten beider Allele im Tumorgewebe muss dann größer als 50% sein, während die Signale im Normalgewebe gleich intensiv sind (Gramantieri et al., 1999). Bei verschiedenen Tumorentitäten ist LOH am FHIT-Genlocus ein früher Schritt in der Tumorentstehung (Noguchi et al., 1999).

1.4 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

In Tumoren kommen gehäuft genetische Veränderungen vor sowohl Sequenzveränderungen durch Basenaustausch, Deletion und Insertion als auch Chromosomenzahlveränderungen (Polyploidie und Aneuploidie), Translokationen und Amplifikationen (Lengauer, 1998).

Mikrosatelliten sind tandemartige repetitive Sequenzen. Sie bestehen meist aus (CA)_n-Repeats (Sequenzwiederholungen), es kommen aber auch Repeats aus drei und vier Nukleotiden vor (Wagener, 1999). Sie bestehen aus 10 bis 60 Kopien (Beckmann & Weber, 1992; Litt & Luty, 1989) und treten ungefähr jedes 50-100ste Basenpaar auf (Saletti et al., 2001). Sie sind über das gesamte Genom verteilt und machen mehr als 1 % der DNA aus. Mittels PCR lassen sie sich amplifizieren (Wagener, 1999). Einige dieser Mikrosatelliten sind polymorph, was auf die Frequenz von „Strang slippage“ Ereignissen (Fehler) während der Replikation und auf die Wirksamkeit des Mismatch-

Reparatursystem (MMR) zurückzuführen ist (Levison & Gutman, 1987; Sia et al., 1997). Ihre Mutationsrate liegt zwischen 10^{-6} und 10^{-2} pro Generation und ist signifikant höher als Basenaustauschraten (Schlötterer, 2000).

Mikrosatelliten kodieren meist nicht für Proteine, ihre exakte Funktion ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass sie direkt an der Genregulation beteiligt sind oder indirekt als Hotspots von Instabilitäten im Rekombinationsprozess agieren (Saletti et al., 2001).

Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bedeutet eine Verlängerung (Expansion) oder Verkürzung (Kontraktion) dieser repetitiven Elemente aufgrund eines basalen Defekts in Reparaturmechanismen. Die veränderte Länge repetitiver Sequenzen kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass sich im Verlauf der Replikation der neu-synthetisierte gegen den abgelesenen DNA-Strang im Bereich von DNA-Repeats verschiebt. In einem neu gebildeten Strang, der in 5'-Richtung zurückrutscht, resultiert eine Insertion, bewegt sich der Strang in 3'-Richtung, ergibt sich eine Deletion. Die nicht-gepaarten DNA-Basen werden normalerweise durch das MMR erkannt und der Abschnitt wird repariert, wenn dies nicht der Fall ist, resultieren Expansionen und Kontraktionen. Das kann auch durch ungleiches Crossing-over oder ungleichen Austausch zwischen Schwester-Chromatiden möglich sein (Wagener, 1999).

1.4.1 Das Mismatch-Reparatursystem (MMR)

Das Mismatch-Reparatursystem (MMR) verhindert die Entstehung von Mutationen aus Basenfehlpaarungen und kleineren nicht-gepaarten DNA-Schleifen (engl. loops), ferner verhindert es die Rekombination nicht-homologer DNA-Stränge (Lindahl et al., 1997; Modrich, 1997; Peltomäki & de la Chapelle, 1997).

Zuerst wurde das MMR an *E.coli* und Hefen aufgeklärt. In Säugerzellen gibt es drei Proteine, die an der primären Erkennung von Basenfehlpaarungen bis zu vier Basen beteiligt sind: MSH2, MSH3 und MSH6, wobei MSH für „MutS Homolog“ steht (MutS in *E.coli*). MSH6 ist ein „G/T Binding Protein (GTBP)“. Diese drei Proteine lagern sich zu zwei verschiedenen Heterodimeren zusammen. MSH2 und MSH6 bilden den MutS α -Komplex, der bevorzugt an Basenfehlpaarungen von 1-2 bp bindet. MSH2 und MSH3 bilden den MutS β -Komplex, der wiederum Fehlpaarungen von 2-4 bp erkennt (siehe Abbildung 7).

Beim Menschen gibt es weitere 16 Gene, die für MutL-ähnliche Proteine kodieren. Das sind MLH1, PMS1-8 und PMSR1-7, wobei sich MLH von „MutL Homolog“ und PMS von dem Namen des „Post Meiotic Segregation increased“ Hefeproteins ableiten (siehe Abbildung 6) (Wagener, 1999). PMSR ist die Abkürzung für „PMS-Related“ (Peltomäki & de la Chapelle, 1997). MLH1 und PMS2 bilden den MutL α -Komplex, der sich nun entweder an MutS α oder - β am DNA-Doppelstrang anlagert (siehe Abbildung 7).

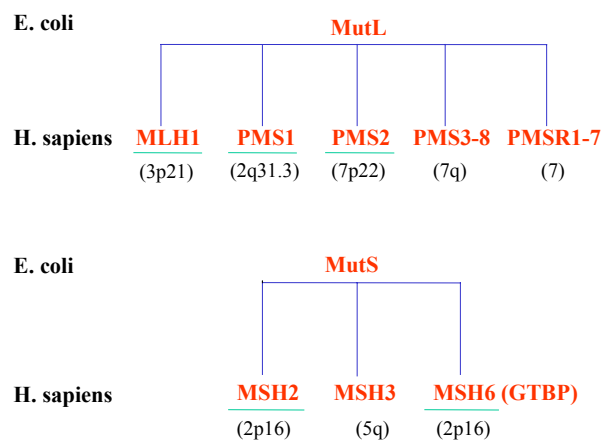


Abb. 6
Mitglieder der MutL und MutS-Familien von Mismatch-Reparatur-Genen bei *E. coli* und beim Menschen. Die chromosomale Lokalisation der Gene ist in Klammern angegeben. Gene, in denen Mutationen HNPCC verursachen können, sind unterstrichen (nach Peltomäki & de la Chapelle, 1997). Details im Text siehe oben.

Wie die Exzision der fehlerhaften DNA weitergeht, ist bei Säugerzellen noch nicht ausreichend geklärt. Es ist aber bekannt, dass MSH2 und MHL1 essentiell für die Funktionsfähigkeit des MMR sind.

Bei *E.coli* schneidet die Endonuklease MuthH den nicht-methylierten DNA-Strang 5' des G-Restes in einem GATC-Motiv. Der elterliche Strang ist methyliert. Die Helicase II entwindet den DNA-Strang von der Inzision ausgehend. Eine Exonuklease baut das geschnittene DNA-Stück ab und die DNA-Polymerase füllt die entstandene Lücke wieder auf (Wagener, 1999). Schließlich werden neu-synthetisierte und alter Strang durch eine DNA-Ligase verbunden (Modrich, 1991).

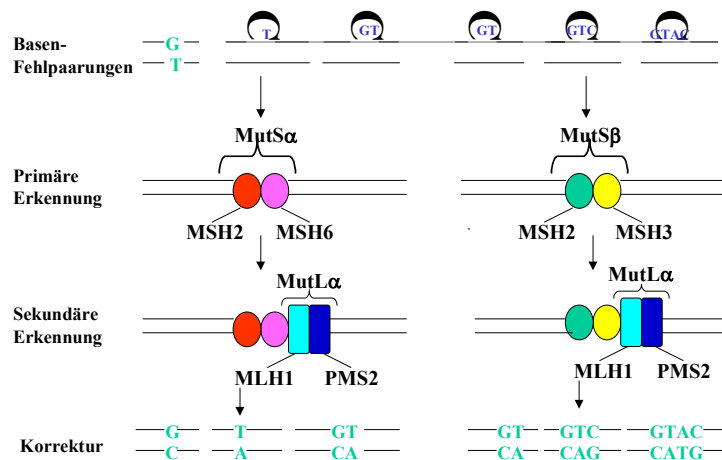


Abb. 7
Frühe Schritte der Mismatch-Reparatur beim Menschen. Das MSH2/MSH6-Heterodimer (MutS α) bindet bevorzugt Fehlpaarungen von 1-2 einzelnen Basen. Loops aus 2-4 Basen werden eher vom MSH2/MSH3-Heterodimer (MutS β) gebunden (nach Lindahl et al., 1997). Näheres im Text siehe oben.

MSI ist das Ergebnis von Slippage („Ausrutschen“ der DNA-Polymerase) und einen nicht-funktionierenden MMR. Ein funktionierendes MMR reduziert die Mutationsrate von Mikrosatelliten auf das 100- bis 1000fache (Strand et al., 1993).

Um ein defektes MMR zu verursachen, müssen beide Allele eines MMR-Gens inaktiviert sein (Saletti et al., 2001). Mutationen an MMR-Genen können angeboren oder erworben sein. Die erworbene Mutation könnte beispielsweise ein Ergebnis der Exposition mit Karzinogenen wie heterozyklische „Amine“ sein (Nagao et al., 1997).

MSI als Konsequenz eines defekten MMR wurde in Tumoren des Magens, Pankreas- und Gallensystems, Dünndarms, Endometriums, der Ovarien, des Nierenbeckens und Harnleiters gefunden. Bei Colitis ulcerosa und chronische Pankreatitis, die beide Präkanzerosen darstellen, wurde ebenfalls MSI beobachtet (Brentnall et al., 1995; Brentnall et al., 1996).

1.4.2 Klassifikation der MSI und verwendete Standardmarker

Die Tumoren werden nach zwei verschiedenen Klassifikationen eingeteilt. Als Min+A werden die mit einer niedrigen Rate und als Min+B die mit einer hohen Rate von MSI bezeichnet (Thibodeau et al., 1998).

Die zweite Einteilung richtet sich nach den fünf Markern, die für MSI-Analysen vorgeschlagen werden. Dabei handelt es sich um die Mononukleotide BAT25 und BAT26 und die Dinukleotide D2S123, D5S346 und D17S250 (Boland et al., 1998). MSI-H (wie high) bezeichnet Tumoren mit MSI bei zwei oder mehr von den fünf Markern, MSI-L (wie low) bedeutet, dass nur ein Marker eine Instabilität zeigt und MSS (wie stabil) soll Tumoren bezeichnen, die stabil sind (Saletti et al., 2001).

Faktoren, die MSI beeinflussen, sind: Anzahl der Repeats, Länge der Repeateinheit, Sequenz der Repeatmotive, angrenzende Sequenz, Unterbrechungen in den Mikrosatelliten, Rekombinations- und Transkriptionsrate u.a. (Schlötterer, 2000).

Je mehr sich die beiden Allele der Zelle in ihrer Größe unterscheiden, desto empfindlicher sind sie für MSI (Amos et al., 1996).

1.5 Fragestellung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es, die intrahepatischen Cholangiokarzinome auf genetische Alterationen zu untersuchen.

Dafür wurden 19 Tumorproben und 15 Proben von Normalgewebe von der Universität Leipzig, Institut für Pathologie und Abteilung für Chirurgie, von PD Dr. A. Tannapfel zur Verfügung gestellt.

Zielstellung der Untersuchungen von Cholangiokarzinomen war es sowohl zum einen nach Mutationen im Exon 3 von β -Catenin als auch zum anderen nach LOH am FHIT-Genlocus mittels den D3S1300 und D3S1234 Markern zu suchen. Weiterhin sollte die DNA auf MSI mit den Gensonden D2S123, D5S346, D17S250 BAT25 und BAT26 untersucht werden.

Es wurde von den Ergebnissen dieser Untersuchungen einerseits eine Aussage darüber erwartet, ob die Aktivierung des Wnt-Signalweges bei der Karzinogenese dieser Tumorentität eine Rolle spielt. Andererseits wäre es von Interesse zu wissen, ob ein Teil

der Karzinome, ähnlich wie beim kolorektalen Karzinom, sich über den Mutationsmechanismus eines defekten Reparatursystems entwickelt.

2 Material

2.1 Reagenzien

Acrylamid (40 %)	Carl Roth-GmbH+Co, Karlsruhe
Agarose	Eurogentec, Seraing, Belgium
Ammoniumperoxodisulfat, APS	Carl Roth-GmbH+Co, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth-GmbH+Co, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Desoxynucleotid-Triphosphate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA Marker pUC19 DNA/Mspl und Lambda DNA/Eco471	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ethanol abs.	E. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	E. Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	E. Merck, Darmstadt
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol	Carl Roth-GmbH+Co, Karlsruhe
HCl	Carl Roth-GmbH+Co, Karlsruhe
Hinf I-Enzym	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Loading Dye Solution	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
NaCl	Carl Roth-GmbH+Co, Karlsruhe
NaOH	E. Merck, Darmstadt
PCR-Puffer	Gibco BRL-Lifetechnologies, Paisly, Scotland
Polyethylenglykol, PEG	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Primer	MWG Biotech, Ebersberg
R+-Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SequaGel Complete	National Diagnostics, Hessle Hull, GB
SequaGel XR (7.5%)	National Diagnostics, Hessle Hull, GB
Taq DNA Polymerase	Gibco BRL-Lifetechnologies, Paisley, Scotland
Tetramethylethyldiamin, TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Mannheim
Tris	Carl Roth-GmbH+Co, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Mannheim

2.2 Fertigkits

Jetsorb DNA Extraktion Kit	Genomed GmbH, Bad Oyenhausen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
DNA Sequencing Kit	Epicentre Technologies, Madison, USA

2.3 Lösungen (Puffer)

1x TBE-Puffer	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
10x TBE long run buffer	1340 mM Tris, 450 mM Borsäure, 25 mM EDTA
6x Agarose Loading Mix, ALM	30 % Glycerol, 0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol
Formamid Loading Mix, FALM	95 % Formamid, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol, 10mM EDTA

2.4 Geräte

Agarosegelkammer	OWL Separation Systems. Inc, Portsmouth, USA
BioDoc Analyser	Biometra, Göttingen
LI-COR-DNA Analyser	MWG Biotech, Ebersberg
Mastercycler personal	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Mastercycler gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Minishaker	IKA Works, Wilmington, USA
Polyacrylamidgelkammer	OWL Separation Systems. Inc, Portsmouth, USA
Spektralphotometer	BIO-RAD, München
Wasserbad	Fisherbrand, Schwerte
Zentrifuge	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

3 Methoden

Bei 12 Tumorproben und 9 Proben von Normalgewebe war die DNA bereits isoliert. Die restlichen 7 Tumorproben mit den 6 entsprechenden nicht-tumorösen Proben waren in Paraffin eingebettet. Aus diesen wurde DNA, wie unter Punkt 3.1 beschrieben, isoliert.

Für die 19 Cholangiokarzinome ergab sich folgende Stadieneinteilung nach der UICC-TNM-Klassifikation (1997) und folgendes Grading nach der WHO.

