

Abteilung für Klinische Chemie,
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin,
Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
Direktor: Prof. Dr. Christoph Wagener

„Charakterisierung früher molekularer Veränderungen während der kolorektalen
Tumorentwicklung: Relation der dysregulierten CEACAM1-Expression zum
„Multi-Step-Modell“ der Karzinogenese.“

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Juliane Günther
aus Frankfurt

Hamburg, 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 14.August 2001

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. M. Neumaier

Korreferent: Prof. Dr. Ch. Wagener

Verwendete Abkürzungen

bp	base pair (Basenpaare)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
g	Gramm
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
kDa	kiloDalton
M	Marker
min	Minute
mA	Milliampere
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messengerRNA
N	Normalprobe
pmol	Pikomol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
RNA	Ribonukleinsäure
t-RNA	transfer-RNA
RT	reverse Transkriptase
SDS	sodium dodecyl sulfate
Vol	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1. Kolorektale Karzinogenese	1
1.1 Früheste phänotypische Veränderungen	1
1.2 Früheste genotypische Veränderungen	1
2. Zelladhäsionsmoleküle (C-CAMs)	2
3. Die CEACAM-Genfamilie	4
4. CEACAM1	6
4.1 Strukturelle und experimentell-funktionelle Besonderheiten	7
4.2 Potentielle biologische Funktionen von CEACAM1	7
4.3 Isoformen von CEACAM1	8
4.4 CEACAM1 und die Karzinogenese	8
5. Das Adenomatosis Polyposis Coli-Gen (APC)	9
5.1 Eigenschaften der APC-Genmutation	10
5.2 Lokalisation der APC-Genmutationen	10
5.3 Keimbahnmutationen	10
5.4 Somatische Mutationen	11
5.5 Relevanz der APC-Genmutation für die kolorektale Karzinogenese	11
6. Problemstellung und Ziel der Arbeit	13

II. Material und Methoden

II.1 Materialien und Bezugsquellen	14
1. PCR-Reagenzien, Enzyme und Kits	14
2. Reagenzien	14
3. Puffer und Lösungen	15
4. Allgemeine Labormaterialien und Plastikartikel	18
5. Laborgeräte	19
6. DNA / RNA	20
6.1 DNA für Sensitivitätsversuch	22
7. Oligonukleotide	23

II.2 Methoden	24
1. Präparation der DNA	24
1.1 Neutralisierung des pH-Wert	24
1.2 Entfernung organischer Rückstände	25
1.3 Proteinase K-Behandlung	25
1.4 Phenol / Chloroform-Extraktion	26
1.5 Präzipitation der DNA	26
1.6 Aufreinigen der gewonnenen DNA	26
1.7 Aufnehmen der DNA in TE-Puffer	27
2. DNA-Gelelektrophorese	27
2.1 Anfertigung, Zweck und Anwendung eines Agarosegels	27
2.2 Gelelektrophorese der extrahierten DNA	28
3. Protein Truncation Test (PTT)	29
3.1 Prinzip des PTT	29
3.2 APC-Gen-spezifischer PTT	31
3a. Reverse Transkription	32
3b. Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
3b.1 PCR von Exon1-14	32
3b.1.1 Gelelektrophorese der Exon1-14 PCR-Fragmente	33
3b.2 PCR von Exon15	33
3c. <i>in vitro</i> Transkriptions-Reaktion	34
3d. <i>in vitro</i> Biotin-Translations-Reaktion	35
3e. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3e.1 Prinzip der SDS-PAGE	36
3e.2 SDS-PAGE der <i>in vitro</i> translatierten Proteine	36
3f. Western Blot	38
3g. Chemilumineszenz der Proteine	39
3g.1 Prinzip der Chemilumineszenz-Reaktion	39
3g.2 Detektion der biotinylierten Proteine	39
a. Blocken der Membran	39
b. Streptavidin-POD-Behandlung	40
c. Waschen der Membran	40
d. Detektion der Proteine	40
4. Sequenzierung	40

5. Sensitivitätstest	41
6. Methoden der CEACAM1-Expressionsbestimmung	42

III. Ergebnisse

1. Systematik der Proben	43
2. RT-PCR von Exon1-14 (Segment1)	43
3. DNA-Extraktion	44
4. PCR-Produkte der Segmente1 bis 5	44
4.1 PCR-Produkte des Segment1	44
4.2 PCR-Produkte der Segmente des Exon15	45
4.2.1 PCR-Produkte des Segment 2	45
4.2.2 PCR-Produkte des Segment 3	46
4.2.3 PCR-Produkte des Segment 4	47
4.2.4 PCR-Produkte des Segment 5	48
5. <i>in vitro</i> Transkription	49
6. Autoradiographien	50
6.1 Exon1-14 (Segment1)	51
6.2 Segment 2	52
6.3 Segment 3	57
6.4 Segment 4	63
6.5 Segment 5	64
7. Zusammenfassung der Ergebnisse	65
8. Sensitivitätstest	67

IV. Diskussion

1. Das „Multi-Step-Modell“ der kolorektalen Karzinogenese	70
1.1 Schwierigkeiten der APC-Genanalytik	71
1.1.1 Definitive Methoden	71
a. Sequenzanalyse	71
1.1.2 Screening Methoden	72

a. SSCP-Analyse	72
b. DGGE-Analyse	72
c. RNase-Protektions-Analyse	73
d. PTT	73
d.1 Alternatives Splicing der Exons1-14	74
d.2 Sensitivitätstest des PTT	74
1.2 Wertung der verwendeten Methoden zur APC-Genanalytik	75
a. PTT-PCR	75
a.1 Optimierung der PCR-Bedingungen	75
a.2 Bedeutung PCR-verursachter Mutationen	75
b. PTT – <i>in vitro</i> Transkription	76
2. Früheste genotypische Veränderungen in der kolorektalen Karzinogenese	76
2.1 Funktionen des APC-Genproduktes	76
2.2 Catenine	77
2.2.1 Interaktion des β -Catenin mit dem APC-Protein	79
2.2.2 Prävalenz von Mutationen im APC- und β -Catenin-Gen	80
2.2.3 Wertung der Ergebnisse hinsichtlich einer β -Catenin-Genmutation	80
3. Früheste phänotypische Veränderungen in der kolorektalen Karzinogenese	81
3.1 Klassifizierung und Merkmale der ACF	81
3.2 ACF-Entstehung	81
3.3 ACF-Eigenschaften	82
4. Deutung der Ergebnisse unter Einbeziehung des aktuellen Forschungsstand	84
4.1 APC-Genmutation	84
4.2 Korrelation der CEACAM1-Dysregulation mit der APC-Genmutation	84
4.3 CEACAM1 – ein Zwischenschritt von Hyperplasie zu Dysplasie?	84
V. Zusammenfassung	87
VI. Literaturverzeichnis	88
Danksagungen	101
Lebenslauf	102
Erklärung	103

I. Einleitung

1. Kolorektale Karzinogenese

Die kolorektale Karzinomentwicklung ist ein Stufenprozeß. Von KINZLER und VOGELSTEIN wurde 1996 nach Korrelation unterschiedlicher Tumorstufen mit genetischen Veränderungen, das sogenannte „Multi-Step-Modell“ der Karzinogenese aufgestellt, welches aktuell akzeptiert ist. Demnach folgt die Transition von Normal- zu Tumorgewebe bestimmten Gesetzmäßigkeiten. Durch schrittweise Akkumulation von Mutationen spezifischer Gene, welche Zellteilung, Apoptose und Reparatur von Gendefekten steuern (RAFTER et al., 1998), entsteht das Kolonkarzinom (FEARON et al., 1990). Daneben sind quantitative Veränderungen der Genexpression zu verzeichnen, wie z.B. bei Zelladhäsionsmolekülen (BIRCHMEIER et al., 1995, VALIZADEH et al., 1997).

1.1 Früheste phänotypische Veränderungen

Die frühesten morphologisch sichtbaren Veränderungen der Kolonschleimhaut sind die sogenannten „atypic crypt foci“ oder „aberrant crypt foci“ (ACF) (McLELLAN et al., 1991, PRETLOW et al., 1993). Sowohl hyperplastische, als auch dysplastische ACF sind identifiziert worden (OTORI et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass ACF Vorläufer von hyperplastischen und von adenomatösen Polypen sein können (RONCUCCI et al., 1998).

1.2 Früheste genotypische Veränderungen

Auf genetischer Ebene wurden als früheste molekulare Ereignisse in der Entwicklung von kolorektalen Neoplasien Mutationen des Adenomatosis-Polyposis-Coli-Gens (APC-Gen) und des k-ras-Gens identifiziert (SMITH et al., 1994).

K-ras-Mutationen können in einem Großteil der Fälle in hyperplastischen Läsionen nachgewiesen werden (PRETLOW et al., 1993). Da hyperplastische ACF in der Regel einer Regression unterliegen (SHPITZ et al., 1996), sind diese Mutationen jedoch lediglich ein transientes unkritisches molekulares Ereignis. Hyperplasien zeigen keine APC-Genmutation.

Für das APC-Gen wurde hingegen in dysplastischen ACF des Kolons eine komplette Inaktivierung gefunden (JEN et al., 1994, OTORI et al., 1998). Da dieses Ereignis in zunehmendem Maße in fortgeschrittenen Tumorstadien gefunden werden kann, ist die APC-Genmutation somit eine persistierende kritische molekulargenetische Veränderung. Sie gilt daher als Schlüsselereignis und wesentliche Voraussetzung für die kolorektale Karzinogenese.

Der Zeitpunkt des Auftretens der APC-Genmutationen wird in der Literatur übereinstimmend im Stadium einer Dysplasie der Kolonschleimhaut angegeben (JEN et al., 1994, SMITH et al., 1994, SORENSEN et al., 1997, OTORI et al., 1998, 1998, PRETLOW & PRETLOW, 1998). Dysplastische ACF werden daher als wichtige Vorläufer für Kolonkarzinome betrachtet (SIU et al., 1997).

Es wird vermutet, dass Defekte des APC-Gens mit der Transition vom ACF zum Adenom assoziiert sind (DE FILIPPO et al., 1998).

Eine reine Hyperplasie der Kolonmukosa wird dagegen nicht als prämaligene Veränderung angesehen.

2. Zelladhäsionsmoleküle (C-CAMs)

Zelladhäsionsmoleküle (engl. cell-cell adhesion molecules, C-CAMs) sind Rezeptoren bzw. Liganden, die sich auf der Zelloberfläche befinden. Sie sind überwiegend transmembran verankert und mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden. Diese multifunktionalen Moleküle sind für die Zellerkennung, die Adhäsion der Zellen untereinander und somit zur Erhaltung eines Zellverbands essentiell. C-CAMs regeln die Beziehung benachbarter Zellen im Zellverband. Sie nehmen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion ein.

Es werden zwei Klassen von Adhäsionsmolekülen unterschieden. Zum einen gibt es die Gruppe der sogenannten Cadherine, die zur Vermittlung der Zelladhäsion Calcium benötigen und zum anderen die Gruppe der Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie. Sie wird so genannt, weil ihre Vertreter eine oder mehrere immunglobulinähnliche Domänen besitzen, wie sie am besten charakterisiert bei Antikörper-Molekülen vorkommen. Sie vermitteln eine calcium-unabhängige Zelladhäsion. Zu ihnen gehört unter anderem das N-CAM (engl. neural cell adhesion molecule).