Fall	Stadium	Grad	Fall	Stadium	Grad
1	II	1	11	IIIA	3
2	IIIA	2	12	I	1
3	IIIA	2	13	I	1
4	IIIB	3	14	IVA	2
5	IIIB	2	15	IIIA	2
6	IIIA	1	16	IIIA	2
7	IIIA	2	17	II	1
8	IVA	1	18	IIIA	2
9	II	1	19	IIIB	3
10	IIIA	2			

Tabelle 1:
Stadieneinteilung und
Grading der

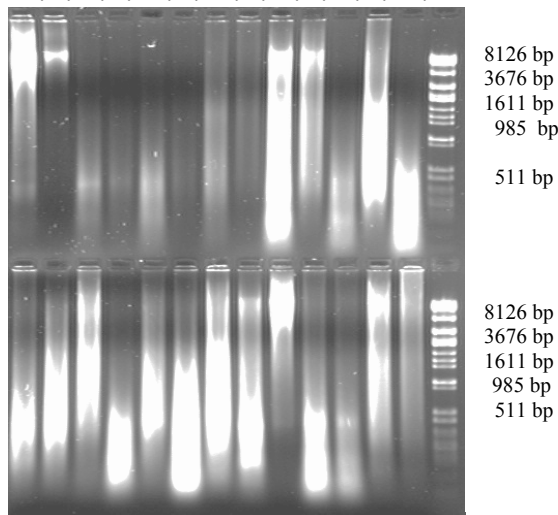
3.1 DNA-Isolierung aus Paraffinschnitten

Insgesamt wurde aus 13 Paraffinschnitten DNA mittels QIAamp DNA Mini Kit isoliert. Von den Schnitten wurde ca. 25 mg von in Paraffin eingebettetem Gewebe mit 1200 µl Xylol vermischt und 5 min. bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der Rest mit 1200 µl 100%igem Ethanol gewaschen.

Das gewonnene Sediment wurde in 180 µl ATL Puffer (für Gewebelyse) resuspendiert und mit 20 µl Proteinase K vermischt. Die ganze Lösung wurde für ca. 3 Stunden bei 56°C im Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurde 200 µl AL Puffer (Präparationspuffer) dazugegeben und für 10 min. bei 70°C inkubiert. Danach wurde 200 µl 100%iger Ethanol hinzugegeben und die Probe in eine QIAamp-Säule überführt. Diese Säule wurde bei 8000 rpm für 1 min. zentrifugiert, das Filtrat verworfen und 500 µl AW1 Puffer (Waschpuffer) dazugegeben. Erneut wurde die Probe für 1 min. zentrifugiert, das Filtrat verworfen, 500 µl AW2 Puffer hinzugegeben und zum letzten Mal für 3 min. bei 14 000 rpm zentrifugiert. Nun wurde die Säule in ein neues 2 ml-Gefäß gebracht und die DNA mit 200 µl destilliertes Wasser eluiert. Es wurden mehrere Eluierungen vorgenommen (siehe Abbildung 8).

Fall : 1N 1T 2N 2T 3N 3T 4N M13
 Eluierung : 1. 2. 1. 2. 1. 2. 1. 2. 1. 2. 1. 2. 1.



Fall : 4N 4T 5N 5T 6N 6T 7T
 Eluierung : 2. 1. 2. 1. 2. 1. 2. 1. 2.

Abb. 8
Resultat der DNA-Isolierung aus Paraffinschnitten mittels QIAamp DNA Mini Kit. Es wurde DNA aus sieben Tumorproben (T=Tumorgewebe) und aus sechs Proben von gesundem Gewebe (N= Normalgewebe) isoliert. Die DNA wurde zweimal eluiert (=1./2.). Die Längenabschätzung der DNA erfolgte mit dem Molekulargewichtsmarker M13.

Die Konzentrationen der Proben wurden mittels eines Spektralphotometers bestimmt. Zur Größenabschätzung der isolierten DNA wurde der Lambda DNA/*Eco47I* (*AvaII*) Marker verwendet (siehe Abbildung 9).

Lambda DNA/*Eco47I* (*AvaII*) Marker, 13

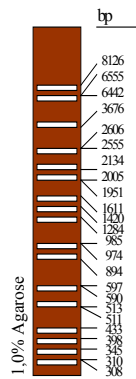


Abb. 9
Lambda DNA/*Eco47I* (*AvaII*) Marker, 13.

3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Durch ihr charakteristisches Absorptionsmaximum bei $\lambda = 260$ nm lassen sich Nukleinsäuren photometrisch quantifizieren. Verunreinigungen mit Proteinen, deren Maximum bei $\lambda = 280$ nm liegt, können das Ergebnis verfälschen. Das Verhältnis der Absorption bei $\lambda = 260$ nm zur Absorption bei $\lambda = 280$ nm sollte für zuverlässige Bestimmungen 1,6 bis 2 zu 1 sein.

Folgende Konzentrationen wurden ermittelt:

Konzentrationen der DNA-Lösungen:

Fall:	Tumorgewebe:	Normalgewebe:
1	65,7 ng/μl	nicht vorhanden
2	68,4 ng/μl	80 ng/μl
3	33,2 ng/μl	80 ng/μl
4	53 ng/μl	70 ng/μl
5	78,5 ng/μl	60 ng/μl
6	58,9 ng/μl	70 ng/μl
7	325,8 ng/μl	70 ng/μl
8	51,6 ng/μl	nicht vorhanden
9	43,2 ng/μl	80 ng/μl
10	113,3 ng/μl	70 ng/μl
11	56,5 ng/μl	nicht vorhanden
12	233,8 ng/μl	65 ng/μl

Konzentrationen der aus Paraffin isolierten DNA:

Fall:	Eluierung:	Tumorgewebe:	Normalgewebe:
13	1.	65,5 ng/μl	10,7 ng/μl
	2.	23,4 ng/μl	9,6 ng/μl
	3.	11,3 ng/μl	7,9 ng/μl
	4.	nicht vorhanden	101,3 ng/μl
	5.	nicht vorhanden	30 ng/μl
14	1.	82,4 ng/μl	97,3 ng/μl
	2.	23,7 ng/μl	36,7 ng/μl
	3.	33,7 ng/μl	12,2 ng/μl
15	1.	94,3 ng/μl	195,6 ng/μl
	2.	15,4 ng/μl	27,4 ng/μl
	3.	172 ng/μl	97,4 ng/μl
	4.	77 ng/μl	34 ng/μl
16	1.	111 ng/μl	171,2 ng/μl
	2.	121,7 ng/μl	30,7 ng/μl
	3.	nicht vorhanden	113,2 ng/μl
	4.	nicht vorhanden	71,3 ng/μl
17	1.	505,2 ng/μl	187,2 ng/μl
	2.	60,7 ng/μl	36,6 ng/μl
	3.	16 ng/μl	142,8 ng/μl
	4.	282 ng/μl	60 ng/μl
	5.	70 ng/μl	nicht vorhanden
18	1.	232,5 ng/μl	159,4 ng/μl
	2.	118,7 ng/μl	31,5 ng/μl
	3.	77 ng/μl	96,8 ng/μl
	4.	49,2 ng/μl	40,7 ng/μl
19	1.	106,2 ng/μl	nicht vorhanden
	2.	66,3 ng/μl	nicht vorhanden

Die DNA-Lösungen wurden entsprechend den PCR-Bedingungen konzentriert oder verdünnt.

3.3 PCR-Bedingungen

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = Polymerase chain reaction) ermöglicht die *in vitro*-Amplifikation einer spezifischen Nukleinsäuresequenz aus einem Nukleinsäuregemisch unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (= *Taq*) sowie eines sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaares.

3.3.1 PCR-Analyse am β -Catenin-Gen (Exon 3)

Die PCR wurde wie folgt ausgeführt: 1 μ l DNA (25 ng) wurde mit jeweils 0,5 μ l der beiden Primer MSCAT3S/R (S: 5' tgtaaacgacggccagtgtctgattgatggagttggacatgg 3', R: 5' caggaaacagctatgaccccagctactgttcttgagtgaagg 3') (Günther et al., 1998), 2,5 μ l 10x *Taq*-Polymerase Puffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 0,15 μ l 20mM Desoxyribonukleotidlösung (dNTPs), 0,75 μ l 50mM MgCl₂, 0,2 μ l *Taq*-Polymerase (5 U/ μ l) und bidestilliertem Wasser in einem Volumen von 25 μ l gemischt. Die genspezifischen Primer waren an ihrem 5'-Ende mit M13 spezifischen DNA-Sequenzen verlängert, die später für die Sequenzierung nötig waren (siehe Punkt 3.7).

Nach einer zweiminütigen Denaturierung bei 94°C in einer PCR-Maschine (Mastercycler) wurde die gewünschte DNA-Sequenz über 30 Zyklen wie folgt amplifiziert:

1. Denaturierung 94°C, 1 min.
2. Annealing 67,5°C, 1 min.
3. Elongation 72°C, 1 min.

Unvollständige Produkte wurden in einem Terminationsschritt aufgefüllt (72°C, 5 min.). Die Polymerase wurde durch rasches Abkühlen auf 4°C inaktiviert.

3.3.2 LOH-Analysen am FHIT-Genlocus

Polymorphe Mikrosatelliten-Marker, die für die LOH-Analyse des FHIT-Gens verwendet wurden, sind die Dinukleotid-Marker D3S1300 (forward: 5' agctcacattctagtcagcct 3', reverse: 5' gccaatccccagatg 3') und D3S1234 (forward: 5' cctgtgagacaaagcaagac 3', reverse: 5' gacattaggcacagggctaa 3'). Der erstere liegt im Intron zwischen Exon fünf und sechs des Gens, der D3S1234-Marker ist zwischen Exon acht und neun lokalisiert (Gramantieri et al., 1999).

Die Sequenz wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl amplifiziert, das 2 µl DNA (50 ng), jeweils 0,25 µl der beiden Primer, 2,5 µl 10x *Taq*-Polymerase Puffer, 0,25 µl 20mM Desoxyribonukleotidlösung (dNTPs), 0,75 µl 50mM MgCl₂, 0,2 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) und bidestilliertes Wasser enthält.

Nach einer zweiminütigen Denaturierung bei 94°C wurde die gewünschte DNA-Sequenz über 30 Zyklen wie folgt mit dem Primerpaar D3S1234 forward/reverse amplifiziert:

1. Denaturierung 95°C, 45 s
2. Annealing 64,6°C, 1 min.
3. Elongation 72°C, 1 min.

Die PCR für das Primerpaar D3S1300 forward/reverse wurde wie folgt durchgeführt:

1. Denaturierung 95°C, 45 s
2. Annealing 56,1°C, 1 min.
3. Elongation 72°C, 1 min.

Unvollständige Produkte wurden in einem Terminationsschritt aufgefüllt (72°C, 2 min.).

Die Polymerase wurde durch rasches Abkühlen auf 4°C inaktiviert.

3.3.3 MSI-Analysen

Die DNA wurde auf MSI mittels der Sonden D2S123 (forward: 5' aaacaggatgacctgcttta 3', reverse: 5' ggactttccacctatgggac 3'), D5S346 (forward: 5' actcactctagtataaatcggg 3', reverse: 5' agcagataagacagtattactagtt 3'), D17S250 (forward: 5' ggaagaatcaaataga caat 3', reverse: 5' gctggccatatatatattaacc 3'), BAT25 (forward: 5' tcgcctccaagaat taagt 3', reverse: 5' tctgcatttaactatggctc 3') und BAT26 (forward: 5' tgactacttttgacttcagcc 3', reverse: 5' aaccattcaacattttaacc 3') untersucht.

D2S123, D5S346 und D17S250 sind polymorphe Dinukleotid-Marker (d.h. man muss Tumor- und Normalgewebe untersuchen). D2S123 besteht aus (AC)₁₃AT(AC)₁₅ und D17S250 aus (AC)₂₅ (Sturzeneker et al., 2000). D5S346 liegt auf Chromosom 5q21-5q22 in der Nähe des APC-Gens (5q21).

BAT25 und BAT26 sind Mononukleotid-Marker und in der Regel monomorph, deshalb reicht es zum Nachweis von MSI aus, nur das Tumorgewebe zu untersuchen. BAT25 besteht aus (T)₇A(T)₂₅ und das Allel verliert manchmal ein Nukleotid oder gewinnt eins bis zwei dazu. Auch die Länge von BAT26 variiert zwischen 24 und 27 Adenin-Mononukleotiden statt (A)₂₆. Beide Marker sind sehr empfindlich für den Nachweis von MSI (de la Chapelle, 1999). BAT25 umfasst das KIT-Proto-Onkogen (Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma virus) und BAT26 liegt innerhalb von MSH2 (Aaltonen et al., 1993; Thibodeau et al., 1993; Ionov et al., 1993).

Von den Primern D2S123, D17S250 und BAT25 wurden jeweils 0,25 µl mit 0,1 µl DNA (2,5 ng), 1,25 µl 10x *Taq*-Polymerase Puffer, 0,125 µl 20mM Desoxyribonukleotidlösung (dNTPs), 0,7 µl 50mM MgCl₂, 0,1 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) und bidestilliertem Wasser in einem Totalvolumen von 12,5 µl vermischt. Die PCR-Bedingungen für den Primer D5S345 und BAT26 waren ähnlich. Es wurde nur bei ersteren 1,1 µl DNA (27,5 ng) und bei zweiteren 0,2 µl DNA (5 ng) eingesetzt.

Nach einer zweiminütigen Denaturierung bei 94°C wurde die gewünschte DNA-Sequenz über 25 Zyklen amplifiziert. Anschließend wurde die DNA bei 94 °C für 45 s denaturiert. Die Annealing-Temperatur war bei den Primern D17S250 und BAT25 51,1°C, bei D5S346 54,7°C und bei D2S123 und BAT26 56,1°C. Die Dauer betrug 1 min. Die anschließende Elongation erfolgte bei 72°C für 1 min. Unvollständige

Produkte wurden in einem Terminationsschritt aufgefüllt (72°C, 2 min.). Die Polymerase wurde durch rasches Abkühlen auf 4°C inaktiviert.

3.4 Restriktionsanalyse von DNA

Exon 3-spezifische PCR-Produkte des β -Catenin-Gens wurden mittels der Restriktionsendonuklease Hinf I (*Haemophilus influenzae*) gespalten. Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Nukleasen, die Bakterien vor Virus-Infektionen schützen, indem sie bestimmte Sequenzen, die zwischen 4 und 8 Basenpaaren lang sind, erkennen und die DNA-Doppelhelix an dieser Stelle schneiden.

Die zu schneidende DNA (17,5 μ l des PCR-Produkts) wurde mit 0,5 μ l Hinf I (10 U/ μ l) und dem jeweiligen Puffer in einem Gesamtvolumen von 23 μ l für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Puffer bestand aus 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl und 0,1 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin). Davon wurden 2,3 μ l eingesetzt.

Die gespaltenen DNA-Fragmente wurden mittels Polyacrylamid (PAA) -Gel-Elektrophorese analysiert.

Als Positivkontrolle wurde die kolorektale Tumorzelllinie SW48 ebenfalls analysiert.

3.5 Analytische Gelelektrophorese

Elektrophoresen werden meist in einer elektrisch neutralen festen Gelmatrix aus Agarose oder Polyacrylamid durchgeführt. Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandern daher im elektrischen Feld zur Anode. Infolge um so langsamer, je größer sie sind. Bei der Elektrophorese wurde die Spannung meist konstant gehalten, so dass es zur Verringerung der Wanderungsgeschwindigkeit, jedoch nicht zur zusätzlichen Wärmeentwicklung kam.

3.5.1 Agarosegele

Agarose ist ein pflanzliches Polysaccharid, das im Gel „netzähnliche“ Strukturen bildet, durch welche die DNA-Fragmente während der Elektrophorese ihrer Größe entsprechend wandern. Agarosegele erlauben eine Trennung von Fragmenten mit einer

Länge von 70 bp bis zu einer Größe von 50 kb Länge, wobei die Auflösung von der Agarosekonzentration abhängt. Die DNA wird durch zwischen Basenpaare interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie Ethidiumbromid als Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Agarose wurde in einer Konzentration von 2 % in 1x TBE Puffer aufgekocht und mit Ethidiumbromid versetzt (0,2 µg/ml Endkonzentration). Nukleinsäure-Proben wurden mit 4/10 Volumen Ladungspuffer (ALM = 6x Agarose Loading Mix) versetzt und in die Taschen des gegossenen Gels geladen. Die Elektrophorese wurde bei 80-130 V durchgeführt. Ethidiumbromid, das sich sowohl im Gel als auch im Laufpuffer befand, interkalierte während des Laufs in die DNA, wodurch die Auftrennung der DNA-Fragmente im UV-Licht (315 nm) beobachtet werden konnte und mit einem Dokumentationssystem (BioDoc Analyser) festgehalten wurde.

Zur Größenbestimmung einzelner DNA-Fragmente wurde der pUC19 DNA/*Msp*I (Hpa II) Marker, 23 verwendet (siehe Abbildung 10).

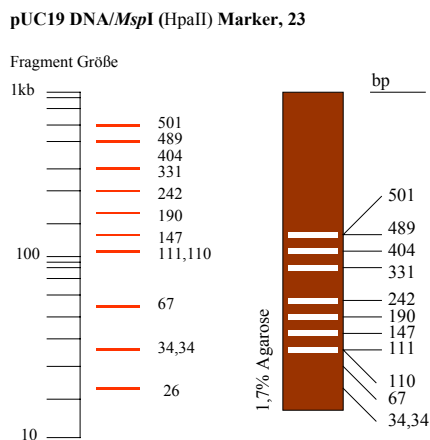


Abb. 10
pUC19 DNA/*Msp*I (Hpa II) Marker, 23.

3.5.2 Polyacrylamidgele für Restriktionsanalysen

In Acrylamidgelen können Fragmente zwischen 10 bp und 2000 bp Länge voneinander getrennt werden. Die Trennschärfe ist hier so groß, dass Fragmente voneinander unterschieden werden können, die in ihrer Länge nur um ein Nukleotid differieren.

Polyacrylamid entsteht durch Polymerisation von Acrylamid-Monomeren. Die entsprechenden Gele werden durch Quervernetzung mit bifunktionalen Verbindungen wie N,N'-Methylenbisacrylamid erhalten. Die Polymerisationsreaktion verläuft gewöhnlich in Gegenwart von Ammoniumpersulfat und N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). TEMED katalysiert die Bildung freier Radikale aus dem Persulfat, welche die Polymerisierung initiieren und beschleunigt auf diese Weise die Reaktion.

Ein 15%iges PAA-Gel wurde nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

Lösungen:

40%iges Acrylamid (19:1)	15 ml
10x TBE	4 ml
TEMED	14 µl
10%iges APS	280 µl
bidestilliertes Wasser	21 ml

Das Polymerisationsgemisch wurde in die Apparatur gegossen und 2 Stunden zum Auspolymerisieren stehengelassen. Nach Entfernen der Taschenschablone und Einfüllen von 1x TBE Puffer in die Gelkammern, wurden die Proben mit 1/5 Volumen Loading Mix versetzt und bei 200 V für 5-6 Stunden aufgetrennt.

Zur Detektion der Banden wurde das Gel nach Beendigung der Elektrophorese für 45 min. in 1x TBE mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Endkonzentration) geschwenkt und anschließend unter UV-Licht photographiert.

Zur Größenbestimmung einzelner DNA-Fragmente wurde der pUC19 DNA/*MspI* Marker verwendet (siehe Abbildung 10).

3.5.3 Polyacrylamidgele für die Sequenzierung

Zwei 25x 41 cm große Glasplatten, eine mit einer Aussparung für den Haifischzahnkamm, wurden erst mit Wasser, dann mit Ethanol gesäubert.

Für ein 6%iges PAA-Sequenziergel wurde folgende Lösung angesetzt:

Sequenziergemix:

7,5%iges Acrylamid (19:1)	30 ml
SequaGel complete buffer	7,5 ml
10%iges APS	300 µl

Auf einer Gelgießapparatur wurde dann das Gel in eine aus beiden Glasplatten und dazwischengeklebten 0,25 mm Abstandshaltern gebildeten Kammer gegossen.

Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer (LI-COR-DNA Analyser) gespannt, die Pufferkammern mit 1x TBE long run Puffer gefüllt und das Gel nach Entfernen der Taschenschablone für 30 min. vorelektrophoretisiert. Danach wurde der Haifischzahnkamm eingepasst.

In die Taschen wurden 0,5 µl der unmittelbar zuvor auf 80°C erhitzten Sequenzierreaktionsansätze einpipettiert. Die Reaktionsansätze wurden mit ½ Volumen Stop/Loading Mix kurz nach der DNA-Sequenzierung versetzt.

Die verwendeten Primer der Sequenzierreaktion hatten einen IRD 800 (Infra Red Dye)-Farbstoff gebunden, damit die DNA im LI-COR-DNA Analyser detektiert werden konnte.

Die Elektrophorese erfolgte bei 50°C und 1500 V und dauerte ca. 5 Stunden.

3.5.4 Polyacrylamidgele für LOH- und MSI-Analysen

Zwei 25x 33 cm große Glasplatten, eine mit einer Aussparung für den Rechteckzackenamm, wurden erst mit Wasser, dann mit Ethanol gesäubert. Die Glasplatten wurden jeweils auf der dem Gel zugewandten Seite mit einem Gemisch aus 165 µl Silan und 5µl 10%iger Essigsäure silanisiert.

Ein 6%iges PAA-Gel wurde nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

Lösungen:

7,5%iges Acrylamid (19:1)	26,4 ml
SequaGel complete buffer	6,6 ml
10%iges APS	264 µl

Auf einer Gelgießapparatur wurde dann das Gel in eine aus beiden Glasplatten und dazwischengeklebten 0,4 mm Abstandshaltern gebildeten Kammer gegossen.

Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer (LICOR-DNA Analyser) gespannt, die Pufferkammern mit 1x TBE long run Puffer gefüllt und das Gel nach Entfernen der Taschenschablone für 30 min. vorelektrophoretisiert. Danach wurde der Rechteckzackenkamm entfernt und die Taschen wurden gespült. Von den PCR-Produkten der LOH- und MSI-Analysen wurde ein Aliquot von 2 µl mit 2 µl FALM (Formamide Loading Mixture) vermischt, unmittelbar vor der Elektrophorese auf 80°C erhitzt und davon 1,5 µl auf das PAA-Gel aufgetragen und analysiert.

Die Elektrophorese erfolgte bei 50°C und 1000 V und dauerte ca. 5 Stunden.

3.6 Reinigung von PCR-Produkten

Die DNA-Aufreinigung wurde entweder mit PEG 6000 (24 % PEG, 3 M NaCl) oder mit Jetsorb durchgeführt.

Bei Jetsorb ergab sich eine höhere Ausbeute, aber Reste von Verunreinigungen störten die weitere Sequenzierreaktion, so dass die PCR-Produkte hauptsächlich mit PEG 6000 gereinigt wurden.

3.6.1 PEG-Fällung

PEG 6000 wurde 1:1 mit dem PCR-Produkt vermischt und 10 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei 4°C für 20 min. bei maximaler Drehzahl (= 16400 rpm) zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Sediment wurde in 200 µl 70%igen Ethanol resuspendiert und erneut 10 min. zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Sediment getrocknet. Zum Schluss wurde es in ein ½ Volumen des anfänglichen PCR-Ansatzes gelöst.

Das Ergebnis der PEG-Fällung wurde durch Auftragen eines Aliquots auf ein 2%iges Agarosegel kontrolliert.

3.6.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen wurde mittels Jetsorb durchgeführt.

Die DNA-Banden wurden nach kurzer Kontrolle unter der UV-Handlampe mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Das Gelstück wurde in einem Reaktionsgefäß gewogen und auf je 100 mg wurden 300 µl A₁ Puffer (NaClO₄, TBE-Lösungsvermittler, Natriumazetat) und 10 µl Jetsorbsuspension dazugegeben. Um die DNA zu binden wurde die Lösung für 15 min. bei 50°C inkubiert. Während der Inkubation wurde die Probe alle 2-3 min. kräftig aufgeschüttelt um die Auflösung des Gels zu beschleunigen.

Danach wurde für 30 s bei 10 381 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde in 300 µl A₁ Puffer gelöst und erneut bei 10 381 rpm für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Sediment in 300 µl A₂ Puffer (Ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl) gewaschen und für 30 s bei 10 381 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt.

Dann wurde das Sediment getrocknet und in 20 µl bidestilliertem Wasser gelöst. Zum Schluss wurde die Lösung für 5 min. bei 50°C inkubiert und nochmals zentrifugiert. Der Überstand enthielt dann die gereinigte DNA.

Das Resultat der DNA-Isolierung und Reinigung wurde auf einem 2%igen Agarosegel kontrolliert.

3.7 Sequenzierung mittels PCR nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger

Die Sanger-Technik basiert im wesentlichen auf der enzymatischen Kopierung des zu sequenzierenden DNA-Stranges mit der DNA-Polymerase. Damit eine DNA nach dem Sanger-Verfahren sequenziert werden kann, muss sie in einzelsträngiger Form vorliegen. Dies geschieht durch vorheriges Denaturieren der DNA.

Zur Sequenzierung wurde der SequiTherm EXEL™ II DNA Sequencing Kit verwendet.

Beide DNA-Stränge wurden sequenziert. Die verwendeten Primer (M13-spezifische Sequenz) waren mittels eines IRD 800-Farbstoffs markiert, damit die DNA im LI-COR-DNA Analyser detektiert werden konnte. Die Polymerase-Reaktion wurde in vier

getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt. Zwei „Prämixe“ wurden mit folgenden Komponenten erstellt:

2 µl forward Primer	7,2 µl 3,5x Sequenzierpuffer	2 µl reverse Primer
	1 µl <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	
	3,2 µl gereinigte DNA	
	3,6 µl bidestilliertes Wasser	

In 0,5 ml Reaktionsgefäße wurden jeweils 2 µl von einem A (Adenin)-, C (Cytosin)-, G (Guanin)- und T (Thymin)-Mix pipettiert. Zusätzlich wurden in jedes Reaktionsgefäß 4 µl des „Prämixes“ gebracht. Die A, C, G- und T-Mixe enthielten nicht nur Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), sondern auch Didesoxynukleosidtriphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), die ebenfalls von der DNA-Polymerase als Substrat erkannt wurden. Sie führen jedoch zum Abbruch der DNA-Synthese, da die für die Kettenverlängerung benötigte 3'-Hydroxyl-Gruppe im Didesoxy-Nukleotid fehlt. Auf diese Weise konnte in jedem Reaktionsansatz die Polymerisierungsreaktion selektiv bei A, C, G oder T beendet werden.

Nach einer zweiminütigen Denaturierung bei 94°C wurde die gewünschte DNA-Sequenz über 30 Zyklen wie folgt mit dem forward-Primer (5' tgtaaacgacggccagt 3') sequenziert:

1. Denaturierung 95°C, 30 s
2. Annealing 57°C, 15 s
3. Elongation 70°C, 1 min.

Die PCR mit dem reverse-Primer (5' caggaaacagctatgacc 3') wurde wie folgt durchgeführt:

1. Denaturierung 95°C, 30 s
2. Annealing 59°C, 15 s
3. Elongation 70°C, 1 min.

Unvollständige Produkte wurden in einem Terminationsschritt aufgefüllt (72°C, 10 min.). Die Polymerase wurde durch rasches Abkühlen auf 4°C inaktiviert.

Danach wurden die Proben mit ½ Volumen Ladungspuffer versetzt und in einem denaturierenden PAA-Gel nach vorherigem Erhitzen auf 80°C durch Elektrophorese entsprechend ihrer Größe voneinander getrennt.

4 Ergebnisse

4.1 Restriktionsenzymverdau von PCR-Produkten des β -Catenin-Gens

Für die Mutationsanalyse im Exon 3 des β -Catenin-Gens wurde in 19 Fällen die genomische DNA aus Tumorgewebe untersucht, indem wie unter Punkt 3.4 beschrieben das mittels PCR amplifizierte DNA-Fragment mit Hinf I inkubiert wurde.

Um für diese Analyse spezifische (saubere) und ausreichende Mengen an amplifizierter DNA zu erhalten, mussten die PCR-Bedingungen optimiert werden. Dies geschah zum einen durch Testen der Dauer und Temperatur des Annealingschritts in einem Bereich von 15 s - 2 min. und 64°C - 72°C und zum anderen durch Variieren der MgCl₂- und Primer-Konzentrationen. Dabei ergaben sich die in Punkt 3.3.1 angegebenen optimierten Bedingungen. Ein vor der Optimierung zusätzlich amplifiziertes 100 bp langes unspezifisches Primerdimer konnte durch diese Optimierung eliminiert werden.

Das Hinf I Enzym schneidet die Sequenz an zwei Stellen des Exons 3, welche die spezifische Basensequenz GANTC enthalten. Zwischen dem Guanin und dem Adenin spaltet es die Phosphodiester-Bindung (siehe Abbildung 11).

Bei der Restriktionsanalyse wurde ein 266 bp langes DNA-Fragment in ein 159 bp, 100 bp und ein 7 bp langes Fragment gespalten. Eine Mutation in der ersten bzw. zweiten Hinf I Bindungsstelle hätte eine 107 bp oder 166 bp Bande ergeben. Die Abbildung 12 zeigt representative Ergebnisse für das hier angewandte Analyseverfahren. Das 7 bp lange Fragment war auf dem PAA-Gel nicht erkennbar.

Als wichtiges Ergebnis ist festzustellen, dass der Restriktionsenzymverdau, der mittels spezifischer PCR (siehe Punkt 3.3.1) amplifizierten DNA-Fragmente mit Hinf I in keinem der 19 untersuchten Fälle eine Mutation in Codon 32, 33, 34 oder 35 des Gens ergab (siehe Abbildung 11).

Zum Vergleich wurden PCR-Produkte der kolorektalen Tumorzelllinie SW48, welche bekanntermaßen an Position 33 eine Mutation trägt, ebenfalls verdaut und somit als Positivkontrolle gewertet. Bei dem Restriktionsenzymverdau dieser mutierten Exon 3-Sequenz war eine zusätzliche 107 bp Bande erkennbar (siehe Abbildung 12). Zur Längenbestimmung der DNA-Fragmente wurde der M23 Standardmarker verwendet (siehe Abbildung 10).

Folgende Darstellung zeigt das amplifizierte Exon 3 des β -Catenin-Gens mit den spezifischen Hinf I Erkennungsstellen, sowie die für die Phosphorylierung und Degradierung verantwortlichen GSK3 β Bindungsstellen.