Der intrazelluläre Anker der Cadherine zum Zytoskelett der Zelle wird reguliert durch die dynamische Assoziation mit zytoplasmatischen Proteinen, den sogenannten Cateninen. Diese werden wiederum durch Tyrosinphosphorylierung reguliert. Eine Phosphorylierung der Catenine bewirkt ein Auseinanderweichen der Zellverbindungen. Die Catenine stellen somit ein wichtiges Zwischenglied in der Signaltransduktion dar (ALBERLE et al., 1996).

Adhäsionsmoleküle übernehmen eine Schlüsselrolle in der Organogenese. Sie sind für die Bildung und Aufrechterhaltung von geordneten Gewebeverbänden verantwortlich (EDELMAN et al., 1991). In malignen Tumorgeweben geht im Vergleich zu Normalgeweben die Verbindung bzw. der Kontakt der Zellen untereinander verloren, welches mit einem begleitenden Verlust oder einer veränderten Expression von Zelladhäsionsmolekülen einhergeht. Die Ausprägung der interzellulären Verbindungen in malignen Tumoren korreliert mit deren Differenzierungsgrad und dem invasivem Potential (HEDRICK et al., 1993). Ein hochdifferenzierter Tumor besitzt im Gegensatz zu niedrigdifferenzierten Tumoren einen besseren Zusammenhalt der Zellen untereinander und ist weniger invasiv. Permanente oder vorübergehende molekulare Mechanismen, können zu einer Herabsetzung oder zu einem Verlust von Zellverbindungen epithelialer Zellen führen (BIRCHMEIER et al., 1995). Zum Beispiel resultiert eine Downregulation von dem Zelladhäsionsmoleküle E-Cadherin in einer Beeinträchtigung der Zelljunctionen und dementsprechend in einer eingeschränkten Signaltransduktion. Ein weiteres Beispiel ist die Interaktion zwischen dem zellverbindenden Junctionsprotein beta-Catenin mit dem Tumorsuppressorgenprodukt des Adenomatosis polyposis coli-Gens. Ist diese Interaktion durch ein mutiertes beta-Catenin-Protein gestört, kommt es zu einer verstärkten Phosphorylierung dieses Proteins. Dies zieht wie schon zuvor erwähnt einen Verlust der Zelladhäsion nach sich. Liegt die Mutation im APC-Gen, verliert das APC-Protein die Fähigkeit, beta-Catenin zu binden und dadurch zu regulieren. Durch die Anreicherung des beta-Catenins kommt es zu einer Aktivierung von Genen, die für unter anderem für die Tumorprogression verantwortlich sind. Darauf wird später noch genauer eingegangen.

Es kommt somit zu einer höheren Mobilität von Tumorzellen und zu einem Fortschreiten von malignen Tumoren in Richtung eines invasiven Stadiums (BIRCHMEIER et al., 1995). Es ist bezeichnend, dass eine Veränderung der Expression und zellulären Lokalisation von Cateninen bereits in frühesten dysplastischen

Kolonläsionen auftreten und somit ihre Aufgabe der Erhaltung der interzellulären Adhäsion nicht erfüllen können (VALIZADEH et al.,1997).

3. Die CEACAM-Genfamilie

Die Familie des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) wird neuerdings CEACAM-Familie genannt. Sie gehört zur Immunglobulin-Superfamilie, da die Mitglieder aus immunglobulin-ähnlichen Domänen aufgebaut sind. Die CEACAM-Familie besteht aus einer Reihe hochglykosylierter Proteine, deren Hauptvertreter in der Schleimhaut des Kolons exprimiert werden. Sie machen einen großen Anteil der lumengerichteten Glykokalixschicht der Zellen aus und könnten somit unter anderem eine Schutzfunktion der Mukosa darstellen (siehe Tabelle I.2). Die CEACAM-Genfamilie liegt auf dem langen Arm von Chromosom 19 und besteht aus 29 Genen, die neben der CEA-Subgruppe auch die Gene der „pregnancy-specific glycoproteins“ (PSG) umfassen (THOMPSON, 1995, HAMMARSTROM, 1999). Für sieben Vertreter der CEA-Subgruppe wurde eine Expression auf mRNA- sowie auf Proteinebene gezeigt. Tabelle I.1 dient der Orientierung in Bezug auf die Systematik der Genfamilie, da in der Vergangenheit die Nomenklatur der einzelnen Mitglieder uneinheitlich und wechselhaft war.

Tabelle I.1 abgeändert nach BEAUCHEMIN et al., Exp.Cell.Res., 252,243-249, (1999)

alter Name	neue Gen-Bezeichnung	neue Protein-Bezeichnung
BGP1, CD66a	<i>CEACAM1</i>	CEACAM1
CGM1, CD66d	<i>CEACAM3</i>	CEACAM3
CGM7	<i>CEACAM4</i>	CEACAM4
CEA, CD66e	<i>CEACAM5</i>	CEA
NCA, NCA 50/90, CD66c	<i>CEACAM6</i>	CEACAM6
CGM2	<i>CEACAM7</i>	CEACAM7
CGM6, CD66b	<i>CEACAM8</i>	CEACAM8

Abkürzungen:

BGP: steht für „biliary glycoprotein“, welches von SVEDBERG 1976 erstmals in der menschlichen Galle beschrieben wurde

CGM: CEA gene family member

NCA: non-specific crossreacting antigen

Die biologischen Funktionen der einzelnen Mitglieder der CEA-Familie sind bislang nicht endgültig geklärt und wahrscheinlich auch uneinheitlich. Teilweise werden sie sehr gewebespezifisch (CEACAM5 und CEACAM8), aber auch weitverbreitet (CEACAM1 und CEACAM6) exprimiert. Tabelle I.2. dient der Veranschaulichung der einzelnen beschriebenen Funktionen der jeweiligen CEA-Familienmitglieder.

Tabelle I.2 abgeändert nach BEAUCHEMIN et al., Exp.Cell.Res., 252,243-249, (1999)

Bezeichnung	diskutierte Funktion
<i>CEACAM1</i>	Adhäsion (NEUMAIER et al., 1993), Signaltransduktion (AFAR et al., 1992, BRUMMER et al., 1995), Tumorsuppressorfunktion (KUNATH et al., 1995, HUBER et al., 1999), Rezeptorfunktion (SAEKI et al., 1998) für bakterielle Pathogene (FRANGSMYR et al., 1999) wie <i>N. gonorrhoe</i> (BOS et al., 1997, CHEN et al., 1997); das murine Homolog ist der Rezeptor des Maus-Hepatitisvirus (ROSENBERG et al., 1993, DVEKSLER et al., 1995, HENSLEY et al., 1998), Angiogenese (HUANG et al., 1999, ERGUN et al., 2000)
<i>CEACAM3</i>	Signaltransduktion, Adhäsion (BRANDRIFF et al., 1992, THOMPSON et al., 1993)
<i>CEACAM4</i>	unbekannt

<i>CEACAM5</i>	Adhäsion (STOCKS et al., 1996, OIKAWA et al., 1992), Glykokalixaufbau (NEUMAIER et al., 1988, BENCHIMOL et al., 1989), Immunsuppression (EADES-PERNER et al., 1994, HAMMARSTROM et al. 1999), Rezeptorfunktion (CHEN et al., 1997, BOS et al., 1997)
<i>CEACAM6</i>	Adhäsion, Glykokalixaufbau, Rezeptorfunktion (HANENBERG et al., 1994)
<i>CEACAM7</i>	Tumorsuppressorfunktion (THOMPSON et al., 1994, SCHOLZEL et al., 2000), Virusrezeptor (DVEKSLER et al., 1993, NEDELLEC et al., 1994)
<i>CEACAM8</i>	unbekannt Marker für chronisch myeloische Leukämie, akute lymphatische Leukämie-Zelllinien (WATT et al., 1991, BERLING et al., 1990, HUNAKOVA et al., 1994)

Die aufgeführten Funktionen sind teils in Gewebekulturrexperimenten mit transfizierten Zelllinien gezeigt (Zelladhäsion), teils aus tierexperimentellen Studien (Tumorsuppressorfunktion in der Maus, Rezeptorfunktion) abgeleitet oder in nativen menschlichen Untersuchungsproben (Tumorsuppressorfunktion, bakterielle Adhäsion) gezeigt worden.

4. CEACAM1

CEACAM1 gehört zu der Gruppe von Adhäsionsmolekülen. Unter den Mitgliedern der CEACAM-Familie nimmt es eine besondere Rolle ein, denn es scheint sich evolutionär um das am stärksten konservierte Familienmitglied zu handeln. Ein hoch homologes Gen, welches als C-CAM bezeichnet wird, läßt sich in Nagern darstellen (EDLUND et al., 1993, NEDELLEC et al., 1995, HUNTER et al., 1998, COMPTON et al., 1998).

Eine ältere Bezeichnung für CEACAM1 war daher auch C-CAM. Das durch homophile Interaktion agierende CEACAM1 wird in Zellen epithelialen und myeloiden Ursprungs exprimiert (PRALL et al., 1996). In normaler Darmmukosa beginnt die Expression des CEACAM1-Gens im oberen Abschnitt der Kolonkrypte, dem reifen superfizialen absorptiven Epithel, wohingegen sie in der replikativen Zone, die die basalen undifferenzierten Zellen repräsentiert, fehlt (FRANGSMYR et al., 1995, NOLLAU et al., 1997).

4.1 Strukturelle und experimentell-funktionelle Besonderheiten

Wie für die meisten Mitglieder der CEACAM-Familie, ist auch für CEACAM1 eine Adhäsionsfunktion beschrieben. Es vereint strukturelle Merkmale der Immunglobulin-Superfamilie mit funktionellen Eigenschaften der Cadherin-Familie der CAMs. Das heißt, es ist aus immunglobulin-ähnlichen Domänen aufgebaut, vermittelt aber Zelladhäsion kalzium- und temperatur-abhängig (ROJAS et al., 1990, TURBIDE et al., 1991, OIKAWA et al., 1992). Molekulare cDNA-Analysen haben schon früh ergeben, dass CEACAM1 in einer Vielzahl von alternativen Spliceformen exprimiert werden kann (HINODA et al., 1988, KUROKI et al., 1991, BARNETT et al., 1993), die teils im selben Gewebe koexprimiert werden. Einige Spliceformen besitzen eine lange zytoplasmatische Domäne, deren C-terminale Regionen die Phosphorylierung der Tyrosinreste der Domäne sowie deren Assoziierung mit den Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 beeinflusst. Substitutionen oder Verluste der Reste der C-terminalen Region führen zum Verlust der Tumorzellwachstumshemmung (IZZU et al., 1999). In kolorektaler Mukosa werden zwei Splicevarianten (3,9 kb und 1,5 kb) exprimiert (NEUMAIER et al., 1993, NOLLAU et al., 1997).

Außerdem ist für CEACAM1 eine Funktion in der Signaltransduktion gezeigt worden (AFAR et al., 1992, BEAUCHEMIN et al., 1997).

4.2 Potentiell biologische Funktionen von CEACAM1

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass das murine CEACAM1-Homolog der Rezeptor für das Maus-Hepatitis-Virus ist (DVEKSLER et al., 1995, COMPTON et al., 1998). Für das humane CEACAM1 ist eine wichtige Rezeptorfunktion für pathogene Keime wie *Neisseria gonorrhoeae* (BOS et al., 1997) oder *Neisseria meningitidis* (MUENZNER et al., 2000) belegt worden. CEACAM1 bindet die Erreger mittels homophiler Adhäsion an Granulozyten, die CEACAM1 exprimieren.

Auch eine Funktion in der T-Lymphozytenaktivierung ist beschrieben worden (KAMMERER et al., 1998, MOLLER et al., 1996).

In vitro sowie im Tiermodell ist für das CEACAM1-Gen eine Tumor-Suppressorfunktion gezeigt worden (KLEINERMAN et al., 1995, KUNATH et al., 1995).

Weitere *in vitro* Modelle belegen zudem eine Beteiligung des CEACAM1 an der Angiogenese (HUANG et al., 1999, ERGUN et al., 2000).

4.3 Isoformen von CEACAM1

Es gibt zwei Isoformen von CEACAM1, die L- und die S-Form, die beide in einem ausgeglichenen Verhältnis in Epithelien, Endothelien und Leukozyten exprimiert sind. Das distale Ende der langen zytoplasmatischen Domäne des CEACAM1-L soll mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle assoziiert sein. Diese Interaktion nimmt eine Schlüsselrolle für die Zellform und Zelldeterminierung ein, welche die Motilität der Zelle sichern und die Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Adhäsion erleichtern. Die zytoplasmatische Domäne des CEACAM1-S ist verkürzt und interagiert nicht mit den Aktinfasern. Somit könnte CEACAM1-L als Inhibitor von Tumorzellwachstum fungieren, CEACAM1-S hingegen nicht (IZZI et al., 1999, SADEKOVA et al., 2000). Je nach dem in welchem Verhältnis die verschiedenen Isoformen exprimiert sind, trägt CEACAM1 entweder zur Kontakthemmung von Zellproliferation im Zellverband bei oder es erlaubt die Proliferation (SINGER et al., 2000).

4.4 CEACAM1 und Karzinogenese

In chirurgisch entfernten Karzinomen des Kolons ergab sich der erste Hinweis auf eine besondere Rolle der CEACAM-Familie während der Tumorentstehung. Die mRNA-Expression von CEACAM1 ist im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe in kolorektalen Karzinomen regelhaft deutlich erniedrigt bzw. verloren gegangen (NEUMAIER et al., 1993). Darüberhinaus gehört CEACAM1 zu den 12 am stärksten in der Expression veränderten Genen in der kolorektalen Karzinogenese (ZHANG et al., 1997).

In Karzinomen der Prostata (LUO et al., 1999), des Endometriums (BAMBERGER et al., 1998) und der Mamma (LUO et al., 1997) konnte ebenfalls eine Downregulation von CEACAM1 festgestellt werden. Die verminderte oder fehlende CEACAM1-Expression ist also ein auffällig häufiges Merkmal in fortgeschrittenen, malignen Tumorstadien.

Vor diesem Hintergrund ist es von besonderem Interesse, dass dieses Phänomen bereits in sporadischen kolorektalen Adenomen (NOLLAU et al., 1997), einem Tumorstadium, welches als prämaligne einzuordnen ist, zu einem hohen Prozentsatz der Fälle auftritt. Besonders bezeichnend ist, dass hyperplastische Polypen des Kolons, die als benigne betrachtet werden, eine verminderte CEACAM1-Expression auf mRNA- sowie auf Proteinebene aufweisen (NOLLAU et al., 1997, NEUMAIER unveröffentlichte Daten). Die ähnlich hohe Frequenz des Auftretens von CEACAM1- Dysregulationen in malignem sowie in prämaligmem Gewebe zeigt, dass es sich hierbei um ein durchschlagend permanentes molekulargenetisches Ereignis handelt. Dies reflektiert eine frühe tumor-assoziierte Dysregulation in gewebe-spezifischer Genexpression. Bisher gibt es nur Spekulationen hinsichtlich der molekularen Mechanismen, die der Downregulation von Adhäsionsmolekülen zu Grunde liegen. Diskutiert wird unter anderem eine veränderte transkriptionelle Kontrolle und Regulation (HAUCK et al., 1994, NOLLAU et al., 1997).

SCHOLZEL et al. (2000) konnten zeigen, dass die Expression von dem Zelladhäsionsmolekül CEACAM7 in hyperplastischen Polypen und in frühen Adenomen im Vergleich zum korrespondierendem Normalgewebe vollständig abwesend ist. Da die Regulation der Expression von CEACAM7 mit CEACAM1 bisher eine einhundertprozentige Konkordanz aufwies (NOLLAU et al., 1997), ist es möglich, dass die Resultate der CEACAM7-Expression auf die CEACAM1-Expression übertragbar sind. Dann ist davon auszugehen, dass CEACAM1 auch in hyperplastischen Polypen downreguliert ist. Dies konnte bereits in unveröffentlichten Daten von NEUMAIER und für einen hyperplastischen Polypen der Arbeit NOLLAU et al., (1997) gezeigt werden.

5. Das Adenomatosis Polyposis Coli – Gen (APC)

Das APC-Gen gehört zu den Tumorsuppressorgenen. Es ist auf Chromosom 5q21-q22 lokalisiert, besteht aus 2843 Aminosäuren (8529 Basenpaare) und ist 310 kiloDalton schwer. Es umfaßt 15 Exons. Das Gen ist dafür bekannt, bei der epithelialen Zellproliferation des Kolons eine sogenannte „gate-keeper“-Funktion einzunehmen, d.h., dass es in funktionstüchtigem Zustand die Tumorbildung durch Regulierung von

Zellentstehung und Zell-Apoptose verhindert. Ist es mutiert, wird ein Kaskaden-Prozeß in Gang gesetzt, der über die Entstehung von Adenomen zu Karzinomen führt.

5.1 Eigenschaften der APC-Genmutationen

Über 98 % der APC-Gendefekte sind entweder „frameshift“ (68 %)- oder „nonsense“ (30 %)-Mutationen. Sie resultieren praktisch immer in einem vorzeitigen Stopcodon. Dadurch entstehen bei der Translation verkürzte Proteine (BEROUD & SOUSSI, 1996). Die Prävalenz der APC-Genmutation in sporadischen kolorektalen Adenomen liegt etwa bei 68 % (63 %, POWELL et al., 1992, 80 %, JEN et al., 1994, 60 %, BEROUD & SOUSSI, 1996). Diese Zahl ermittelt sich aus den teils differierenden Ergebnissen unterschiedlicher Arbeitsgruppen. Aufgrund der Schwierigkeiten der APC-Genanalytik (siehe IV. Diskussion, 2.2), ist davon auszugehen, dass der tatsächliche Anteil der Mutationen höher liegt.

5.2 Lokalisation der APC-Genmutationen

BEROUD & SOUSSI haben 1996 eine Datenbank zusammengetragen, nach der über 700 verschiedene Keimzell- und somatische Mutationen des APC-Gens existieren. Sie können an jeder Stelle im Gen auftreten. Die Lokalisation der Mutation wirkt sich auf die Ausprägung des Krankheitsbildes aus. Jede einzelne Mutation innerhalb des APC-Gens hat eine phänotypische Auswirkung.

Die Mutationen sind überwiegend in einem Abschnitt des Gens zu finden, der als „Mutation Cluster Region“ (MCR) bezeichnet wird (BEROUD & SOUSSI, 1996). Dieser Teil befindet sich in der ersten Hälfte von Exon15 (Aminosäure 1286-1513, MIYOSHI et al., 1992b) und macht nur etwa 8 % des gesamten Gens aus. Zwei Drittel aller somatischer Mutationen sind dort lokalisiert.

5.3 Keimbahnmutationen

Keimzellmutationen des APC-Gens sind für die autosomal dominant vererbte familiäre adenomatöse Polyposis-Krankheit (FAP) verantwortlich. Das Charakteristikum dieser Krankheit ist das Auftreten von multiplen adenomatösen Polypen im Dickdarm, die eine extrem hohe Entartungstendenz aufweisen (GRODEN et al., 1991).

Keimzellmutationen des APC-Gens haben eine Penetranz von ca. 90 %.

5.4 Somatische Mutationen

Somatische APC-Genmutationen werden als das Schlüsselereignis in der Entwicklung von sporadischen kolorektalen Tumoren angesehen (KINZLER & VOGELSTEIN, 1996, LAKEN et al., 1999).

Sie spielen zudem eine Rolle in der Karzinogenese des Magens und des Pankreas (HORII et al., 1992).

Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, auf welche Weise ein mutiertes APC-Gen zur Ausbildung eines Tumors führt. Eine Hypothese besagt, dass APC ein rezessives Tumor-Suppressor-Gen ist. Dies bedeutet, dass die Inaktivierung beider Allele notwendig ist, damit ein Tumor entstehen kann. Gestützt wird diese Hypothese durch die Erkenntnis, dass somatische APC-Genmutationen in frühen Adenomen von FAP-Patienten, die stets bereits ein mutiertes Allel besitzen, gefunden werden können (ICHII et al., 1992, 1993).

Eine weitere Hypothese besagt, dass die verkürzten APC-Proteine, die durch die translations-terminierenden APC-Genmutationen entstehen, die normale Funktion des APC-Genproduktes im Sinne eines dominant negativen Einflusses hemmen (SMITH et al. 1993).

5.5 Relevanz der APC-Genmutationen für die kolorektale Karzinogenese

Nach heutigem Wissensstand gelten Mutationen des APC-Gens als initiiierende irreversible molekulare Defekte in der Genese von Kolontumoren (KINZLER & VOGELSTEIN, 1996). Die Resultate verschiedener Experimente einzelner Arbeitsgruppen belegen dies.

SU et al. (1992) haben an der *Min* (*multiple intestinal neoplasia*)-Maus zeigen können, dass eine nonsense-Mutation im APC-Gen zu einer Vielzahl von Kolontumoren führt. Anhand von transgenen Mäusen haben FODDE et al. (1994) gezeigt, dass eine gezielte Modifikation des Maus-APC-Gens an einer bestimmten Position, in homozygotem Zustand für die Mausedembryos letal ist. Der heterozygote Zustand resultiert in multiple Kolonpolypen. Das Progressionsmuster dieser Polypen zu Adenomen bzw. Karzinomen ähnelt dem des in FAP beobachteten Progressionsmusters.

Die zentrale Rolle des APC-Gens in der kolorektalen Karzinogenese findet eine Erklärung in der Interaktion mit Proteinen der Signaltransduktion und Proliferationskontrolle und in der Regulation der Apoptose (BONNETON et al., 1997). Letzteres ist von MORIN et al. (1996) beschrieben worden. Sie haben die Tumor-Suppressorfunktion für das APC-Gen belegt, indem sie zeigten, dass APC in intaktem Zustand die kolorektale Tumorgenese verhindert. Dies geschieht durch eine Verminderung des Zellwachstums. Das APC-Protein induziert den apoptosevermittelten Zelltod. In mutiertem Zustand kann es diese Funktion nicht mehr ausüben und es kommt zu kolorektalen Neoplasien.