Exon 2 :	ATG	(Startcodon)		GCT	ACT	CAA	G	Intron 2	Exon 3 :					
	TAC	(Startcodon)		CGA	TGA	GTT	C	Intron 2	Exon 3 :					
G/CT	GAT	TTG	ATG	GAG	TTG	GAC	ATG	GCC	ATG	GAA	CCA	GAC	AGA	
C/GA	CTA	AAC	TAC	CTC	AAC	CTG	TAC	CGG	TAC	CTT	GGT	CTG	TCT	
AAA	GCG	GCT	GTT	AGT	CAC	TGG	CAG	CAA	CAG	TCT	TAC	CTG	GAC	
TTT	CGC	CGA	CAA	TCA	GTG	ACC	GTC	GTT	GTC	AGA	ATG	GAC	CTG	
	↓													
TCT	GGA	ATC	CAT	TCT	GGT	GCC	ACT	ACC	ACA	GCT	CCT	TCT	CTG	
AGA	CCT	TAG	GTA	AGA	CCA	CGG	TGA	TGG	TGT	CGA	GGA	AGA	GAC	
AGT	GGT	AAA	GGC	AAT	CCT	GAG	GAA	GAG	GAT	GTG	GAT	ACC	TCC	
TCA	CCA	TTT	CCG	TTA	GGA	CTC	CTT	CTC	CTA	CAC	CTA	TGG	AGG	
CAA	GTC	CTG	TAT	GAG	TGG	GAA	CAG	GGA	TTT	TCT	CAG	TCC	TTC	
GTT	CAG	GAC	ATA	CTC	ACC	CTT	GTC	CCT	AAA	AGA	GTC	AGG	AAG	
ACT	CAA	GAA	CAA	GTA	GCT	G/G	(Intron 3)							
TGA	GTT	CTT	GTT	CAT	CGA	C/C	(Intron 3)							

Erklärung :

Fett: MSCAT3S / MRCAT3R – Primer

Fett kursiv: bisher gefundene Mutationen (Hotspots)

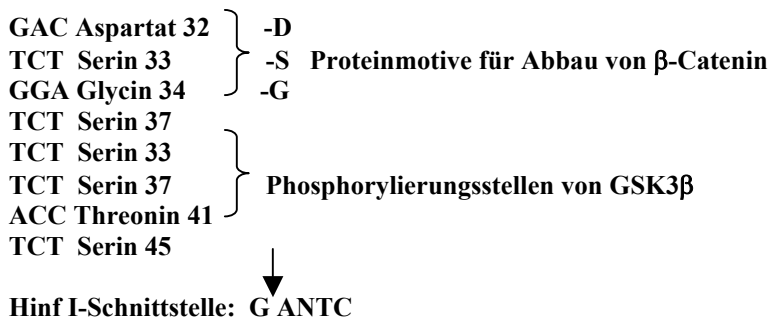


Abb. 11

Folgende Abbildung beinhaltet die Sequenz des amplifizierten β -Catenin-Fragments und die spezifischen Hinf I Bindungsstellen, sowie die für die Phosphorylierung und Degradierung verantwortlichen GSK3 β Bindungsstellen.

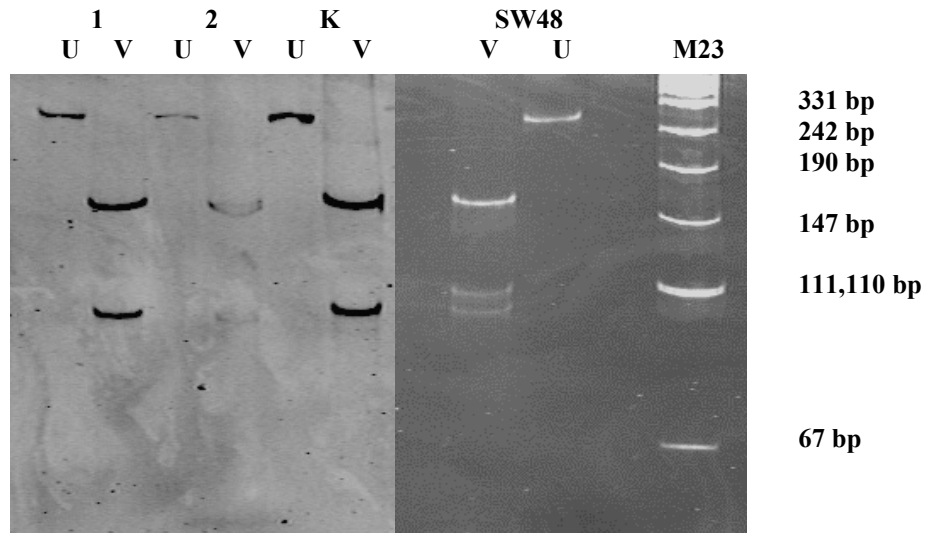


Abb. 12

Restriktionsenzymverdau von β -Catenin-Gensequenzen (Exon 3) mit Hinf I. Patient 1 und 2 (U=unverdautes PCR-Produkt; V=verdautes PCR-Produkt) haben das gleiche Schnittmuster wie die Wildtypkontrolle (K=Kontrolle). Die kolorektale Karzinomzelllinie SW48 zeigt das Schnittmuster einer nachgewiesenen Mutation. Der Molekulargewichtsmarker M23 wurde zur Längenbestimmung der DNA-Fragmente verwendet.

4.2 Sequenzierung von β -Catenin-Sequenzen

Nachdem bei 19 Fällen keine Mutation durch Hinf I Restriktionsenzymanalyse zu finden war, wurden diese Ergebnisse verifiziert. Wie unter Punkt 3.7 beschrieben, wurden die PCR-Fragmente sequenziert, um sie auf Mutationen außerhalb der Hinf I-Schnittstellen zu testen. Zu diesen Hotspots gehören die Codons 37, 41 und 45, welche die für die Phosphorylierung und Degradierung des β -Catenins verantwortlichen GSK3 β -Bindungsstellen beinhalten (siehe Abbildung 11).

Es zeigte sich, dass die Reinigung der DNA mit PEG 6000 bessere Ergebnisse lieferte, als das Verfahren mit Jetsorb. Es könnten bei Jetsorb zurückgebliebene Verunreinigungen oder Reste von verwendeten Puffern die Sequenzierung gehemmt haben. Das Ergebnis nach der PEG-Fällung war eindeutiger.

Die Sequenzanalysen, die in beiden Richtungen des DNA-Strangs durchgeführt wurden und der Vergleich zu einer bekannten Mutante (SW48) ergaben in 19 Fällen untersuchter Cholangiokarzinome ebenfalls keine Mutationen in den oben angegebenen Hotspots und bestätigten somit das Ergebnis von Punkt 4.1. (siehe Abbildung 13)

Zum Vergleich wurde die Exon 3-spezifische β -Catenin-Sequenz der kolorektalen Tumorzelllinie SW48 analysiert. Es war eine heterozygote Punktmutation in der ersten Hinf I Bindungsstelle erkennbar. Anstelle des Guanins war ein Thymin zu finden, wodurch Serin gegen Tyrosin in Codon 33 ausgewechselt wurde. Dadurch wurde die Bindung des Enzyms unmöglich gemacht, da auch im Verdau mit Hinf I eine zusätzliche 107 bp Bande erkennbar war (siehe Abbildung 12).

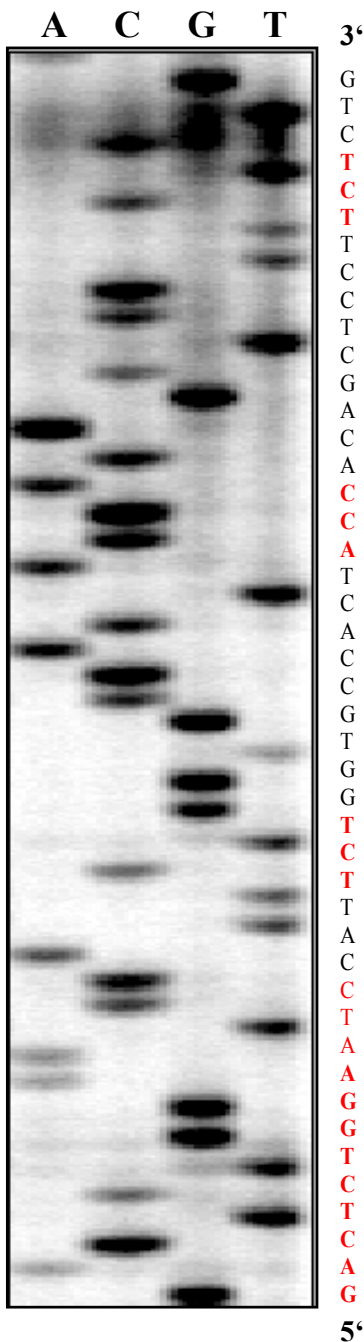
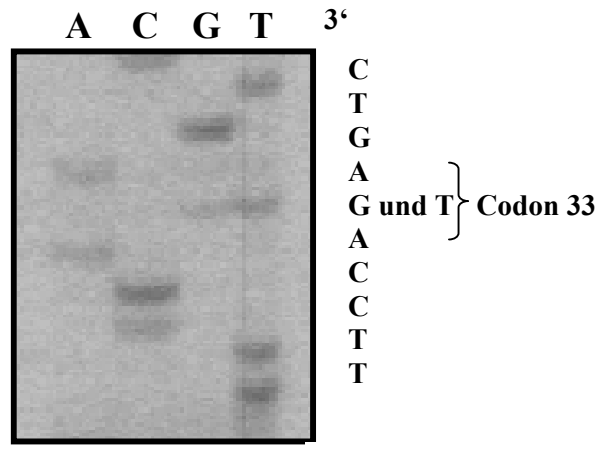


Abb. 13
Sequenzausschnitt des β -Catenin-Gens (Exon 3) mit den Hotspots für Mutationen (rot). Der rechte Bildausschnitt zeigt die Mutation in der kolorektalen Zelllinie SW48: es sind ein G und ein T erkennbar (heterozygote Mutation).
A = Adenin
C = Cytosin
G = Guanin
T = Thymin



Mutation in kolorektaler Zelllinie
 ↑
 Komplementär zu oberen Abschnitt

4.3 LOH-Analyse am FHIT-Genlocus

Zur Untersuchung des FHIT-Gens wurde wie unter Punkt 3.3.2 beschrieben die isolierte DNA von 15 Paar tumorösen und nicht-tumorösen Gewebe an zwei Mikrosatellitenloci untersucht.

Die Ergebnisse der Untersuchung des FHIT-Gens sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

FALL	MARKER	
	D3S1300	D3S1234
NR:		
1	-	-
2	ho	ho
3	LOH	ho
4	he	he
5	he	ho
6	ho	he
7	he	he
8	-	-
9	he	ho
10	he	he
11	-	-
12	he	he
13	he	He
14	he	ho
15	ho	ho
16	ho	ho
17	ho	LOH
18	LOH	ho
19	-	-
Heterozygotie:	10 von 15	7 von 15

Tabelle 2: Ergebnisse der FHIT-Gen-Analyse.

he-heterozygoter Marker

ho-homozygoter Marker

LOH-Loss of Heterozygosity

„ - “ nicht durchführbar, da Normalgewebe fehlte

Der D3S1300 Marker war in zehn Fällen und der D3S1234 Marker in sieben Fällen informativ, d.h. heterozygot. MSI wurde in keinem der Fälle gefunden. LOH konnte bei zwei Fällen (3 und 18) am D3S1300 Locus (siehe Abbildung 14 und 15) und bei einem Fall (17) am D3S1234 Locus beobachtet werden (siehe Abbildung 16).

In einigen Fällen war es schwierig ein PCR-Produkt zu erhalten. Wahrscheinlich waren Störkomponenten (wie Paraffin, Formaldehyd u.a.) aus der Isolation der DNA aus Paraffinschnitten in der DNA-Lösung vorhanden, welche die Reaktion hemmten. In solchen Fällen wurde die DNA-Konzentration variiert, wobei sich ergab, dass niedrigere Konzentrationen die PCR-Reaktion förderten.

Erklärung für Bildbeschriftungen:

- T = Tumorgewebe**
- N = Normalgewebe**
- K = Wildtypkontrolle**
- B = Blank (Leerkontrolle)**

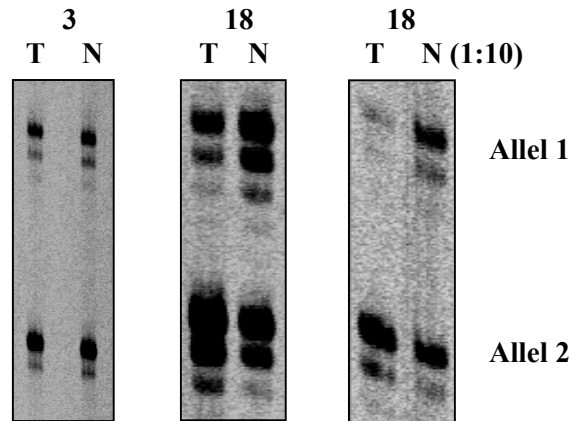


Abb. 14
LOH-Analysen am FHIT-Genlocus mit dem D3S1300-Primer bei Fall 3 und 18. Die DNA des Normalgewebes bei Fall 18 wurde 1:10 verdünnt, um den Verlust des oberen Allels erkennen zu können.

Die in den Fällen 3, 17 und 18 durch Vergleich von Tumorgewebe mit Normalgewebe festgestellten LOH wurden verifiziert, indem die Zyklenzahl der PCR von 30 auf bis zu 23 Zyklen reduziert wurde, damit im Laufe der PCR der Verlust eines Allels im Tumorgewebe beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 15).

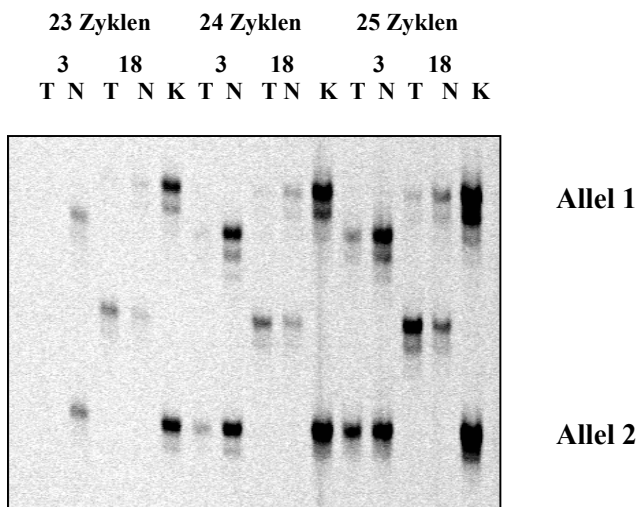


Abb. 15
LOH-Analysen am FHIT-Genlocus mit dem D3S1300-Primer bei Fall 3 und 18. Bei unterschiedlicher PCR-Zyklenzahl erkennt man den Verlust des jeweils oberen Allels.

Beim Auftrag auf das PAA-Gel wurden manche PCR-Produkte verdünnt, um zu erreichen, dass die Banden in Tumor- und Normalgewebe vergleichbar stark waren (siehe Abbildung 14).

LOH wurde erst festgelegt, wenn die Intensität eines Allels im Vergleich zu dem anderen Allel im Tumorgewebe um > 50 % abgeschwächt war (siehe Abbildung 14, 15 und 16).

Die Kontamination von Tumorgewebe mit gesunden Zellen oder infiltrierenden Leukozyten ist in der Regel dafür verantwortlich, dass ein LOH nicht so eindeutig zu beurteilen ist, wenn nämlich Restmengen eines Allels vom gesunden Gewebe erkennbar waren (siehe Abbildung 14, 15 und 16).

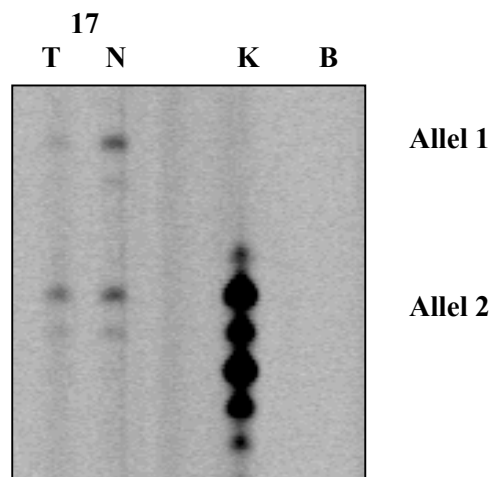


Abb. 16
LOH-Analyse am FHIT-Genlocus mit dem D3S1234-Primer bei Fall 17. Man erkennt einen LOH des Allels 1 im Tumorgewebe.

4.4 MSI-Analysen

Fünfzehn Paare von tumoröser und nicht-tumoröser DNA wurde wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben auf MSI an den Loci D2S123, D5S346, D17S250, BAT25 und BAT26 untersucht.