Das APC-Protein besitzt Bindungsstellen für beta-Catenin. Dies ist ein zytoplasmatisches Protein bei Vertebraten. Es entspricht dem Drosophila-Homolog Armadillo. Zwei Funktionen sind für beta-Catenin beschrieben. Zum einen stellt es eine Verbindung zwischen Cadherin-Zelladhäsionsmolekülen und dem Zytoskelett der Zelle dar. Zum anderen nimmt es eine Rolle in der sogenannten Wntless / Wnt-Kaskade der Signaltransduktion ein (BEHRENS et al., 1996). Das APC-Protein reguliert den Abbau von beta-Catenin. Ist das Protein mutiert, kommt es zu einer Akkumulation von beta-Catenin, was die Wntless / Wnt-Kaskade initiiert. Beta-Catenin bindet an Transkriptionsfaktoren wie Tcf (Transcriptionfactor) und Lef (lymphoid enhancer-binding factor), die Effektoren der Kaskade darstellen und als Komplexe mit beta-Catenin die Transkription bestimmter Zielgene wie c-Myc, Cyclin D1 und Matrilysin transaktivieren (KORINEK et al., 1997). Das onkogene Potential von beta-Catenin erklärt sich aus der Tatsache, dass diese Zielgene für Tumorproliferation oder maligne Progression verantwortlich sind (BRABLETZ et al., 2000).

Im Experiment zeigte sich, dass ein wiedereingeführtes APC-Protein das beta-Catenin von den Transkriptionsfaktoren entfernt und somit die Signaltransduktion unterbricht (KORINEK et al., 1997).

6. Problemstellung und Ziel der Arbeit

In der Mehrzahl sporadisch entstehender polypöser Kolontumoren können Mutationen des APC-Gens identifiziert werden. Sie gelten als Schlüsselereignis während der kolorektalen Karzinogenese. Die APC-Genmutationen haben eine hohe Penetranz und sind bereits in den frühesten neoplastischen Schleimhautveränderungen des Kolons zu finden.

Eine Dysregulation von Zelladhäsionsmolekülen, insbesondere dem CEACAM1, wurde ebenfalls bereits in frühen Tumorstadien festgestellt und kann persistierend bzw. in zunehmendem Maße in fortgeschrittenen Tumorstadien nachgewiesen werden. Daher ist es notwendig, zu klären, wo sie innerhalb des „Multi-Step-Modells“ der Karzinogenese einzuordnen ist. Die bisherige Konkordanz der Regulation der CEACAM7- und der CEACAM1-Expression, führt aufgrund der Abwesenheit von CEACAM7 in hyperplastischen Polypen zu der Hypothese, dass eine verminderte Expression von CEACAM1 bereits vor dem Schlüsselereignis der APC-Genmutation auftritt.

Im Speziellen wird versucht, folgende Fragen zu beantworten:

1. In welcher Häufigkeit ist in den auf CEACAM1 untersuchten Proben das Auftreten von APC-Mutationen zu beobachten?
2. Existiert eine Korrelation von Veränderungen der CEACAM1-Expression mit Mutationen des APC-Gens?
Gibt es Tumoren mit CEACAM1-Verlust ohne APC-Genmutation oder umgekehrt?
3. Eignet sich die Anwendung des Protein Truncation Test zur APC-Genanalytik?
Wie ist dessen Empfindlichkeit gegenüber kontaminierendem Normalgewebe?

II. Material und Methoden

II.1 Material und Bezugsquellen

1. PCR-Reagenzien, Enzyme und Kits

Expand™ High Fidelity PCR System	Roche Molecular Systems, Penzberg
PCR Nucleotide Mix	Roche Molecular Systems, Penzberg
Oligonukleotide	Roche Molecular Systems, Penzberg, MWG-Biotech GmbH, Ebersberg
RT Superscript™ (II)	Gibco BRL, Karlsruhe
Protein Truncation Test, nonradioactive	Roche Molecular Systems, Penzberg
Chemiluminescence Blotting Kit (Biotin, Streptavidin)	Roche Molecular Systems, Penzberg

2. Reagenzien

Acrylamid-Bisacrylamid 29:1 40%	Serva, Heidelberg
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
Chloroform	Merck, Darmstadt

Ethanol	Merck, Darmstadt
Ether	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 1 % in H ₂ O	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lambda-Hind III	Gibco BRL, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Molekulargewichtsmarker, DNA 1kbp Fragmentunterschiede	Gibco BRL, Karlsruhe
Natriumchlorid	J.T. Baker, VA Deventer, Holland
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1 v/v)	Gibco BRL, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Bio-Rad, München
Tris, Ultra Pure	Gibco BRL, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
Stop Solution	USB, Cleveland, Ohio
SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim

3. Puffer und Lösungen

Puffer

Blotpuffer:

10fach Anodenpuffer

0,3 M Tris

20 % (v/v) Methanol

pH 10,4

1fach Anodenpuffer	25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol pH 10,4
1fach Kathodenpuffer	25 mM Tris 192 mM G-Aminohexansäure pH 9,4
Ladepuffer (DNA-Gelelektrophorese)	0,04 % (w/v) Bromphenolblau 0,04 % (w/v) Xylencyanol FF 2,5 % (w/v) Ficoll (400) in TAE-Puffer
Ladepuffer (SDS-Page)	ohne Angaben aus Protein Truncation Test Kit
Laufpuffer (SDS-Page)	25 mM Tris 200 mM Glycin 1 % (v/v) SDS
Proteinase-K-Puffer	0,01 M Tris (pH 7,8) 0,005 M EDTA 0,5 % SDS
Sammelgelpuffer	0,625 M Tris-HCl pH 6,8
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA

TBS	50 mM Tris 150 mM Natriumchlorid pH 7,5
TBST Waschpuffer	TBS mit 0.1 % (v/v) Tween 20
Trenngelpuffer	1,88 M Tris-HCl pH 8,8

Lösungen

Ammoniumpersulfat	10 % in ddH ₂ O
Blocking-Lösung	1 % bzw. 0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz in TBS
Detektionslösung	aus Chemiluminescence Blotting Kit
Lambda-Hind III-Marker	ungeschnittene λ -DNA (48kb, GibcoBRL) 10 fach HindIII Puffer ($\frac{1}{10}$ Vol.) 10 fach BSA ($\frac{1}{10}$ Vol.) 10mM DTT ($\frac{1}{10}$ Vol.) ddH ₂ O auf Endvolumen Hind III (5U/ μ g DNA) zwei Stunden bei 37°C im Heiz- block inkubieren
Natriumacetat-Lösung	3 M NaAc \times 3 H ₂ O in 800 ml H ₂ O pH 5,2
Streptavidin-POD Arbeitslösung	1:12500 in 0,5 % BlockadeLösung 20 mU/ml

Sammelgel (5 %) für SDS-Page

0,25 ml Polyacrylamid (40 %)
0,4 ml 0,625 M Tris-HCl pH 6,8
0,4 ml SDS (0,5 %)
0,95 ml ddH₂O
10µl Ammoniumpersulfat (10 %)
2µl TEMED

Trenngel (10 %) für SDS-Page

1,5 ml Polyacrylamid (40 %)
1,2 ml 1,88 M Tris-HCl pH 8,8
1,2 ml SDS (0,5 %)
2,1 ml ddH₂O
30µl Ammoniumpersulfat (10 %)
2µl TEMED

4. Allgemeine Labormaterialien und Plastikartikel

Agarose-Gelelektrophoresekammer

Hoefer HE 33 Minisubmarine,
Pharmacia Biotech, Freiburg

Gel Running Tray 7×10cm

Hoefer Scientific, Inc.

Gel Casting Tray 7×10cm

Hoefer Scientific, Inc.

Kamm, 8 wells

Hoefer Scientific, Inc.

Netzteil

Pharmacia Biotech, Freiburg

Blot-Filterpapier

Schleicher und Schuell, Dassel

Eppendorf Reaktionsgefäße

Eppendorf, Hamburg

Erlenmeierkolben

Merck, Darmstadt

Filme

Polaroid, Hertfordshire, England

Folien

Merck, Darmstadt

Kryo-Röhrchen

Nunc, Wiesbaden

Petrischalen 10cm

Greiner, Frickenhausen

pH-Papier	Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen	Aerosol Resistant Tips, Fisher Scientific
Röntgenfilme	Lumi-Film, Roche Molecular Systems, Penzberg
SDS-Page Minigelkammer	Biometra, Göttingen
Gelplatten	
Glasplatte mit fixierten Spacern	
Silikonabdichtung	
Glasplatte, ausgeschnitten	
Kämme, Klammern	
Sterilfilter (0,2/0,45µm) Minisart	Sartorius, Göttingen
Transfer-Membran	Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) Falcon	Becton Dickinson, USA

5. Laborgeräte

Analysenwaage	Mettler, Zürich
Autoclav	Integra, Biosciences, Fernwald
Digitalwaage	Mettler, Zürich
Eismaschine	AF 10, Scotsman, Frimont, Italien
Heizblock	thermoDux, Wertheim/Main
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mikrowelle	Whirlpool, Schweden
PCR-Minicycler	MJ Research, Watertown, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilmentwickler	Kodak, England
Röntgenfilmkassetten	Hypercassette, Amersham Life Science, England

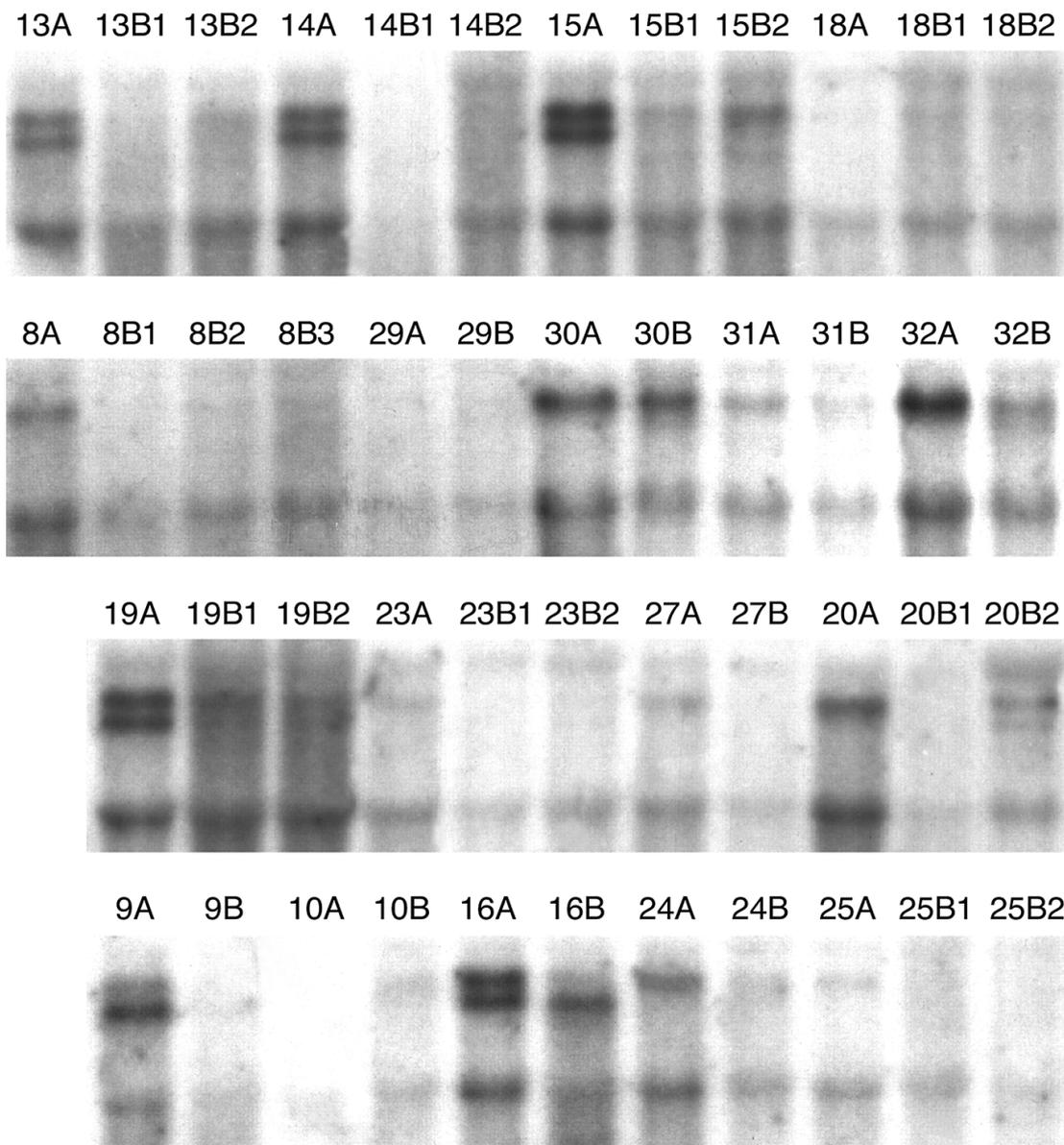
Schüttelinkubator	Heidolph DUOMAX 1030 Wilke & Witzel, Hamburg
Speedvac	Savant Inc., Hicksville, N.Y.
Spektral-Photometer	Shimadzu UV160, Japan
SDS-Gelelektrophorese Apparatur mit Blotvorrichtung und Netzteil	Bio-Rad, München
UV-Licht-Apparatur	Polaroidkamera UV-Tisch: Herolab UVT 2035 302 nm mittelwellig, St. Leon-Rot
Vortex	Janke und Kunkel, IKA, Staufen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

6. DNA / RNA

Verwendet wurden Proben, die in Bezug auf die mRNA-Expression von CEACAM1 bereits vorcharakterisiert waren. Sie lagen als stabilisierte Zellhomogenate in hochmolarer chaotroper Lösung aus Guanidiniumisothiocyanat / Phenol bei -80°C gelagert vor. Die Nukleinsäuren wurden mittels Gelelektrophorese auf ihre Integrität hin überprüft.

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Northern Blots von NOLLAU et al., 1997, die als Grundlage dienten, die Ergebnisse der CEACAM1-Expression mit den Resultaten der APC-Genanalyse dieser Arbeit zu korrelieren.

Abbildung II.1



Erläuterungen zur Abbildung II.1

Die Proben sind in A und B Proben unterteilt worden. Die A Proben stellen jeweils die Northern Blots von Normalgewebe dar. Die B Proben zeigen Tumorgewebe. B1 und B2 repräsentieren Tumorproben, die von unterschiedlichen Lokalisationen von demselben Patienten entnommen wurden.

Um die CEACAM1-Expression zu beurteilen, wurden die Banden der B Proben an denen der entsprechenden Normalprobe normalisiert.

Zu erkennen sind die Banden der mRNA der beiden Splicevarianten von CEACAM1. Die obere Bande zeigt die 3,9 kb schwere Splicebande, die die CEACAM1-mRNA mit der langen zytoplasmatischen Domäne darstellt. Für die Auswertung der Northern Blots ist die Bande von besonderem Interesse, da eine Funktion als Tumorinhibitor für diese Domäne diskutiert wird (siehe S.7 und S.8, I.4.1 und I.4.3).

Die untere Bande zeigt die 1,5 kb schwere Splicevariante. Diese kann in der Beurteilung der Northern Blots vernachlässigt werden, da für sie nicht zur Proliferationshemmung von Zellen im Zellverband beiträgt und somit der Tumorentstehung nicht entgegenwirkt.

In allen B Proben ist eine mehr oder minder ausgeprägte downregulierte Expression von CEACAM1 zu erkennen.

6.1 DNA für Sensitivitätsversuch

Für den Sensitivitätsversuch zur Feststellung der analytischen Empfindlichkeit des Protein Truncation Tests wurde normale genomische DNA benutzt, die aus humanem Blut mittels eines DNA-Isolations-Kits (QIA Amp. Blood Kit, QIAGEN) gewonnen worden war. Diese DNA wurde mit unterschiedlichen Mengen einer APC-Genmutierten DNA gespickt.

7. Oligonukleotide

Tabelle II.1. verwendete Oligonukleotide für Polymerasekettenreaktionen

Primer	5`-3`-Sequenz	Exon bzw. Segment
RT15	ACGAGAACTATCTAAGCTTCC	Exon 1-14, Segment 1 ^(1*)
T7-Sequenz	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAA CAGACCACCATG	Exon 1-14, Segment 1 ^(1)
APC 1T7	T7-Sequenz-GCTGCAGCTTCATATGATC	Exon 1-14, Segment 1 ^(1*)
APC 15.3	GTAGACAGTTGTTCTCTCTTAGGATTT	Exon 1-14, Segment 1 ^(1*)
15AT7 / S ₂ 3	geschützte Sequenzen	Exon 15, Segment 2 ^(2*)
B ₂ F / S ₂ 3	geschützte Sequenzen	Exon 15, Segment 3 ^(2*)
C ₃ F / 15Q3b	geschützte Sequenzen	Exon 15, Segment 4 ^(2*)
Ex15d / 15U2	geschützte Sequenzen	Exon 15, Segment 5 ^(2*)

*Die T7-Sequenz enthält eine Bindungssequenz für die T7-RNA-Polymerase zur Initiation der *in vitro* Transkription sowie eine von KOZAK, 1987 beschriebene Sequenz, die in höheren Eukaryonten eine optimale Initiation für die Translation an den Ribosomen ermöglicht.

Sie wurde jeweils den Oligonukleotiden APC1T7 (Segment 1), 15AT7 (Segment 2), B₂F (Segment 3) sowie C₃F (Segment 4) vorangestellt.

^(1*): Oligonukleotide für Segment 1: aus BALA et al., 1996

^(2*): Oligonukleotide für Segmente 2-5: geschützte Sequenzen,

Roche Molecular Systems, Penzberg

II.2 Methoden

1. Präparation der DNA

1.1 Neutralisierung des pH-Wert

Die durch elektive Endoskopie erhaltenen Adenombiopsien lagen in Phenol aufbewahrt und bei -80°C eingefroren vor. Die Herstellung eines sauren pHs war zur RNA-Gewinnung für die Durchführung von Northern Blots notwendig. Durch diesen pH-Wert wurde die DNA zusammen mit Proteinen in Form eines Pellets aus der Lösung gefällt. Um die DNA aus dem Pellet zurückzugewinnen, wird sie durch Neutralisierung des pH-Wert herausgelöst. Jeder notwendige Zentrifugationsschritt für die DNA-Präparation wurde in einer Eppendorf Zentrifuge bei 16000 rpm und Raumtemperatur durchgeführt.

Zunächst wird der saure pH-Wert angehoben. Dazu werden

300µl Phenol-DNA-Gemisch
mit 300µl 1 M Tris / HCl pH 9,5

versetzt. Nach einigen Minuten Zentrifugation wird der pH-Wert mit Hilfe von pH-Papier gemessen und das DNA-Pellet mittels einer Nadel aus dem Gemisch in ein neues Röhrchen übertragen.

1.2 Entfernung organischer Rückstände

Hierfür wird das

Pellet
mit 500µl Chloroform und
mit 500µl TE-Puffer

versetzt und für einige Minuten zentrifugiert. Im Anschluß wird die organische untere Phase abpipettiert. Die obere Phase aus TE-Puffer enthält das Pellet mit der DNA. Zur Entfernung der Chloroformrückstände werden die

500µl TE-Puffer plus Pellet
mit 500µl Ether

gemischt und erneut ein paar Minuten zentrifugiert. Dann wird die obere Etherphase mit den Chloroformresten verworfen. Um den Ether vollständig zu entfernen, werden die Proben für etwa 10 Minuten in der „speedvac“ behandelt, bis die organischen Lösungsmittel verdampft sind.

1.3 Proteinase K-Behandlung

Um die DNA aus dem Pellet herauszulösen, wird anschließend die

wässrige Phase plus Pellet
mit 50µl 10fach Proteinase K-Puffer
und 2µl Proteinase K (50µg / ml)

versetzt und in einem einstündigen Wasserbad bei etwa 56°C inkubiert. Zwischenzeitlich werden die Proben wiederholt gemischt.

1.4 Phenol / Chloroform-Extraktion

Nach dem Wasserbad wird zur Beseitigung der Proteine die

Probe
mit 500µl Phenol / Chloroformgemisch 1:1

versetzt. Der Ansatz wird für einige Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird im Anschluß in ein neues Röhrchen umpipettiert. In einem weiteren Reinigungsschritt wird die

Probe
mit 500µl Chloroform

vermischt und wie im vorherigen Ansatz für 10 min zentrifugiert. Mit diesem Schritt werden die verbliebenen organischen Lösungsmittel entfernt.

1.5 Präzipitation der DNA

Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand, in dem sich die DNA befindet, abgenommen und in ein neues Röhrchen pipettiert. Daraufhin wird die

Probe
mit 50µl 3 M NaAc pH 5,2 und
mit 500µl Isopropanol

versetzt, um die DNA aus der wässrigen Lösung zu präzipitieren. Für mindestens 20 Minuten wird dieses Gemisch dann bei - 80°C weggefroren und inkubiert. Im folgenden Schritt wird die Probe erneut für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

1.6 Aufreinigen der gewonnenen DNA

Durch die vorangegangene Zentrifugation sammelt sich die präzipitierte DNA am Boden des Röhrchens. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert. Nun wird in mehreren sich wiederholenden Reinigungsschritten die präzipitierte

DNA
mit 50µl Ethanol 70 %ig

versetzt und für einige Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird im Anschluß daran jeweils vorsichtig abgenommen. Nach dem letzten Reinigungsschritt werden die Ethanolrückstände in der „speedvac“ verdampft.

1.7 Aufnehmen der DNA in TE-Puffer

Nach den Reinigungsschritten wird die präzipitierte

DNA
mit 50µl TE-Puffer

versetzt und vorsichtig darin gelöst, um sie für eine anschließende PCR einsetzen zu können. Der Erfolg der DNA-Extraktion wird mittels einer Gelelektrophorese überprüft.

2. DNA - Gelelektrophorese

2.1 Anfertigung, Zweck und Anwendung eines Agarosegels

Zur Herstellung eines für genomische DNA optimalen 0,7 %igen Agarosegels wird

1,4 g Agarose
mit 200µl TAE-Puffer

versetzt und in der Mikrowelle durch Aufkochen in Lösung gebracht. Um die Sichtbarmachung der DNA unter UV-Beleuchtung zu ermöglichen, wird die

Agaroselösung
mit 10µl Ethidiumbromid

vermischt. Das Ethidiumbromid, das in einer Endkonzentration von 0,5 µg / ml vorliegt, interkaliert die DNA. Nach Abkühlung der Lösung auf etwa 50°C, wird sie in dafür

vorgesehene Gelkammern gegossen. Zur Schaffung von Probestaschen wird ein Kamm in die Kammer eingesetzt. Nach Auspolymerisieren des Gels, können die Proben in die Geltaschen pipettiert werden. Dafür werden zuvor

10µl DNA
mit 1µl 10fach Ladepuffer

versetzt.