Die Ergebnisse der MSI-Analysen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

FALL	MARKER				
	D2S123	D5S346	D17S250	BAT25	BAT26
NR:					
1	-	-	-		
2	he	he	ho		
3	he	ho	ho		
4	ho	LOH	ho		
5	ho	ho	ho		
6	ho	LOH	he		
7	ho	he	he		
8	-	-	-		
9	he	ho	ho		
10	ho	he	he		
11	-	-	-		
12	he	ho	he		
13	he	ho	ho		
14	ho	he	ho		
15	he	he	he		
16	ho	he	ho		
17	he	he	he		
18	he	ho	ho		
19	-	-	-		
Hetero- Zygotie:	8 von 15	9 von 15	6 von 15		

Tabelle 3: Ergebnisse der MSI-Analysen.
he-heterozygoter Marker
ho-homozygoter Marker
LOH-Loss of Heterozygosity
„ - “ nicht durchführbar, da Normalgewebe fehlte

Es wurde in keiner der analysierten Proben Mikrosatelliteninstabilität beobachtet. Der D2S123 Marker (siehe Abbildung 17) war in acht Fällen, der D5S346 Marker (siehe Abbildung 18 und 19) in neun Fällen und der D17S250 Marker (siehe Abbildung 20 und 21) in sechs Fällen informativ für LOH. Am D5S346 Locus wurde in zwei Fällen (4 und 6) ein LOH-Ereignis gefunden (siehe Abbildung 18 und 19).

Um einen LOH genau beurteilen zu können, wurde immer Tumorgewebe mit Normalgewebe verglichen. Die Zyklenzahl der PCR wurde von 25 auf bis zu 22 Zyklen reduziert, damit im Laufe der PCR der Verlust eines Allels im Tumorgewebe beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 19 und 21).

Die Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse im Einzelnen.

In einigen Fällen war es schwierig ein PCR-Produkt zu erhalten. In solchen Fällen wurde die DNA-Konzentration variiert, wobei sich ergab, dass niedrigere Konzentrationen die PCR-Reaktion bei dem D2S123 Marker förderten.

Erklärung der Bildbeschriftung:

T = Tumorgewebe
N = Normalgewebe
K = Wildtypkontrolle
B = Blank

7 9 10 12 13 14 15 16
 T N T N T N T N T N K T N T N

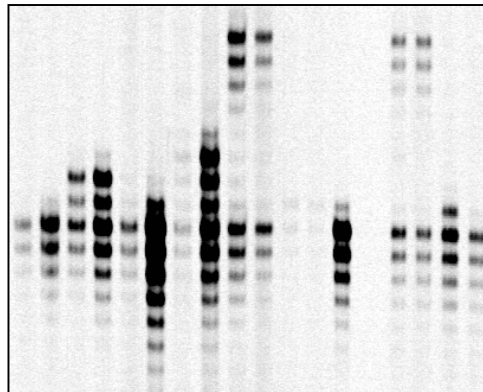


Abb. 17

MSI- und LOH-Analysen am D2S123 Locus bei Fall 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15 und 16. Es konnte kein LOH und keine MSI nachgewiesen werden.

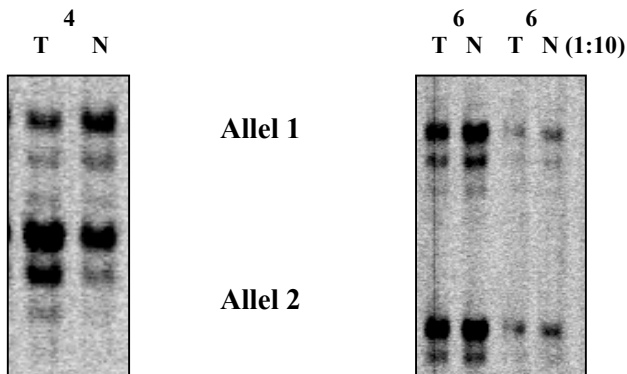


Abb. 18

MSI- und LOH-Analysen mit dem D5S346-Marker bei Fall 4 und 6. Bei Fall 6 wurden verschiedene Verdünnungen aufgetragen, um den LOH des oberen Allels besser erkennen zu können.

Manche PCR-Produkte wurden verdünnt auf das PAA-Gel aufgetragen, damit die DNA-Banden von Tumor- und Normalgewebe vergleichbar stark waren (siehe Abbildung 18, 20 und 22).

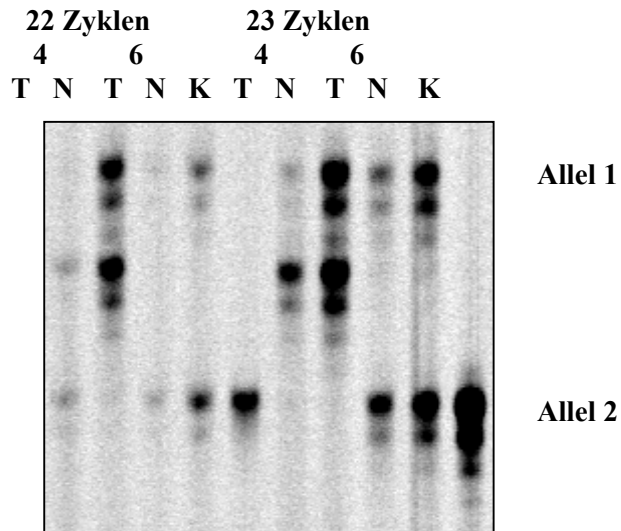


Abb. 19
 LOH-Analysen mit dem D5S346-Marker bei Fall 4 und 6. Bei unterschiedlicher PCR-Zyklenzahl erkennt man den Verlust des jeweils oberen Allels.

Bei dem D17S250 Marker musste die DNA-Konzentration und Zyklenzahl von 25 auf 28 Zyklen erhöht werden, um die PCR-Produkte analysieren zu können.

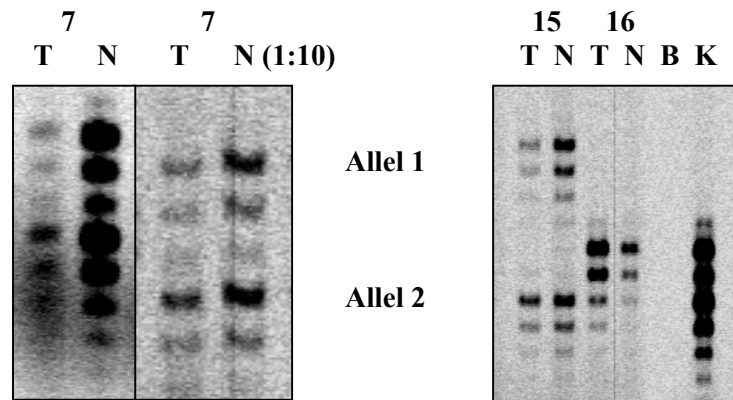


Abb. 20
 MSI- und LOH-Analysen am D17S250 Locus bei 3 Fällen (7, 15 und 16). Es ist kein LOH bei Fall 7 und 15 eindeutig zu erkennen. Die DNA des Normalgewebes wurde 1:10 verdünnt.

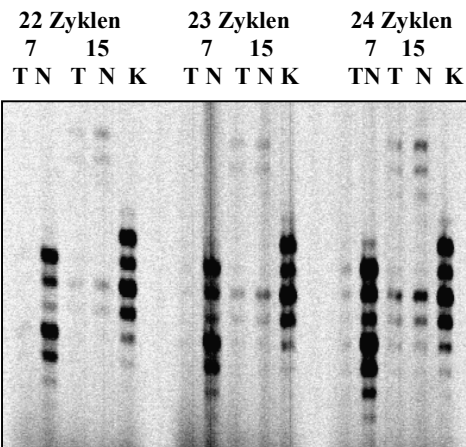


Abb. 21
LOH-Analysen mit dem D17S250-Marker bei zwei Fällen (7 und 15). Bei unterschiedlicher PCR-Zyklenzahl ist kein LOH und keine MSI erkennbar.

Die 19 DNA-Lösungen von Tumorgewebe wurden ebenfalls mit den Markern BAT25 (siehe Abbildung 22) und BAT26 (siehe Abbildung 23) untersucht. Bei diesen beiden Mononukleotid-Repeat Markern, die sehr empfindlich auf MSI reagieren, wurde Mikrosatelliteninstabilität ausgeschlossen.

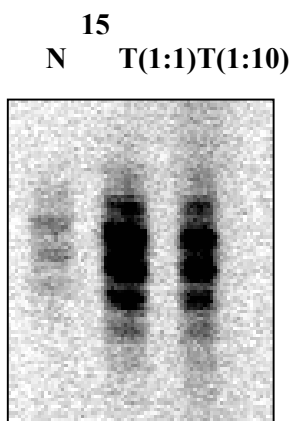


Abb. 22
MSI-Analyse am BAT25 Locus bei Fallbeispiel 15. Verschiedene Verdünnungen von Tumor-DNA wurden aufgetragen. Es konnte keine MSI nachgewiesen werden.

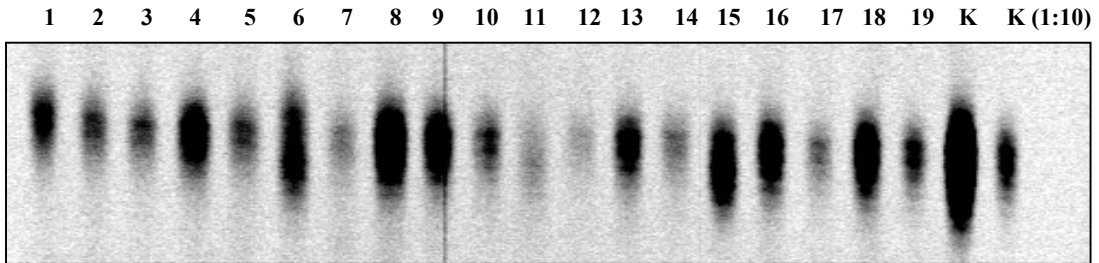


Abb. 23

MSI-Analysen mit dem BAT26-Marker bei 19 Fällen (1-19), es wurde nur Tumor-DNA untersucht und es konnte MSI ausgeschlossen werden.

5 Diskussion

5.1 Hypothese zur Karzinogenese von Cholangiokarzinomen

Maligne Tumoren sind meistens klonalen Ursprungs. Durch eine Mutation erwirbt eine einzelne Zelle einen geringfügigen Wachstumsvorteil. Kommt es in einem dieser expandierenden Zellklone zu einer weiteren Mutation, kann diese weitere Wachstumsvorteile verleihen. Ein maligner Tumor entsteht schließlich nach weiteren Runden von Mutationen und Expansionen (Nowell, 1976).

Es wird immer wieder diskutiert, ob sich verschiedene Entartungsstadien auf dem Weg der Entstehung von Cholangiokarzinomen nach klinischen und histologischen Gesichtspunkten abgrenzen lassen. Hyperproliferationen des Gallengang(GG)epithels stellen das erste erkennbare Stadium dar. Es folgen verschiedene Stadien von Adenomen. Darauf folgt das Karzinom, welches wiederum in verschiedene Unterstadien eingeteilt wird.

Das Modell von Tannapfel & Wittekind (siehe Abbildung 24) beschreibt den Zusammenhang zwischen den Übergängen der verschiedenen Stadien bis zur Entstehung eines Karzinoms mit dem Auftreten genetischer Alterationen in bestimmten Genen.

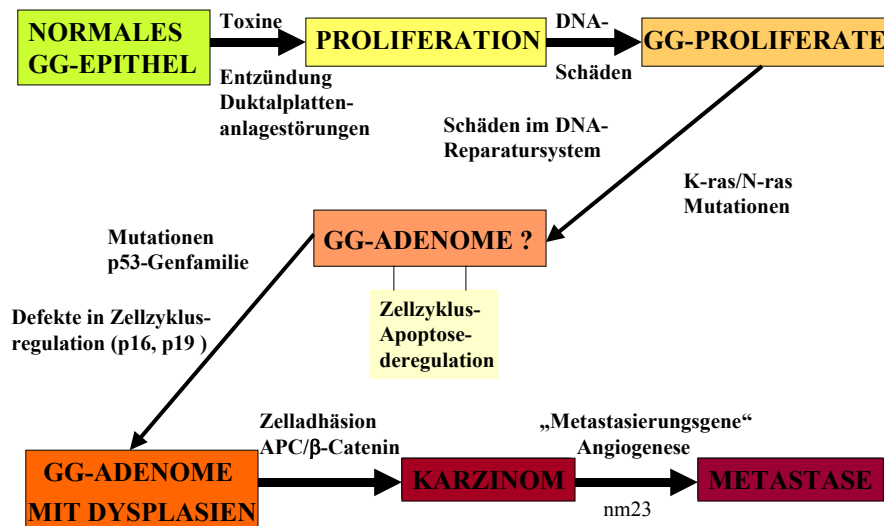


Abb. 24

Hypothese zur Karzinogenese von intrahepatischen Gallengangskarzinomen (nach Tannapfel & Wittekind, 2001).

Nach dem Modell von Tannapfel & Wittekind (siehe Abbildung 24) kommt es durch K-ras/N-ras Mutationen oder Schäden im DNA-Reparatursystem zur Entstehung von Adenomen. Die in der vorliegenden Arbeit auf β -Catenin, FHIT und MSI untersuchten 19 Cholangiokarzinome waren bereits von Tannapfel et al. (Pathologisches Institut/Leipzig) auf K-ras-Mutationen untersucht worden. Es konnte bei 9 von 19 (47,4 %) Fällen eine Punktmutation nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu fanden Kang et al. (1999) nur in 9 von 40 (22,5 %) Fällen intrahepatischer Cholangiokarzinome Mutationen im K-ras-Gen.

MSI konnte in dieser Arbeit bei 15 von 19 Tumorproben mit den Markern D2S123, D5S346, D17S250, BAT25 und BAT26 ausgeschlossen werden. Da MSI eine Verlängerung oder Verkürzung von repetitiven Sequenzen aufgrund eines basalen Defekts von DNA-Reparaturmechanismen bedeutet, könnte dies darauf hinweisen, dass eine Schädigung im DNA-Mismatch-Reparatursystem für die Entstehung eines Adenoms keine Bedeutung besitzt, jedoch Mutationen im K-ras-Gen.

Nach dem Modell von Tannapfel & Wittekind folgen in der Mutationskaskade nach K-ras-Alterationen Mutationen im p53-Gen im Übergang vom frühen Adenom zum späten Adenom (siehe Abbildung 24). Mutationen im p53-Gen finden sich bei etwa 40-45% aller menschlichen Tumoren, in keinem anderen Tumorgen wurden Veränderungen ähnlich häufig beobachtet (Soussi et al., 1994). Tannapfel et al. (2000) beobachteten in 6 von den 19 (31,6 %) Cholangiokarzinomen Mutationen im p53-Gen. Auch Cong et al. (2001) fanden bei 6 von 16 (37,5 %) Fällen genetische Veränderungen im p53-Gen in Cholangiokarzinomen. Ebenso entdeckten Kang et al. (1999) bei 14 von 40 (35 %) Fällen in Gallengangstumoren Mutationen in diesem Gen.

LOH am D17S520-Locus (17p12), welcher sich in der Nähe des p53-Gens (17p13.1) befindet, wurde in 4 von 17 (23,5 %) Fällen von Kawaki et al. (2000) beobachtet. Ding et al. (1993) fanden in 40-44 % intrahepatischer Cholangiokarzinome LOH am 17p13 Locus. Ein mutiertes Allel des p53-Gens ist ausreichend, um das Protein zu inaktivieren, da die Mehrzahl der mutierten p53-Proteine die Funktion des Produkts des zweiten Allels hemmt (Wagener, 1999).