Anhand des mitaufgetragenen 1kb DNA-Molekulargewichtsmarkers, läßt sich die Fragmentgröße feststellen, da jede Bande des Markers einem bestimmten Gewicht entspricht.

Im Gel werden DNA-Moleküle der Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt. Durch die negativ geladenen Phosphatreste der DNA wandert sie zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist zum einen von der Spannung und zum anderen von der Größe der Moleküle abhängig. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA, werden unterschiedliche Agarosekonzentrationen benutzt, um eine optimale Auftrennung zu erreichen. Das Agarosegel hat eine Siebwirkung. DNA-Fragmente von hohem molekularem Gewicht lassen sich am besten in einem niedrigprozentigen (0,7 %), Fragmente von geringerem Molekulargewicht in einem höherprozentigen Agarosegel (z.B. 1,5 %) auftrennen.

Nach der Gelelektrophorese werden die DNA-Banden unter UV-Licht-Bestrahlung mittels des Ethidiumbromids im Gel sichtbar gemacht und durch eine Polaroidkamera fotografiert.

2.2 Gelelektrophorese der extrahierten DNA

Um die DNA-Extraktion zu überprüfen, wurden einige Mikroliter der jeweiligen DNA-Proben in 10fach Ladepuffer aufgenommen und auf ein niedrigprozentiges Gel (0,7 %) aufgetragen, da es sich um hochmolekulare DNA handelt. Es erfolgte eine semiquantitative Bestimmung der Konzentration der gewonnenen DNA-Menge anhand der Intensität der durch das ethidiumbromidhaltige Gel im UV-Licht sichtbar gemachten Banden. Diese wurden verglichen mit der Intensität der Banden eines mitaufgetragenen Lambda Hind III-DNA-Markers. Bei den 20 extrahierten Proben waren jeweils unterschiedliche Mengen DNA gewonnen worden.

3. Protein Truncation Test (PTT)

3.1 Prinzip des PTT

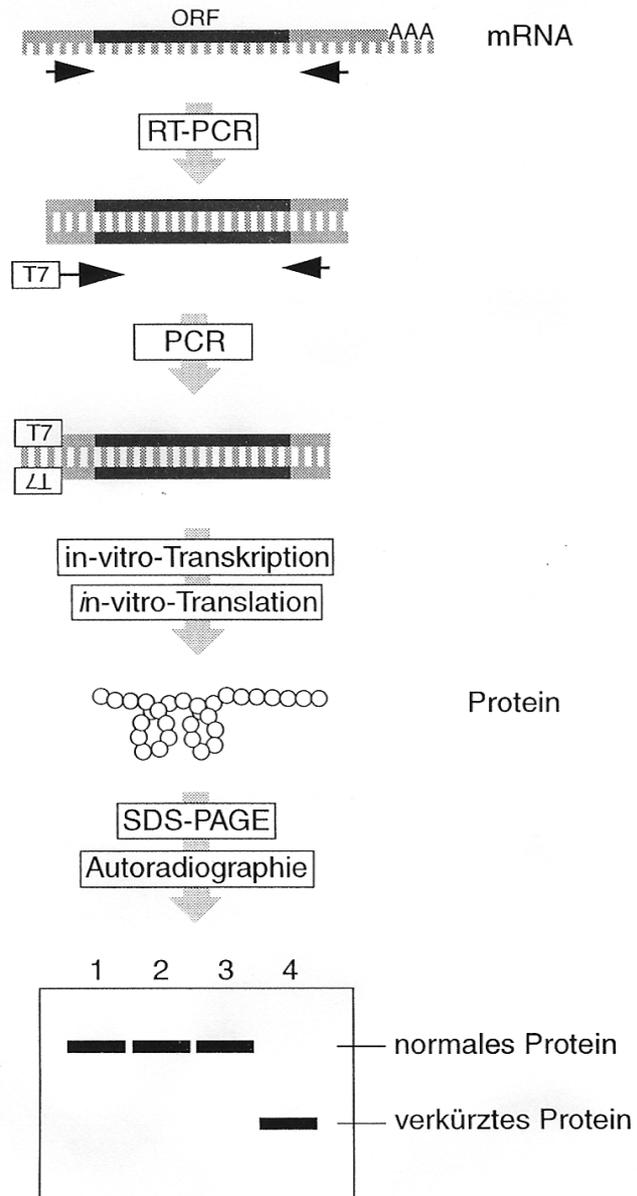
Der nicht radioaktive Protein Truncation Test, dessen Anwendung das erste Mal 1993 beschrieben worden ist (ROEST et al., 1993), ist entwickelt worden, um Mutationen in Genen mit einer großen Anzahl an kleinen Exonen (wie z.B. das APC-Gen, das Duchenne Muskel Dystrophie-Gen oder das Neurofibromatose 1-Gen) optimal selektiv detektieren zu können.

Die Basis des PTT besteht aus der Kombination von RT-PCR, *in vitro* Transkription und Translation. Die Verwendung von mRNA erlaubt die Analyse von mehreren Exons in einem Schritt. Da Tumorsuppressorgene wie das APC-Gen vorwiegend Stop-Mutationen (bis zu 98 %) aufweisen, wird die Translation in dem mutierten Gen praktisch immer vorzeitig beendet. Dies führt wiederum zu einem verkürzten Protein, welches durch den PTT bzw. die anschließende Chemilumineszenz-Reaktion visualisiert werden kann.

Zur vollständigen Analyse eines Gens wie des APC-Gens wird dieses, aufgrund der Größe der mRNA, in verschiedene sich überlappende Segmente eingeteilt, damit eine maximale Effizienz sowohl der Transkriptions- und als auch der Translationsreaktion erreicht wird. Den verschiedenen Segmenten sind für deren Amplifikation in entsprechenden PCR-Reaktionen jeweils spezifische Primer-Paare zugeordnet. Die sogenannten „sense“-Primer weisen eine Extension an ihrem 5'-Ende auf, bestehend aus einem T7-Promoter, der sogenannten Kozak-Sequenz und einem Startcodon (ATG), die eine *in vitro* Transkription und Translation ermöglichen. Das PCR-Produkt kann also in eine mit dieser „Cap-Struktur“ versehene mRNA transkribiert werden. Dann wird diese mittels eines Retikulozytenlysates, welches eine geladene Lysin-tRNA enthält, die an der ϵ -Aminogruppe des Lysins biotinmarkiert ist, in folglich biotinylierte Proteine translatiert. Die Peptidketten werden elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt und geblottet. Die Biotinmarkierung ermöglicht die Bindung der Proteine durch ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat. Dadurch können sie in einer anschließenden Chemilumineszenzreaktion mittels eines Röntgenfilms detektiert werden. Die Auswertung und Beurteilung der autoradiographischen Bilder erfolgt durch visuelle Inspektion.

Das folgende Schema dient der Verdeutlichung des Prinzips des PTT:

Schema II.1 aus MÜLHARDT, 1999



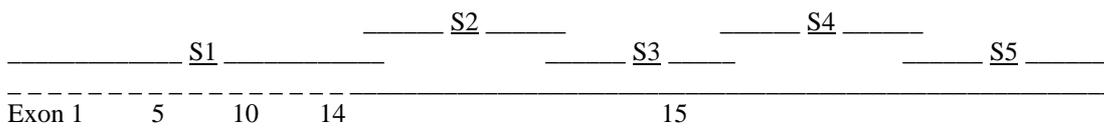
3.2 APC-Gen-spezifischer PTT

Um die kodierende Sequenz des APC-Gens zu analysieren, wird es in 5 sich überlappende Segmente unterteilt, die jeweils getrennt voneinander untersucht werden. Für Segment 1, welches Exon 1-14 repräsentiert, wird jeweils die vorhandene RNA der Proben benutzt, da die einzelnen Exons von großen, nicht kodierenden DNA-Segmenten, den sogenannten Introns unterbrochen werden.

Für die Segmente 2-5, die das 6,5 kb schwere Exon 15 umfassen, wird genomische DNA benutzt. Segment 2 und Segment 3 enthalten die „Mutation Cluster Region“ (MCR, Aminosäure 1281-1554), die nur etwa 8 % des gesamten Gens ausmacht, in der aber zwei Drittel aller somatischer Mutationen liegen.

Das folgende Schema verdeutlicht die APC-Genspezifische Segmentunterteilung:

Schema II.2 nach Roche Molecular Systems



Folgende Tabelle gibt Aufschluß über die Aufteilung der 5 Segmente auf DNA-Ebene in Bezug auf die verwendeten 5 Oligonukleotidpaare, die im Rahmen der Polymerase-Ketten-Reaktion eingesetzt wurden:

Tabelle II.2

Segment	Basenpaare	Codons	Primerpaar
1	421-2025	140-675	Apc1T7 / Apc15.3
2	1959-3691	653-1230	15AT7 / S23
3	3147-5101	1049-1700	B2F / S33
4	4746-7027	1582-2342	C3F / 15Q3b
5	6408-8109	2136-2703	Ex15d / 15U2

3a. Reverse Transkription

Um Exon 1-14 des APC-Gens vollständig analysieren zu können, wurde die RNA der Adenombiopsien benutzt und mittels der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden 2µg der jeweiligen Gesamt-RNA in einem 20µl Reaktionsmix wie folgt angesetzt:

4µl 5fach RT-Puffer
1µl DTT (5mM)
1mM dNTPs
20U RNAsin
10pmol RT-Primer
300U Superscript II (reverse Transkriptase)
ad 20µl dd H₂O

und bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Dann wurde das Gemisch für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und im Anschluß in Eis abgekühlt. In einem niedrigprozentigen Agarosegel wurde der Erfolg der reversen Transkription kontrolliert.

3b. Polymerasekettenreaktion

3b.1 PCR von Exon1-14

Von der in der reversen Transkription erhaltenen cDNA wurden jeweils 2µl in einem 50µl Reaktionsansatz, bestehend aus

5µl 10fach Expand™ HiFi PCR Puffer
0,3µl 20mM dNTPs
1,5 mM MgCl₂
2U Expand Polymerase
20 pmol der Primer APC1T7 und APC15.3
ad 50µl dd H₂O

amplifiziert.

Folgende PCR-Bedingungen erwiesen sich für die Amplifikation von Exon1-14 als optimal:

Der PCR-Ansatz wird für 3 Minuten bei 94°C erhitzt, gefolgt von 35 Zyklen, bestehend aus

- Schritt1 (DNA-Denaturierung): 94°C, 1 min.
- Schritt2 (Primerhybridisierung): 64°C, 1,5 min.
- Schritt3 (DNA-Synthese): 72°C, 2 min.

Im Anschluß an den letzten Zyklus werden die Reaktionsansätze abschließend für 5 Minuten auf 72°C gehalten, bevor sie auf Eis abgekühlt werden.

3b.1.1 Gelelektrophorese der Exon1-14-PCR-Fragmente

Die PCR wurde im Anschluß auf ihren Erfolg überprüft und die Konzentration semiquantitativ bestimmt, indem die PCR-Produkte auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 80 Volt mindestens eine halbe Stunde laufen gelassen wurden. Anhand des 1 kb-DNA-Molekulargewichtsmarkers konnten die etwa 1,6 kb schweren PCR-Produkte identifiziert werden.

3b.2 PCR von Exon15

Um das 6,5 kb große Exon15 optimal untersuchen zu können, wurden Polymerasekettenreaktionen mit vier Primersätzen für jeweils vier verschiedene sich überlappende Exon-Segmente durchgeführt.

Da die Konzentration der extrahierten DNA aufgrund des wenigen vorhandenen Materials nur anhand eines Agarosegels abgeschätzt werden konnte, wurde zunächst die für eine optimale Effizienz der PCR benötigte DNA-Menge ermittelt. Dafür wurde eine PCR von Reaktionsgemischen mit jeweils unterschiedlicher Menge an DNA durchgeführt. Eine Menge von 5µl DNA erwies sich als optimal. Sie wurde in einem Reaktionsansatz von 50µl, bestehend aus

5µl 10fach Expand™ HiFi PCR Puffer
1,5mM MgCl₂
200µM jedes dNTP
0,75µl Expand™ HiFi Enzym Mix
und 20 pmol der jeweils segmentspezifischen Primer
ad 50µl ddH₂O

inkubiert.

Der Enzym-Mix wurde als letztes in den Reaktionsansatz gegeben, da so eine partielle Degradierung der Primer durch die 3`-5`-Exonukleaseaktivität der Polymerase verhindert werden kann.

Folgendes PCR-Programm erwies sich zur Amplifikation von Exon15 als optimal:

Das Gemisch wird für 5 Minuten bei 94°C erhitzt, gefolgt von 35 Zyklen, bestehend aus

Schritt1 (DNA-Denaturierung): 94°C, 30 sec.
Schritt2 (Primerhybridisierung): 60°C, 30 sec.
Schritt3 (DNA-Synthese): 72°C, 2 min.

Im Anschluß an den letzten Zyklus werden die Reaktionsansätze abschließend für 5 Minuten bei 72°C gehalten.

Die Konzentrationen der spezifischen PCR-Produkte wurden semiquantitativ mittels einer ethidiumbromidversetzten Agarosegelelektrophorese und anschließenden Visualisierung der PCR-Produkte unter UV-Lichtbestrahlung durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

3c. *in vitro* Transkriptions-Reaktion

Mit den RT-PCR- bzw. PCR-Produkten kann ohne weitere Aufreinigung weiterverfahren werden. Der bei -80°C aufbewahrte Transkription-Mix wird aufgetaut, vorsichtig gemischt und im Anschluß sofort in Eis gelegt. Nachdem er mit dem PCR-Produkt und RNase-freiem ddH₂O versetzt wurde, inkubiert er je nach Menge des PCR-

Produkts für mindestens 15 Minuten bei 30°C. Für 500ng PCR-Produkt ist eine Inkubationszeit von 15 Minuten ist ausreichend, während bis zu 60 Minuten nötig sind, sofern mit 50ng PCR-Produkt begonnen wird.

Folgendes Reaktionschema wurde benutzt:

Tabelle II.3

Komponente	Probe	Positivkontrolle	Negativkontrolle
T7-Transkriptions-Mix	5µl	5µl	5µl
PCR-Produkt (50-500ng)	1-15µl	1-15µl	—
RNase-freies ddH ₂ O	ad 20µl	ad 20µl	15µl

Für die APC-Gen-Analyse hat es sich als optimal erwiesen, 10µl PCR-Produkt für 60 Minuten mit dem Transkriptions-Mix zu inkubieren. Nach dieser Zeit kann die Transkriptions-Reaktion mittels Gelelektrophorese auf ihren Erfolg überprüft werden. Dazu werden 10µl der Reaktion mit einem Stopplösungs-Ladepuffer versetzt und unter RNase-freien Bedingungen auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel zeigt nach der Elektrophorese zwei deutliche Banden. Die obere kathodennähere Bande zeigt das eingesetzte PCR-Produkt, die untere anodennähere entspricht der neu synthetisierten mRNA. Die übrigen 10µl des Transkriptions-Ansatzes werden direkt für den nächsten Schritt verwendet.

Die Transkriptions-Reaktion sollte 1-2µg RNA pro 20µl Reaktion ergeben.

3d. *in vitro* Biotin-Translations-Reaktion

Der Translation-Mix besteht aus einem Retikulozytenlysat, welches geladene Lysin-tRNA enthält. Dabei ist Biotin kovalent über eine Säureamidbindung an die ε-Aminogruppe des Lysins gebunden und liegt dann als sogenanntes Biocytin

(ε-N-Biotinyllysine) vor. Dieses Biotin wird gemäß der Funktion der Transfer-RNA während der Translation in das Peptid eingebaut und kann später in einer Chemilumineszenz-Reaktion detektiert werden (siehe Chemilumineszenz).

Der bei -80°C aufbewahrte gebrauchsfertige Translations-Mix wird aufgetaut, vorsichtig gemischt und in Eis gesetzt. Ein Mix-Ansatz ist für 5 Reaktionen ausreichend. $10\mu\text{l}$ der Transkriptions-Reaktion werden mit $40\mu\text{l}$ Translations-Mix gemischt und für eine Stunde bei 30°C inkubiert. Nach dieser Zeit wird ein Aliquot von $2\mu\text{l}$ mit Probenpuffer versetzt und mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

3e. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3e.1 Prinzip der SDS-PAGE

Um das Molekulargewicht von Proteinen bestimmen zu können, wird eine SDS-Gelelektrophorese verwendet. Die Proteine werden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, dessen Porengröße variiert werden kann, sodass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld verzögert und somit eine bessere Aufteilung erzielt werden kann. Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate, SDS) ist ein negativ geladenes Detergenz, welches mit seinem Fettsäureanteil an hydrophobe Proteinbereiche bindet und eine Entfaltung des Moleküls bewirkt. Somit ist eine Wechselwirkung der Proteine mit anderen Proteinen nicht mehr möglich. Die Proteine sind also durch das SDS negativ geladen, weswegen sie während der Elektrophorese durch das Polyacrylamid-Gel in Richtung der positiven Elektrode (Anode) wandern. Kleine Proteine wandern schneller durch die Poren des Gels als große, sodass sich folglich eine Proteinauftrennung nach deren Molekulargewicht ergibt. Niedrigmolekulare Proteine sind nach Abschluß der Elektrophorese der Anode am nächsten.

3e.2 SDS-PAGE der *in vitro*-translatierten Proteine

Um eine optimale Auftrennung der synthetisierten Proteine zu erreichen, wird ein 10 %iges Trenngel folgendermaßen angesetzt:

1,5 ml Polyacrylamid (40 %)
1,2 ml 1,88 M Tris-HCl pH 8,8
1,2 ml SDS (0,5 %)
2,1 ml ddH₂O
30µl Ammoniumpersulfat (10 %)
2µl TEMED

Diese Lösung wird in ein ca. 7×8 cm großes Minigel pipettiert. Nach Auspolymerisieren wird ein 5 %iges Sammelgel über das Trenngel gegossen, in welches gleichzeitig ein Kamm zur Schaffung der Probenaschen gesetzt wird. Das Sammelgel besteht aus

0,25 ml Polyacrylamid (40 %)
0,4 ml 0,625 M Tris-HCl pH 6,8
0,4 ml SDS (0,5 %)
0,95 ml ddH₂O
10µl Ammoniumpersulfat (10 %)
2µl TEMED

Ist das SDS-Polyacrylamid-Gel vollständig polymerisiert, werden die *in vitro* synthetisierten, biotinylierten Proteine aufgetragen. Dazu wird je ein Aliquot der Translations-Reaktion von

2µl
mit 12µl Probenpuffer

versetzt, der 2-Mercaptoethanol enthält, welches Disulfidbrücken in Proteinen reduziert. Dadurch verlieren die Proteinkomplexe ihre Tertiärstruktur.

Die Proben werden im Wasserbad für 4-5 Minuten erhitzt. Nach kurzem Zentrifugieren werden sie auf Eis abgekühlt und in die Taschen des Gels pipettiert.

Zusätzlich wird ein vorgefertigter Kombi-Marker mit auf das Gel aufgetragen, der aus biotinylierten, farbigen Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichtes besteht. Durch die Biotinmarkierung und dem nach der Elektrophorese entstandenen farbigen Bandenmuster ist es möglich, die Größe der PTT-Produkte durch direkten Vergleich mit den Markerproteinen zu bestimmen.

Tabelle II.4

Bandenfarbe des Kombimarkers	Molekulargewicht in kDa
orange	97,0
blau	66,2
grün	39,2
rot	26,6
orange	20,1
schwarz	12,5

2µl des Kombi-Markers werden mit 12µl Probenpuffer versetzt, kurz erhitzt, in Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen.

Um klare Banden zu erhalten, wird die Gelelektrophorese mit einer Stromstärke von 10 mA durchgeführt. Wenn der Bromphenolblau-Farbstoff des Probenpuffers den Boden des Gels erreicht hat, ist die Elektrophorese beendet.

3f. Western Blot

Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die aufgetrennten Proteine mittels eines angelegten elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Dies geschieht in übereinandergeschichtetem Filterpapier. Dazu werden zwei ca. 8×8 cm große Filterpapiere in 10fach-Anodenpuffer getränkt und auf die Blotvorrichtung gelegt. Zwei weitere Filterpapiere werden, nachdem sie mit 1fach-Anodenpuffer durchnässt sind darübergerlegt. Anschließend kommt die PVDF-Membran, die zuvor mit 1fach-Anodenpuffer behandelt wurde, auf den Filterpapierstapel. Dann wird das Gel mit den Proteinen vorsichtig aus der Gelkammer geschnitten und genau auf die PVDF-Membran platziert, auf die die Proteine übertragen werden sollen. Zum

Schluß werden darüber noch zwei in 1fach-Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Es muß darauf geachtet werden, dass sich zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen befinden, da der Proteintransfer sonst an diesen Stellen nicht stattfinden kann.

Bei einer angesetzten Zeit von 45 Minuten und einer Stromstärke von 200 mA sind die Proteine optimal vom Gel auf die Membran übertragen worden. Dies ist an dem farbigen Bandenmuster des Kombimarkers auf der Membran erkennbar.

3g. Chemilumineszenz der Proteine

3g.1 Prinzip der Chemilumineszenz-Reaktion

Das Test-Prinzip des verwendeten Chemilumineszenz-Systems ist es, die biotinmarkierten Proteine mittels einer Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase und dem Substrat Luminol/Iodophenol zu detektieren.

In Gegenwart von Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) katalysiert das Enzym Meerrettich-Peroxidase (POD) die Oxidation von Diazylhydratiden wie dem Luminol. Das aktivierte gebildete Zwischenprodukt strahlt Licht aus, indem es in den Grundzustand verfällt. Das 4-Iodophenol bewirkt eine Verstärkung der Lichtemission, dadurch, dass es als Radikal-Transmitter zwischen den gebildeten Sauerstoff-Radikalen und dem Luminol fungiert. Diese Reaktionen sind also dafür verantwortlich, dass der Röntgenfilm belichtet wird und die Proteinbanden auf dem Film visualisiert werden.