Aus oben genannten Studien geht hervor, dass Mutationen im p53-Gen mit großer Wahrscheinlichkeit an der Karzinogenese intrahepatischer Cholangiokarzinome beteiligt sind.

Beim Übergang vom späten Adenom zum Karzinom werden Mutationen im APC-oder β -Catenin-Gen und Störungen in der Zelladhäsion postuliert (siehe Abbildung 24).

Da bisher keine Studien über genetische Veränderungen im β -Catenin-Gen bei Cholangiokarzinomen bekannt waren, wurde in dieser Arbeit gezielt das Exon 3 von β -Catenin-Gen bei 19 Adenokarzinomen untersucht. Es konnte keine Mutation beobachtet werden. Genetische Veränderungen im APC-Gen wurden jedoch in verschiedenen Studien festgestellt (siehe Punkt 5.2). Auch E-Cadherin, das bei der Zelladhäsion eine Rolle spielt, wurde in Cholangiokarzinomen untersucht (siehe Punkt 5.2), wobei eine verminderte Expression in Karzinomen beobachtet wurde.

Das Modell beinhaltet somit einige mutagene Ereignisse. Neben einer verminderten Expression von E-Cadherin sind folgende genetischer Veränderungen mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Entstehung von intrahepatischen Cholangiokarzinomen beteiligt:

- Inaktivierung des APC-Gens (Tumorsuppressorgen)
- Inaktivierung des p53-Gens (Tumorsuppressorgen)
- Aktivierende Mutation des K-ras-Gens (Onkogen).

5.2 Mutationen im β -Catenin- oder APC-Gen und die Stellung des E-Cadherins

In der vorliegenden Arbeit wurde das Exon 3 im β -Catenin bei 19 Cholangiokarzinomen mittels Restriktionsenzymverdau und Sequenzierung untersucht und es konnte keine Mutation festgestellt werden.

Genetische Veränderungen im APC-Gen wurden in verschiedenen Studien untersucht. So fanden Cong et al. (2001) bei 11 von 16 (68,8 %) Fällen einen LOH am APC-Gen (Exon 15) in Cholangiokarzinomen. Ebenso beobachteten Kang et al. (1999) mittels Rsa I-Restriktionsenzymverdau (Kraus & Ballhausen, 1992) LOH-Ereignisse bei 4 von 17 (23,5 %) Fällen an diesem Gen (Exon 11), während Ding et al. (1993) bei der Restriktionsanalyse keinen Verlust eines Allels am APC Locus in Cholangiokarzinomen fanden.

In dieser Arbeit wurde der D5S346 Locus (5q21-5q22), welcher sich in der Nähe des APC-Gens (5q21) befindet, untersucht. Bei zwei von neun (22,2 %) Fällen wurde ein

LOH gefunden. Kawaki et al. (2000) fanden auch in 1 von 15 (6,7 %) Fällen einen LOH am D5S346 Locus.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Verlust vom APC-Gen eher an der Entstehung von Cholangiokarzinomen beteiligt ist als eine Mutation im β -Catenin-Gen. Da APC genau wie β -Catenin eine wichtige Komponente des Wnt-Signalwegs ist, hemmt eine genetische Veränderung in einem der beiden Gene die Degradation von β -Catenin, welches dann im Zellkern die Transkription von Zielgenen wie z.B. das MYC-Onkogen aktivieren kann. Die aberrante Genexpression dieser Gene führt zum Verlust der Zellzykluskontrolle (Behrens et al., 1996).

Da im Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg β -Catenin an der Zellmembran an E-Cadherin und α -Catenin bindet, können auch Mutationen an diesen mit β -Catenin interagierenden Genen, die in der vorliegenden Arbeit aber nicht untersucht wurden, einen tumorigenen Effekt auslösen. Cadherine sind Adhäsions- und Signalmoleküle. α -Catenin ist ein aktinbindendes Protein, welches E-Cadherin über β -Catenin mit dem Zytoskelett verbindet.

Verlust von E-Cadherin beeinflusst Morphogenese und invasives Wachstum von Zellen. In vielen Tumoren wurde eine verminderte Expression von E-Cadherin nachgewiesen, welche auf eine verminderte Transkription des kodierenden Gens zurückzuführen ist. Auch wurden somatische Mutationen, die funktionelle Domänen des kodierten Proteins inaktivieren, beobachtet (Wagener, 1999).

Endo et al. (2001) fanden in 4 von 34 (11,8 %) Fällen Punktmutationen in Exon 7 und 8 des E-Cadherin-Gens in intrahepatischen Cholangiokarzinomen. Die Exons 7, 8 und 9 kodieren für die extrazelluläre Domäne des E-Cadherin Proteins, welche für die Zelladhäsion verantwortlich ist. In den vier Fällen mit Mutationen wurde immunhistochemisch eine verminderte Expression von E-Cadherin nachgewiesen. Bereits 1998 berichteten Ashida et al. über eine verminderte Expression von E-Cadherin bei 21 von 47 (45 %) Fällen. Bei ihrer Studie untersuchten sie auch die Expression von β -Catenin, welche ebenfalls bei 27 von 47 (58 %) vermindert war. In diesen Fällen wurden E-Cadherin und β -Catenin weniger im Zytoplasma als an der Zellmembran exprimiert.

Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass β -Catenin im Zytoplasma nicht abgebaut wird, weil Komponenten des Signalwegs wie APC mutiert sind oder β -Catenin selbst

genetisch verändert ist, dann in den Zellkern gelangt und dort akkumuliert oder ein kleiner Bestand an der Zellmembran an E-Cadherin bindet.

Gamallo et al. (1999) wiesen jedoch bei 58 von 69 Karzinomen der Ovarien eine Expression von β -Catenin an der Membran nach, und nur bei den restlichen 11 Fällen konnte eine Kernexpression beobachtet werden.

5.3 Aktivierung/Inaktivierung von Wnt-Komponenten in Cholangiokarzinomen

Das Wnt-Signal hemmt die Phosphorylierung von β -Catenin, APC und Axin durch die GSK3 β über Dishevelled, das im phosphorylierten Zustand mit der DIX-Domäne von Axin assoziiert. Nicht-phosphoryliertes β -Catenin wird nicht durch das 26S Proteasom abgebaut und es kommt zur Transkription bestimmter Gene, die zum Verlust der Zellzykluskontrolle führen. Wird das Wnt-Signal nicht übertragen, hängt der Abbau von β -Catenin von APC, Axin und sich selbst ab. Mutationen an den Bindungsstellen für die GSK3 β im β -Catenin-Gen würden den eigenen Abbau hemmen, ebenso Mutationen an den Bindungsstellen im APC- und Axin-Gen. In Abwesenheit von Axin ist eine Phosphorylierung von β -Catenin nicht möglich. Axin bindet an eine zentrale Region von APC (SAMP-Domäne, die innerhalb der 7 Repeats von 20 Aminosäuren liegt), welche gewöhnlich in den untersuchten Tumorarten deletiert ist, und erhöht so die Phosphorylierung von APC (Ikeda et al., 1998; Hart et al., 1998; Behrens et al., 1998). Überexprimiertes Axin kann trotz mutierten APC den Abbau von β -Catenin induzieren. Dies geschieht vermutlich über einen Feedback-Mechanismus durch ein aktiviertes Wnt-Signal oder einen erhöhten zytoplasmatischen Pool von β -Catenin (Behrens, 2000).

Mutationen im β -Catenin wurden bei Kolon-, Prostata-, Leber- und Endometriumkarzinomen, sowie bei Karzinomen der Ovarien und bei Medulloblastomen beschrieben (Palacios & Gamallo, 1997; Morin et al., 1997; Ilyas et al., 1997; Kitaeva et al., 1997; Iwao et al., 1998; Spark et al., 1998; Voeller et al., 1998; Miyoshi et al., 1998; Fukuchi et al., 1998; Zurawel et al., 1998).

Da in dieser Arbeit keine Mutationen im β -Catenin-Gen gefunden wurden, ist anzunehmen, dass wenn überhaupt der Wnt-Signalweg betroffen ist, eher das APC- oder das Axin-Gen an der Karzinogenese von Cholangiokarzinomen beteiligt ist.

Genetische Veränderungen im APC-Gen bei Cholangiokarzinomen wurden in verschiedenen Arbeiten beobachtet (siehe Punkt 5.2). APC bindet β -Catenin entweder im Kern oder im Zytoplasma und transportiert es zur Zellmembran, wo es entweder an E-Cadherin oder an Axin bindet (Bienz, 1999). Der Verlust von APC würde dann zur Akkumulation von β -Catenin im Kern führen.

Studien über Mutationen im Axin-Gen bei Cholangiokarzinomen wurden bisher nicht veröffentlicht. Da Axin die Phosphorylierung von β -Catenin und APC erleichtert, kann es als ein Tumorsuppressor angesehen werden. In 100 untersuchten primären hepatozellulären Karzinomen und in 6 Leberkarzinom-Zelllinien konnten Satoh et al. (2000) Mutationen, die beide Allele des Axin-Gens inaktivieren, beobachten. In 13 Karzinomen und 2 Zelllinien wurden Mutationen im β -Catenin-Gen gefunden, während in 5 von den restlichen 87 Proben und in den anderen 3 Zelllinien Mutationen im Axin-Gen entdeckt wurden. Diese Mutationen hatten vermutlich ein verkürztes Axin-Protein zur Folge, bei dem die β -Catenin-bindende Region fehlte. In einer Zelllinie wurde weder eine Mutation im β -Catenin-Gen noch im Axin-Gen beobachtet. In den Zelllinien, welche eine Mutation in einem der beiden Gene enthielten, konnte eine erhöhte Bindung des TCF/ β -Catenin-Komplexes an die DNA im Kern nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Mutationen im β -Catenin, APC oder Axin-Gen den Abbau von β -Catenin verhindern und akkumuliertes β -Catenin im Kern als Coaktivator die Transkription bestimmter Gene fördert, die wiederum Apoptose hemmen und gleichzeitig die Proliferation fördern.

Da auch genetische Veränderungen in dem für die GSK3 β -kodierenden Gen die Phosphorylierung von β -Catenin, APC und Axin hemmen würden, wären Untersuchungen an diesem Gen ebenfalls sinnvoll. Sparks et al. (1998) konnten allerdings in einer Reihe von kolorektalen Karzinomen keine Mutationen in dem GSK3 β -Gen nachweisen.

Dishevelled, das als ein positiver Mediator des Wnt-Signalwegs, die Phosphorylierung oben genannter Substrate durch die Assoziation mit Axin hemmt, könnte durch Überexpression zur neoplastischen Transformation führen (Polakis, 2000). Über solche Untersuchungen wurde bisher ebenfalls noch nicht berichtet.

Zukünftige Untersuchungen an Axin, GSK3 β und Dishevelled würden weitere Schlussfolgerungen zulassen.

5.4 Bedeutung der MSI für die Genese von Cholangiokarzinomen

Es stellt sich die Frage, ob multiple somatische Mutationen in einer einzelnen Zelle durch die spontane Mutationsrate verursacht werden können. In menschlichen Zellen liegt die spontane Mutationsrate bei etwa 10^{-7} pro Gen pro Zellgeneration. Wenn man die Gesamtzahl der Zellteilungen im Verlauf eines Lebens berücksichtigt, ergibt sich bei einer mittleren Lebenserwartung eine maximale Zahl von zwei bis drei Mutationen pro Zelle. Durch Erhöhung der Zellzahl und Mutationsrate kann die Wahrscheinlichkeit von Mutationen prinzipiell vergrößert werden (Wagener, 1999).

Loeb und andere bezweifelten, dass alleine durch die Vergrößerung der Zellzahl die Mutationsrate in Tumoren ausreichend erhöht werden kann. Er war der Meinung, dass ein primärer Defekt, der eine genomische Instabilität verursacht, die Wahrscheinlichkeit von Mutationen erhöht. Diese Eigenschaft der Tumorzellen nennt man „Mutator-Phänotyp“ (Loeb et al., 1974). Da ein Mutator-Phänotyp mit Mikrosatelliteninstabilität in Tumoren assoziiert sein kann, wurden in der vorliegenden Arbeit die MSI-Untersuchungen durchgeführt.

Multiple Mutationen einfacher repetitiver DNA-Sequenzen (Mikrosatelliten) lassen sich unter Verwendung entsprechender Gensonden nachweisen. Diese Sequenzen können sowohl expandiert als auch kontrahiert sein. Ihre Mutationsrate liegt zwischen 10^{-6} und 10^{-2} pro Generation (Schlötterer, 2000). Dies spricht dafür, dass die DNA der Tumorzellen während der Replikation eine erhöhte Mutationsrate aufweist. Ein funktionierendes Mismatch-Reparatursystem reduziert die Mutationsrate von Mikrosatelliten auf das 100- bis 1000fache (Strand et al., 1993). Die Instabilität einfacher repetitiver Sequenzen beruht wahrscheinlich auf Defekten im MMR. In Tumoren mit MSI können auch repetitive DNA-Sequenzen in kodierenden oder regulatorischen Sequenzen von Genen verändert sein, wobei es hierdurch in der Regel zur Inaktivierung des Genprodukts kommt. Dadurch können auch Gene betroffen sein, die ebenfalls in Tumoren ohne MSI inaktiviert sein können, wie z.B. das APC-Gen und das p53-Gen (Wagener, 1999).

In dieser Arbeit wurden fünf Gensonden zur Erkennung von MSI verwendet. D2S123, D5S346 und D17S250 sind polymorphe Dinukleotid-Marker, während BAT25 und BAT26 Mononukleotid-Marker sind. BAT26 liegt innerhalb des MSH2-Gens. In dieser Arbeit konnte MSI bei den 19 Tumorproben ausgeschlossen werden. Kawaki et al. (2000) untersuchten 11 Mikrosatelliten-Loci einschließlich die D2S123 und D5S346 Loci und beobachteten nur am D8S261 und D8S258 Loci in 1 von 18 (6 %), sowie am D18S487 Locus in 1 von 14 (7 %) Fällen Cholangiokarzinome Mikrosatelliteninstabilität. Diese Ergebnisse zeigen, dass MSI vermutlich nicht an der Genese von Cholangiokarzinomen beteiligt ist. Allerdings entdeckten sie bei einigen Cholangiokarzinomen LOH an bestimmten Mikrosatelliten-Loci. Am D5S346 Locus wurde in 1 von 15 (6,7 %) Fällen ein LOH-Ereignis beobachtet, während am D2S123 Locus kein LOH entdeckt wurde.

Mirabelli-Primdahl et al. (1999) und Miyaki et al. (1999) erkannten, dass in kolorektalen Karzinomen mit MSI gehäuft β -Catenin-Mutationen im Vergleich zu APC-Mutationen vorkamen. Mirabelli-Primdahl zeigte aber auch, dass in Endometriumkarzinomen diese Korrelation nicht bestand. Da in dieser Arbeit sowohl keine β -Catenin-Mutation als auch keine MSI beobachtet wurde, unterstützen die hier erhobenen Daten diese Theorie und deuten darauf hin, dass Veränderungen im APC-Gen an der Genese von Cholangiokarzinomen vorrangig beteiligt sind.

5.5 Korrelation zwischen LOH am FHIT-Gen und dem p53-Mutationsstatus

Michael & Rajewsky (2001) wiesen darauf hin, dass eine Veränderung im FHIT-Gen (3p14.2) mit dem Auftreten von p53-Mutationen und/oder Defekten im DNA-Reparatursystem korrelieren.

FHIT als ein Tumorsuppressorgen kann durch Deletion innerhalb beider FHIT-Allele inaktiviert werden. Diese Inaktivierung wird durch Fehler im Reparatursystem sowie durch Doppelstrangbrüche infolge von Karzinogendisposition gefördert (Druck et al., 1997; Inoue et al., 1997). Die FRA3B-Region im FHIT-Gen reagiert besonders empfindlich auf Umweltkarzinogene wie Zigarettenrauch und Asbest (Nelson et al., 1998). Mutationen in MMR-Genen können ebenfalls das Ergebnis der Exposition mit Karzinogenen sein (Nagao et al., 1997).

Da eine Schädigung der DNA durch genotoxische Substanzen innerhalb weniger Minuten zu einem Anstieg der zellulären p53-Konzentration führt, könnte man annehmen, dass p53 direkt oder indirekt an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt ist. Kang et al. (1999) wiesen in 10 von 40 (25 %) Fällen intrahepatischer Cholangiokarzinome immunhistochemisch eine Überexpression von p53 nach. Nach dieser Hypothese müsste ein Verlust von p53 durch eine genetische Veränderung zu erhöhten Mutationsraten und einer genomischen Instabilität führen (Lee et al., 1994). Auch ohne Karzinogenexposition geht der Verlust von p53 mit einer genomischen Instabilität einher, wobei in diesem Fall Abweichungen im Chromosomensatz überwiegen (Bischoff et al., 1990).

Einige Studien über Deletionen und Punktmutationen im p53-Gen in Cholangiokarzinomen wurden veröffentlicht (siehe Punkt 5.1).

Es können somit mehrere Ursachen für die genomische Instabilität in p53-negativen Zellen und Tumoren in Frage kommen. Sie kann durch Störungen der Zellzyklusregulation oder auf der Ebene von molekularen Sensoren für Mutationen oder Chromosomenanomalien bzw. anschließender Signalwege verursacht werden. Letztlich könnten auch Mechanismen der DNA-Reparatur defekt sein (Wagener, 1999).

In der Initialphase der homologen Rekombination ist neben p53 auch MSH2 an der Überwachung von Basenfehlpaarungen beteiligt. Da ihre Spezifität unterschiedlich ist, ergänzen sich beide Proteine in ihrer Wirkung. Mäuse mit Tumordisposition, in denen beide Allele sowohl das p53-Gens als auch des MSH2-Gens ausgeschaltet waren, entwickelten wesentlich früher Tumoren als die alleinigen MSH2- oder p53-Knock-out-Tiere. Diese Ergebnisse bestätigten die komplementären Funktionen von p53 und MSH2 (Cranston et al., 1997).

Boldog et al. (1997) beobachteten, dass genomische Deletionen in der 3p14-Region in Tumoren nicht gemeinsam mit MSI auftraten, aber mit dem p53-Status in Zusammenhang standen. Sie untersuchten zehn Tumorzelllinien von Cervixkarzinomen und kolorektalen Karzinomen an sechs Mikrosatelliten-Loci und konnten keine Instabilität feststellen. Weiterhin beobachteten sie die höchste Inzidenz von 3p14-Deletionen bei Cervixkarzinomen mit Veränderungen im p53-Gen. Daraus folgerten sie eine umgekehrte Korrelation zwischen subchromosomalen Deletionen in der 3p14-

Region und MSI. Diese Ergebnisse zeigten, dass MSI vermutlich nicht alleine für die Deletionen verantwortlich sein kann.

In dieser Arbeit wurden 19 Cholangiokarzinome an fünf Mikrosatelliten-Loci untersucht und es konnte Mikrosatelliteninstabilität ausgeschlossen werden. Hierbei wurde auch der BAT26 Locus, welcher im MSH2-Gen liegt, auf MSI kontrolliert.

Ebenso wurde das FHIT-Gen mit den Markern D3S1300 und D3S1234 auf LOH untersucht, wobei in zwei von zehn (20 %) informativen Fällen ein LOH am D3S1300 Locus und in einem von sieben (14 %) informativen Fällen ein LOH am D3S1234 gefunden wurde.

Tannapfel et al. (Pathologisches Institut/Leipzig, 2000) beobachteten bei den 19 Cholangiokarzinomen sechs genetische Veränderungen im p53-Gen. Allerdings wurde nur in einem Fall sowohl eine Deletion in der 3p14-Region als auch eine Mutation im p53-Gen entdeckt. Diese Ergebnisse können die oben genannte Hypothese in geringem Maße bestätigen, d.h. es besteht eine umgekehrte Korrelation zwischen LOH im FHIT-Gen und MSI.

Weitere Studien sind auch hierzu notwendig, um diese Hypothese zu festigen. Da wäre es von Interesse die MMR-Gene genauer zu untersuchen, um feststellen zu können, ob nicht doch ein Defekt in der DNA-Reparatur für die genomische Instabilität verantwortlich ist.

5.6 Ausblick

Menschliche Tumoren können sowohl durch Aktivierung als auch durch Inaktivierung bestimmter Tumorgene (Proto-Onkogene/Tumorsuppressorgene) verursacht werden. Die Entdeckung bzw. die Charakterisierung von Mutationen, die zur Aktivierung oder Inaktivierung dieser Gene führen, hat entscheidend zum Verständnis der Ursachen menschlicher Tumoren beigetragen.

Die erhaltenen Ergebnisse in der hier vorliegenden Arbeit können nicht auf alle intrahepatischen Cholangiokarzinome, die eine seltene Krebsart darstellen, übertragen werden, da die 19 untersuchten Adenokarzinome nicht ausreichen, um statistisch auswertbare Ergebnisse zu erhalten. Weitere Untersuchungen, die den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten, sind sicherlich dazu notwendig. Des Weiteren wurde nur eine

kleine Auswahl von zu untersuchenden Genen getroffen. Natürlich könnten noch andere Gene an der Karzinogenese von Cholangiokarzinomen beteiligt sein wie Regulatoren der Zellzykluskontrolle, Transkriptionsfaktoren oder Rezeptoren mit Wachstumskontrollfunktion, weshalb weitere Untersuchungen auch in dieser Hinsicht folgen müssen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden intrahepatische Cholangiokarzinome (CCs), welche etwa 5-10 % aller primären malignen Lebertumoren ausmachen, auf Mutationen im Exon 3 des β -Catenin-Gens, auf Verlust von konstitutioneller Heterozygotie (LOH) am FHIT-Genlocus sowie auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI) mittels fünf international validierter Gensonden untersucht. Dazu wurden von PD. Dr. med. A. Tannapfel (Institut für Pathologie/Universität Leipzig/Direktor: Prof. Dr. Ch. Wittekind) 19 histopathologisch evaluierte Fälle von CCs zur Verfügung gestellt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine Restriktionsenzymanalyse und Sequenzierung des Exon 3 im β -Catenin-Gen durchgeführt. Das β -Catenin-Gen, welches eine wesentliche Rolle im Wnt-Signalweg spielt, ist ein Proto-Onkogen, das durch Mutation zum Onkogen aktiviert werden kann. In den 19 Tumorproben, aus denen die DNA isoliert werden konnte, wurden genetischen Alterationen in diesem Gen ausgeschlossen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das FHIT-Gen, welches ein Tumorsuppressorgen darstellt, mit Hilfe der polymorphen Marker D3S1300 und D3S1234 an 15 entsprechenden tumorösen und nicht-tumorösen Gewebeproben der CC-Patienten analysiert. Dabei konnten insgesamt drei LOH-Ereignisse nachgewiesen werden.

Im letzten Teil der Arbeit wurden die Cholangiokarzinome auf MSI an den Loci D2S123, D5S346, D17S250, BAT25 und BAT26 untersucht. MSI, welche das Ergebnis eines defekten Mismatch-Reparatursystems (MMR) ist, wurde nicht beobachtet. Allerdings wurden in zwei Tumoren LOH-Ereignisse am D5S346 Locus, der sich in unmittelbarer Nähe des APC-Gens befindet, nachgewiesen. Somit könnte die Inaktivierung des APC-Gens in einigen Fällen zur Entstehung des Cholangiokarzinoms beitragen.

Die vorliegende Arbeit schließt somit Mutationen am β -Catenin-Gen und an MMR-Genen, die zur Karzinogenese von Cholangiokarzinomen hätten beitragen können, aus. Die Ergebnisse deuten jedoch an, dass ein Funktionsverlust von APC und FHIT als Ursachen der Tumorentstehung gesehen werden muss. Weitere molekulargenetische Untersuchungen sind zur genaueren Ursachenfindung notwendig.

7 Literatur

- (1) Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260 (1993) 812-816
- (2) Adler A, Abou-Rebyeh H, Veltzke W, Wiedenmann B, Hintze RE: Diagnostik und endoskopische Therapie beim zentralen Gallengangskarzinom. *Onkologie* 6 (1999) 490-498
- (3) Amos W, Sawcer SJ, Feaks RW, Rubinsztein DC: Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. *Nature Genet* 13 (1996) 390-391
- (4) Ashida K, Terada T, Kitamura Y, Kaibara N: Expression of E-cadherin, α -catenin, β -catenin, and CD44 (standard and variant isoforms) in human cholangiocarcinoma: An immunohistochemical study. *Hepatology* 27 (1998) 974-982
- (5) Barnes LD, Garrison PN, Siprashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingna SW, Croce CM, Ohta M, Huebner K: Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5', 5''-P1, P3-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 35 (1996) 11529-11535
- (6) Beckmann JS, Weber JL: Survey of human and rat MS. *Genomics* 12 (1992) 627-631
- (7) Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W: Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382 (1996) 638-642

- (8) Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W: Functional interaction of an axin homolog, conductin, with β -catenin, APC, and GSK3 β . *Science* 280 (1998) 596-599
- (9) Behrens J: Control of beta-catenin signaling in tumor development. *Ann N Y Acad Sci* 910 (2000) 21-33
- (10) Bienz M: APC: The plot thickens. *Curr Opin Genetics Dev* 9 (1999) 595-603
- (11) Bischoff FZ, Yim SO, Pathak S, Grant G, Siciliano MJ, Giovanella BC, Strong LC, Tainsky MA: Spontaneous abnormalities in normal fibroblasts from patients with Li-Fraumeni cancer syndrome: Aneuploidy and immortalization. *Cancer Res* 50 (1990) 7979-7984
- (12) Boberg KM, Schrupf E, Bergquist A, Broome U, Pares A, Remotti H, Schjolberg A, Spurkland A, Clausen OP: Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: K-ras mutations and Tp53 dysfunction are implicated in the neoplastic development. *J Hepatol* 32 (2000) 374-380
- (13) Boldog F, Gemmill RM, West J, Robinson M, Robinson L, Li E, Roche J, Todd S, Waggoner B, Lundstrom R, Jacobson J, Mullokandov MR, Klinger H, Drabkin HA: Chromosome 3p14 homozygous deletion and sequence analysis of FRA3B. *Hum Mol Genet* 6 (1997) 193-203
- (14) Brentnall TA, Chen R, Lee JG, Kimmey MB, Bronner MP, Haggitt RC, Kowdley KV, Hecker LM, Byrd DR: Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. *Cancer Res* 55 (1995) 4264-4267
- (15) Brentnall TA, Crispin DA, Bronner MP, Cherian SP, Hueffed M, Rabinovitch RS, Rubin CE, Haggitt RC, Boland CR: Microsatellite instability in

- nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res* 56 (1996) 1237-1240
- (16) Chan EF, Gat U, McNiff JM, Fuchs E: A common human skin tumour is caused by activating mutations in β -catenin. *Nature Genet* 21 (1999) 410-413
- (17) Chaudhuri AR, Khan IA, Prasad V, Robinson AK, Ludueña RF, Barnes LD: The tumor suppressor protein Fhit. *J Biol Chem* 274 (1999) 24378-24382
- (18) Cohen AJ, Li FP, Berg S, Marchetto DJ, Tsai S, Jacobs SC, Brown RS: Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *N Engl J Med* 301 (1979) 592-595
- (19) Cong WM, Bakker A, Swalsky PA, Raja S, Woods J, Thomas S, Demetris AJ, Finkelstein SD: Multiple genetic alterations involved in the tumorigenesis of human cholangiocarcinoma: A molecular genetic and clinicopathological study. *J Cancer Res Clin Oncol* 127 (2000) 187-192
- (20) Cranston A, Bocker T, Reitmair A, Palazzo J, Wilson T, Mak T, Fishel R: Female embryonic lethality in mice nullizygous for both Msh2 and p53. *Nat Genet* 17 (1997) 114-118
- (21) De la Chapelle A: Testing tumors for microsatellite instability. *Eur J Hum Genet* 7 (1999) 407-408
- (22) Ding SF, Delhanty JDA, Bowels L, Dooley JS, Wood CB, Habib NA: Loss of constitutional heterozygosity on chromosome 5 and 17 in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 67 (1993) 1007-1010
- (23) Druck T, Hadaczek P, Fu T-B, Ohta M, Siprashvili Z, Baffa R, Negrini M, Kastury K, Veronese ML, Rosen D, Rothstein J, McCue P, Cotticelli MG, Inoue

- H, Croce CM, Huebner K: Structure and expression of the human FHIT gene in normal and tumor cells. *Cancer Res* 57 (1997) 504–512
- (24) Endo K, Ashida K, Miyake N, Terada T: E-Cadherin gene mutations in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Pathol* 193 (2001) 310-317
- (25) Fagotto F, Gluck U, Gumbiner BM: Nuclear localization signal independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β -catenin. *Curr Biol* 8 (1998) 181-190
- (26) Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hiroashi S: β -catenin mutations in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res* 58 (1998) 3526-3528
- (27) Gamallo C, Palacios J, Moreno G, Calvo de Mora J, Suárez A, Armas A: β -catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas: Relationship with β -catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol* 155 (1999) 527-536
- (28) Gramantieri L, Chieco P, Tomaso MD, Masi L, Piscaglia F, Brillanti S, Gaiani S, Valgimigli M, Mazziotti A, Bolondi L: Aberrant fragile histidine triad gene transcripts in primary hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 3468-3475
- (29) Günther K, Brabletz T, Kraus C, Dworak O, Reymond MA, Jung A, Hohenberger W, Kirchner T, Köckerling F, Ballhausen WG: Predictive value of nuclear beta-catenin expression for the occurrence of distant metastases in rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 41 (1998) 1256-1261
- (30) Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P: Downregulation of β -catenin by human axin and its association with the APC tumor suppressor, β -catenin and GSK3 β . *Curr Biol* 8 (1998) 573-581

- (31) Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R, Polakis P: The F-box protein β -TrCP associates with phosphorylated β -catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 9 (1999) 207-210
- (32) He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281 (1998) 1509-1512
- (33) Heasman J, Crawford A, Goldstone K, Garner-Hamrick P, Gumbiner B, McCrea P, Kintner C, Noro CY, Wylie C: Overexpression of cadherins and underexpression of β -catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* 79 (1994) 791-803
- (34) Henderson BR: Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates β -catenin subcellular localization and turnover. *Nature Cell Biol* 2 (2000) 653-660
- (35) Herrmann R, Orth B, Neuhaus P: Gallenblasen- und Gallengangkarzinome. In: Willmanns W, Huhn D, Wilms K (Hrsg): *Internistische Onkologie*. Georg Thieme, Stuttgart, New York, 1994, S. 543-548
- (36) Hsu W, Zeng L, Constantini F: Identification of a domain of axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *J Biol Chem* 274 (1999) 3439-3445
- (37) Huebner K, Hadaczek P, Siprashvili Z, Druck T, Croce CM: The FHIT gene, a multiple tumor suppressor gene encompassing the carcinogen sensitive chromosome fragile site, FRA3B. *Biochim Biophys Acta (Reviews on Cancer)* 1332 (1997) M65-M70
- (38) Huebner K, Garrison PN, Barnes LD, Croce CM: The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. *Annu Rev Genet* 32 (1998a) 7-31

- (39) Huebner K, Druck T, Siprashvili Z, Croce CM, Kovatich A, McCue PA: The role of deletions at the FRA3B/FHIT locus in carcinogenesis. *Cancer Res* 154 (1998b) 200-215
- (40) Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A: Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J* 17 (1998) 1371-1384
- (41) Ilyas M, Tomlison IPM, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF: β -catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 10330-10334
- (42) Inoue H, Ishii H, Alder H, Snyder E, Druck T, Huebner K, Croce CM: Sequence of the FRA3B common fragile region: Implications for the mechanism of FHIT deletions. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 14584 -14589
- (43) Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363 (1993) 558-561
- (44) Itoh K, Krupnik VE, Sokol SY: Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin. *Curr Biol* 8 (1998) 591-594
- (45) Iwao K, Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Kinoshita M, Fukui T, Ishiguro S, Nakamura Y, Miyoshi Y: Activation of the β -catenin gene by interstitial deletion involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer Res* 58 (1998) 1021-1026

- (46) Jonas S, Bechstein WO, Neuhaus P: Chirurgische Therapie des zentralen Gallengangskarzinoms. *Onkologe* 5 (1999) 515-520
- (47) Kang YK, Kim WH, Lee HW, Lee HK, Kim Y: Mutation of p53 and K-ras, and Loss of Heterozygosity of APC in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Lab Invest* 79 (1999) 477-483
- (48) Kaczynski J, Hansson G, Wallerstedt S: Incidence of primary liver cancer and aetiological aspects: A study of a defined population from a low-endemicity area. *Br J Cancer* 73(1996) 128-132
- (49) Kawaki J, Miyazaki M, Ito H, Nakagawa K, Shimizu H, Yoshidome H, Uzawa K, Tanzawa H, Nakajima N: Allelic loss in human intrahepatic cholangiocarcinoma: Correlation between chromosome 8p22 and tumor progression. *Int J Cancer* 88 (2000) 228-231
- (50) Kishida S, Yamamoto H, Hino S, Ikeda S, Kishida M, Kikuchi A: DIX domains of dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate β -catenin stability. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 4414 -4422
- (51) Kitaeva MN, Grogan L, Williams JP, Dimond E, Nakahara K, Hausner P, DeNobile JW, Soballe PW, Kirsch IR: Mutations in β -catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res* 57 (1997) 4478-4481
- (52) Kitagawa M, Hatakeyama S, Shirane M, Mutsumoto M, Ishida N, Hattori K, Nakamichi I, Kikuchi A, Nakayama K: An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of β -catenin. *EMBO J* 18 (1999) 2401-2410
- (53) Kraus C, Ballhausen WG: Two intragenic polymorphisms of the APC-gene detected by PCR and enzymatic digestion. *Hum Genet* 88 (1992) 705-706

- (54) Kraus C, Liehr T, Hülsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH, Ballhausen WG: Localisation of the human β -Catenin gene (CTNNB1) to 3p21: A region implicated in tumor development. *Genomics* 23 (1994) 272-274
- (55) Kubicka S, Manns MP: Das Gallenblasen- und Gallengangskarzinom. *Internist* 41 (2000) 841-847
- (56) Lee JM, Abrahamson JL, Kandel R, Donehower LA, Bernstein A: Susceptibility to radiation-carcinogenesis and accumulation of chromosomal breakage in p53 deficient mice. *Oncogene* 9 (1994) 3731-3736
- (57) Lee JS, Ishimoto A, Yanagawa S: Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J Biol Chem* 274 (1999) 21464 - 21470
- (58) Lengauer Ch, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instability in human cancers. *Nature* 396 (1998) 643-649
- (59) Levison G, Gutman GA: Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 4 (1987) 202-221
- (60) Lima CD, Klein MG, Hendrickson WA: Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family. *Science (Washington DC)* 278 (1997) 286-290
- (61) Lindahl T, Karran P, Wood RD: DNA excision repair pathways. *Curr Opin Genet Dev* 7 (1997) 158-159
- (62) Litt K, Luty JA: A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44 (1989) 397-401

- (63) Liu C, Kato Y, Zhang Z, Do VM, Yankner BA, He X: β -TrCP couples β -catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 6273-6278
- (64) Loeb LA, Springgate CF, Battula N: Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer Res* 34 (1974) 2311-2321
- (65) Maniatis T: A ubiquitin ligase complex essential for the NF- κ B, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. *Genes Dev* 13 (1999) 505-510
- (66) Michael D, Rajewsky MF: Induction of the common fragile site FRA3B does not affect FHIT expression. *Oncogene* 20 (2001) 1798-1801
- (67) Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri C, Dale D, Holowaty E, Bapat B, Gallinger S, Redston M: Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res* 59 (1999) 3346-3351
- (68) Miyaki M, Iijima T, Kimura J, Yasuno M, Mori T, Hayashi Y, Koike M, Shitara N, Iwama T, Kuroki T: Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 59 (1999) 4506-4509
- (69) Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Nakamura Y: Activation of β -catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alteration involving exon 3. *Cancer Res* 58 (1998) 2524 - 2527
- (70) Modrich P: Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* 25 (1991) 229-253

- (71) Modrich P: Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 272 (1997) 24727-24730
- (72) Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW: Activation of β -catenin-Tcf signalling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* 275 (1997) 1787-1790
- (73) Nagao M, Ushijima T, Toyota M, Inoue R, Sugimura T: Genetic changes induced by heterocyclic amines. *Mutat Res* 376 (1997) 161-167
- (74) Nakamura T, Hamada F, Ishidate T, Anai K, Kawahara K, Toyoshima K, Akiyama T: Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with β -catenin, GSK-3 β and APC and reduces the β -catenin level. *Genes Cells* 3 (1998) 395-403
- (75) Nelson HH, Wiencke JK, Gunn L, Wain JC, Christiani DC, Kelsey KT: Chromosome 3p14 alterations in lung cancer: Evidence that FHIT exon deletion is a target of tobacco carcinogens and asbestos. *Cancer Res* 58 (1998) 1804 -1807
- (76) Noguchi T, Müller W, Wirtz HC, Willers R, Gabbert HE: FHIT gene in gastric cancer: Association with tumour progression and prognosis. *J Pathol* 188 (1999) 378-381
- (77) Nowell PC: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194 (1976) 23-28
- (78) Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K: The human FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site in renal carcinoma associated translocation breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 84 (1996) 587-597

- (79) Orford K, Crockett C, Jenson JP, Weissman AM, Byers SW: Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of β -catenin. *J Biol Chem* 272 (1997) 24735-24738
- (80) Ozawa M, Baribault H, Kemler R: The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 8 (1989) 1711-1717
- (81) Palacios J, Gamallo C: Mutations in the β -catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 58 (1998) 1344 -1347
- (82) Peifer M, Pai LM, Casey M: Phosphorylation of the Drosophila adherens junction protein Armadillo: roles for wingless signal and zeste-white 3 kinase. *Dev Biol* 166 (1994) 543-556
- (83) Peltomäki P, de la Chapelle A: Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Adv Cancer Res* 71 (1997) 93-119
- (84) Peters JM, McKay RM, McKay JP, Graff JM: Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* 401 (1999) 345-350
- (85) Piao Z, Kim H, Jeon BK, Lee WJ, Park C: Relationship between loss of heterozygosity of tumor suppressor genes and histologic differentiation in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 80 (1997) 865-872
- (86) Polakis P: Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14 (2000) 1837-1851
- (87) Rassool FV, McKeithan TW, Neilly ME, van Melle E, Espinosa R, Le Bean MM: Preferential integration of marker DNA into the chromosomal fragile site at 3p14.2: A novel approach to cloning fragile sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 6657-6661

- (88) Rosin-Arbesveld R, Townsley F, Bienz M: The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature* 406 (2000) 1009-1012
- (89) Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P: Binding of GSK3 β to the APC- β -catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272 (1996) 1023-1026
- (90) Sakanaka C, Williams LT: Functional domains of axin. Importance of the C terminus as an oligomerization domain. *J Biol Chem* 274 (1999) 14090-14093
- (91) Saletti P, Edwin ID, Pack K, Cavalli F, Atkin WS: Microsatellite instability: Application in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Ann Oncol* 12 (2001) 151-160
- (92) Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y: AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 24 (2000) 245-250
- (93) Schlötterer C: Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109 (2000) 365-371
- (94) Sia EA, Jinks-Robertson S, Petes TD: Genetic control of microsatellite stability. *Mutat Res* 383 (1997) 61-70
- (95) Smalley MJ, Sara E, Paterson H, Naylor S, Cook D, Jayatilake H, Fryer LG, Hutchinson L, Fry MJ, Dale TC: Interaction of axin and dvl-2 proteins regulates dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *EMBO J* 18 (1999) 2823-2835
- (96) Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B: Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: A review. *Int J Cancer* 57 (1994) 1-9

- (97) Sozzi G, Huebner K, Croce CM: FHIT in human cancer. *Adv Cancer Res* 74 (1998) 141-166
- (98) Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: Mutational analysis of APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 58 (1998) 1130-1134
- (99) Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD: Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365 (1993) 274 -276
- (100) Sturzeneker R, Bevilacqua RAU, Haddad LA, Simpson AJG, Pena SDJ: Microsatellite instability in tumors as a model to study the process of microsatellite mutations. *Hum Mol Gen* 9 (2000) 347-352
- (101) Suto T, Habano W, Sugai T, Uesugi N, Funato O, Kanno S, Saito K, Nakamuro Si: Aberrations of the K-ras, p53, and APC genes in extrahepatic bile duct cancer. *J Surg Oncol* 73 (2000) 158-163
- (102) Tannapfel A, Weinans L, Geissler F, Schutz A, Katalinic A, Kockerling F, Hauss J, Wittekind C: Mutations of p53 tumor suppressor gene, apoptosis, and proliferation in intrahepatic cholangiocellular carcinoma of the liver. *Dig Dis Sci* 45 (2000) 317-324
- (103) Tannapfel A, Wittekind C: Anatomie und Pathologie des intrahepatischen und extrahepatischen Gallengangskarzinoms. *Pathologe* 21 (2001) 114-123
- (104) Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260 (1993) 816-819
- (105) Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart, LJ, Roche PC, McDonnell SK, Schaid DJ, Vockley CW, Michels VV; Farr GH Jr, O'Connell MJ:

- Microsatellite instability in colorectal cancer: Different mutator phenotypes and the principal involvement of h MLH1. *Cancer Res* 58 (1998) 1713-1718
- (106) Thomas C: *Histopathologie: Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie*. 12.Aufl. Schattauer, Stuttgart, New York, 1998, S.180
- (107) Voeller HJ, Truica CI, Gelman EP: β -catenin mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 58 (1998) 2520-2523
- (108) Voravud N, Foster CS, Gilbertson JA, Sikora K, Waxman J: Oncogene expression in cholangiocarcinoma and in normal hepatic development. *Hum Pathol* 20 (1989) 1163-1168
- (109) Wagener C: *Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren*. 2.Aufl. Georg Thieme, Stuttgart, New York, 1999, S. 186-190
- (110) Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW: The SCF β -TrCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B α and β -catenin and stimulates I κ B α ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 13 (1999) 270-283
- (111) Wittekind C, Tannapfel A: Anatomie und Pathologie des Gallengangskarzinom. *Onkologie* 5 (1999) 482-489
- (112) Wodarz A, Nusse R: Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14 (1998) 59-88
- (113) Yokoya F, Imamoto N, Tachibana T, Yoneda Y: β -catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner. *Mol Biol Cell* 10 (1999) 1119-1131
- (114) Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT: The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of β -catenin is regulated

in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 10 (1996) 1443-1454

(115) Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C, Raffel C: Sporadic medulloblastomas contain oncogenic β -catenin mutations. *Cancer Res* 58 (1998) 896-899

8 Thesen

- 1) Die intrahepatischen Cholangiokarzinome machen etwa 5-10 % aller primären bösartigen Lebertumoren aus.
- 2) In Cholangiokarzinomen wurden verschiedene genetische Veränderungen in bestimmten Genen, wie dem APC- und p53-Gen beobachtet.
- 3) Mutationen im β -Catenin-Gen, die zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs führen, wurden bei verschiedenen Tumorarten, wie z.B. bei Leber- und Kolonkarzinomen beschrieben.
- 4) Intrahepatische Cholangiokarzinome weisen keine genetischen Alterationen in der Exon 3-spezifischen β -Catenin-Sequenz auf.
- 5) Die FRA3B-Region des FHIT-Gens ist extrem anfällig für genetisches Rearrangement, wofür bereits entdeckte Deletionen und veränderte Transkripte in untersuchten Tumorarten sprechen.
- 6) In 19 intrahepatischen Cholangiokarzinomen wurde in zwei Tumoren am D3S1300 Locus und in einem Tumor am D3S1234 Locus ein LOH-Ereignis beobachtet.
- 7) Mikrosatelliteninstabilität als Konsequenz eines defekten Mismatch-Reparatursystems wurde bereits in Tumoren des Magens, Pankreas- und Gallensystems u.a. gefunden.
- 8) Mikrosatelliteninstabilität konnte mittels der Gensonden D2S123, D5S346, D17S250, BAT25 und BAT26 in 19 intrahepatischen Cholangiokarzinomen ausgeschlossen werden.

- 9) In 19 untersuchten intrahepatischen Cholangiokarzinomen wurde in zwei Tumoren ein LOH-Ereignis am D5S346 Locus beobachtet.

- 10) Da in dieser Arbeit keine Mutation im β -Catenin-Gen gefunden wurde, ist anzunehmen, dass wenn überhaupt der Wnt-Signalweg betroffen ist, eher das APC- oder Axin-Gen an der Karzinogenese von intrahepatischen Cholangiokarzinomen beteiligt ist.

- 11) Eine Korrelation zwischen Deletionen in der 3p14-Region und Mutationen im p53-Gen, sowie eine umgekehrte Korrelation zwischen LOH am FHIT-Gen Locus und Mikrosatelliteninstabilität wäre denkbar.

EILEEN KOCH

PERSÖNLICHE ANGABEN:

- Staatsangehörigkeit: Deutsch
- Geburtsdatum: 03.04.1979
- Geburtsort: Halle/Saale
- Eltern: Ulf und Silvia Koch

SCHULE:

- 1985 – 1987 Jurie-Gagarin-POS
- 1987 – 1991 Juliot-Curie-POS
- 1991 – 1997 Domgymnasium Haus 1 mit Abschluss Abitur

STUDIUM:

- Ab Oktober 1997 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- September 1999 Ärztliche Vorprüfung
- August 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Oktober 2000 bis Januar 2002 Doktorarbeit

TÄTIGKEITEN NEBEN DEM STUDIUM:

- November 1999 bis September 2000 Pflegerische Nebentätigkeit im Krankenhaus Bergmannstrost in Halle
- November 2000 bis Juni 2001 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Gentechnik im Universitätsbiozentrum
- Ab August 2001 Studentische Aushilfe in der Krankenpflege im Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara

SPRACHKENNTNISSE:

Russisch, Englisch, Latein und Spanisch

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Zuhilfenahme unzulässiger Hilfsmittel angefertigt zu haben. Wörtlich oder dem Sinne nach übernommene Ausführungen sind so gekennzeichnet, dass Missverständnisse über die geistige Urheberschaft ausgeschlossen sind.

Merseburg, den 10. Januar 2002

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. W. G. Ballhausen für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die gute Betreuung und den fachlichen Rat während der Durchführung der Arbeit bedanken.

Ich danke auch Herrn Dr. W. Fiedler für das Interesse an dieser Arbeit, der ständigen Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der Arbeit im Labor und während des Verfassens der Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes und ganz besonders bei Frau Dominique Quinque und Frau Dana Reinicke für die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen praktischen Hinweise bedanken.