3g.2 Detektion der biotinylierten Proteine

a. Blocken der Membran

Da Methanol die Detektion behindern kann, wird der Blot nach Abschluß des Proteintransfers kurz in TBS-Puffer gewaschen, um Methanolrückstände aus den Blot-Puffern zu entfernen. Dann wird die PVDF-Membran mit 1 %iger Blocking-Lösung versehen, in eine Folie geschweißt und für eine Stunde auf einem Schüttelinkubator befestigt. Dieser Block-Vorgang ist auch bei 4°C über Nacht möglich.

b. Streptavidin-POD-Behandlung

Nach einer Stunde wird der Blot in eine neue Folie übertragen und mit 10ml einer Lösung bestehend aus Streptavidin verdünnt mit 0,5 %iger Blocking-Lösung im Verhältnis 1:12500 mit einer Endkonzentration von 20 U/ml behandelt. Für 30 Minuten wird die Membran erneut auf dem Schüttelinkubator inkubiert.

c. Waschen der Membran

Nach 30 Minuten wird die Membran aus der Folie genommen und mindestens vier Wasch-Schritten mit TBS-Tween unterzogen, um Streptavidin-Peroxidase-Rückstände vollständig zu entfernen. Jeder Waschvorgang sollte 10-15 Minuten dauern, wobei das TBST immer wieder gewechselt wird.

d. Detektion der Proteine

Die gewaschene Membran wird auf eine Folie gelegt und mit 1,5 ml Detektionslösung behandelt. Nach 60 Sekunden Inkubationszeit wird die Folie zugeklappt und die überschüssige Flüssigkeit mittels einer 10 ml-Pipette abgepresst. Anschließend wird die Folie blasenfrei zugeschweißt. Die Membran wird dann in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. Darüber wird daraufhin in einer abgedunkelten Fotokammer ein Röntgenfilm gelegt, der für 10-60 Sekunden durch das emittierte Licht der ablaufenden Streptavidin-POD-Reaktion auf der Membran belichtet wird. Danach wird der Film in einem Röntgenfilmentwickler entwickelt. Es hat sich als optimal erwiesen, den Film einer Expositionszeit von 30 Sekunden auszusetzen. So haben die jeweiligen Segment-Banden auf dem Röntgenfilm eine ausreichend hohe Signalintensität und können unzweifelhaft identifiziert werden, ohne dass ein zu großer störender Hintergrund besteht.

4. Sequenzierung

Drei der Proben, deren RNA nicht mehr vorlag, um Exon 1-14 aus cDNA zu untersuchen, wurden in der Ruprecht-Karls-Universitätsklinik Heidelberg von Prof. Dr. med. M. von Knebel Doeberitz nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger

unter Verwendung eines Applied Biosystems ABI PRISM™ Model 310 sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte über einen Software Sequence Navigator. Es wurden alle Exons einzeln sequenziert.

5. Sensitivitätstest

Es ist davon auszugehen, dass zugeschnittene Adenome bzw. Polypen einen hohen Anteil Tumorgewebe tragen. Dennoch besteht eine Kontamination durch Normalgewebe, das die Detektion eines mutierten Proteins erschweren könnte. Um diesen Kritikpunkt zu entkräften, wurde ein Sensitivitätsversuch durchgeführt. Die analytische Sensitivität des PTT wurde durch limitierende Verdünnung von mutierter Tumor-DNA in Normalgewebe-DNA getestet.

Der Versuch beantwortet die grundlegende Frage, welche Menge an Tumorgewebe in Normalgewebe noch nachgewiesen werden kann.

Dafür wurde zum einen Probe 12BII benutzt, die zweifellos in Segment 3 des Exon 15 eine mutierte etwa 39 kDa schwere Bande von hoher Signalintensität zeigt. Zum anderen wurde eine Probe Wildtyp-DNA verwendet. Von beiden Proben wurde jeweils mittels der PCR das Segment 3 amplifiziert. Nach ausreichender Materialproduktion wurde die DNA-Konzentration in beiden Proben photometrisch gemessen und anschließend einander angeglichen. Die Tumor-DNA wurde in serieller Verdünnung bis zu einem Verhältnis von 1:24 (Tumor- / Normal-DNA) mit Normal-DNA vermischt. Anschließend wurden diese Ansätze wie zuvor beschrieben *in vitro* transkribiert und translatiert. Nach SDS-PAGE und Western Blot wurde diejenige Verdünnung ermittelt, in der die Tumor-DNA im Hintergrund von Wildtyp-DNA noch nachweisbar war.

6. Methode der CEACAM1-Expressionsbestimmung

Die CEACAM1-Expressionsbestimmung erfolgte nach der Methode von NEUMAIER et al., 1993.

Von makroskopisch zugeschnittenen Adenomproben und angrenzendem Normalgewebe desselben Patienten wurde die Gesamt-RNA präpariert und Northern Blots durchgeführt. Sowohl in Normal- als auch in Tumorgewebe erfolgte der Nachweis der Expressionsänderung von CEACAM1 mittels densitometrischer Auswertung der Northern Blot-Signale. Im Anschluß daran wurden die Northern Blots mit einer Cytokeratin 18-spezifischen Sonde zur Normalisierung des epithelialen Anteils der Normal- und Tumorproben rehybridisiert.

Die Daten zur CEACAM1-Expression lagen zu Beginn dieser Arbeit vor (NOLLAU et al., 1997, NEUMAIER unveröffentlichte Daten).

III. Ergebnisse

1. Systematik der Proben

Folgende 26 Adenombiopsien lagen als stabilisierte Zellhomogenate vor (siehe Material und Methoden, 6. DNA / RNA):

1BII, 7B, 8BI, 9BII, 10B, 12BII, 13BI, 13BII, 14BI, 14BII, 15BI, 15BII, 18BI, 19BI, 19BII, 21B, 23BI, 23BII, 24BI, 25BI, 25BII, 29BI, 29BII, 30B, 31B, 32B.

Bis auf die Proben 9BII, 14BII und 23BII, deren Exons 1-14 einzeln sequenziert wurden, existierten zudem die zu den einzelnen Proben korrespondierenden RNA-Proben.

BI und BII besagt, dass es sich jeweils um Biopsien vom selben Patienten aus unterschiedlichen kolorektalen Adenomen handelt.

Gleichzeitig wurde bei diesen Patienten Normalgewebe biopsiert, das als Negativkontrolle bei der Durchführung der Experimente diente.

Zur Normalisierung der Tumorproben wurden zusätzlich zu deren DNA-Extraktion, die DNA einiger Wildtyp-Proben extrahiert.

Von den 26 Adenomproben sind 20 für die Expression von CEACAM1 auswertbar. Für folgende Proben konnte keine Auswertung der CEACAM1-Expression vorgenommen werden: 1BII, 7B, 10B, 12BII, 21B und 29BII.

Sie tragen zur Verifizierung der Daten über die Mutationsfrequenz des APC-Gens bei.

2. RT-PCR von Exon 1-14 (Segment1)

In einer reversen Transkriptase-Reaktion wurde cDNA aus den RNA-Proben hergestellt.

3. DNA - Extraktion

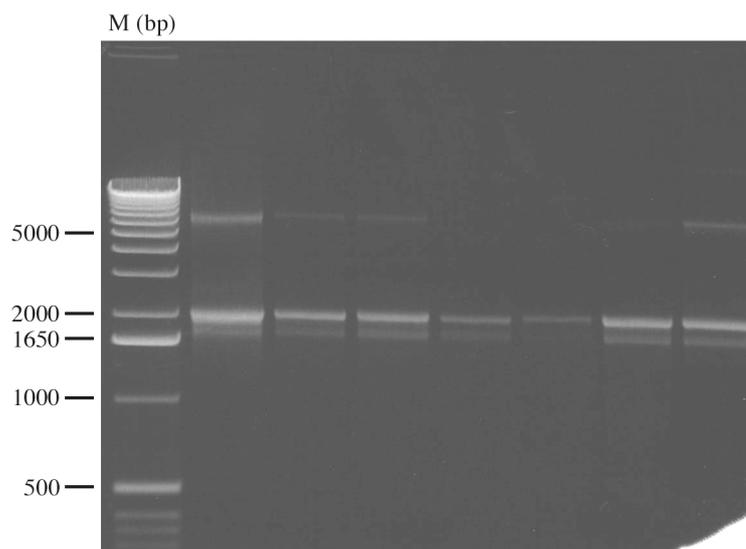
Nachdem die genomische DNA aus den Adenom- und Normalproben extrahiert war, wurde sie in jeweils 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Davon wurde ein Aliquot von je 10 µl auf einem Agarosegel überprüft. Semiquantitativ an einem λHindIII-Molekulargewichtsmarker gemessen, wurden hochmolekulare Banden intakter DNA größer als 23 kb identifiziert. Der Einsatz von 5 µl der Proben für die PCR der Segmente 2 bis 5 erwies sich als optimal.

4. PCR-Produkte der Segmente 1 bis 5

4.1 PCR-Produkte des Segment 1

Der Einsatz von jeweils 2 µl cDNA ist ausreichend für eine PCR von Segment 1. Je ein Aliquot von 10 µl wurde im Anschluß an die PCR-Reaktion mit Ladepuffer versetzt und auf einem 1,2 %igen Agarosegel bei einer Stromstärke von etwa 80 mA elektrophoretisch getrennt. Anschließend konnten die Banden mittels des Ethidiumbromids unter UV-Licht visualisiert werden.

Abbildung III. 1



Das Polaroidfoto zeigt die zu erwartende etwa 2,0 kb große Segment 1-Bande.

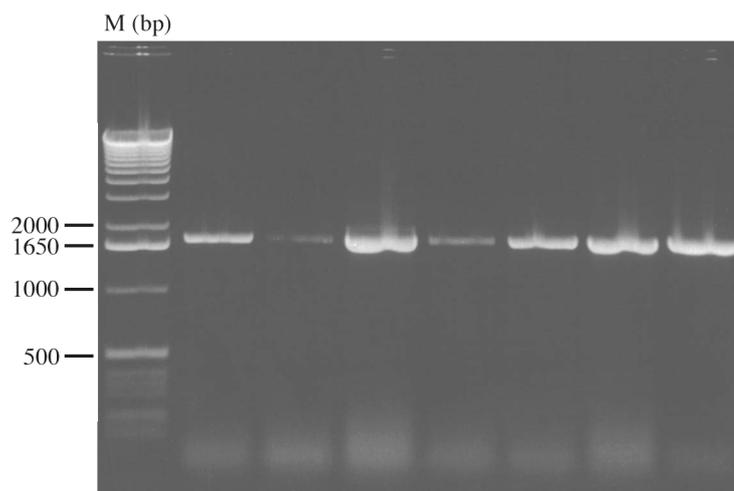
4.2 PCR-Produkte der Segmente des Exon 15

Von der extrahierten DNA aller 26 Adenomproben sind die Segmente 2 bis 5 amplifiziert worden. Letztlich mußten dadurch 104 (4x26) verschiedene Ansätze von PCR-Produkten mittels eines 1 %igen Agarosegels überprüft werden. Alle Ergebnisse wiesen eine hohe Effizienz der PCR-Reaktionen auf. Die folgenden Abbildungen zeigen aber aufgrund des großen PCR-Proben-Kollektivs jeweils nur einige repräsentative Beispiele.

4.2.1 PCR-Produkte des Segment 2

Von dem 50µl PCR-Gemisch wurde nach Ablauf der Reaktion jeweils ein Aliquot von 10µl mit je 1µl 10fach Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und nach einer einstündigen Elektrophorese mit einer Stromstärke von etwa 80 mA unter UV-Lichtbestrahlung visualisiert und auf den Erfolg der PCR überprüft.

Abbildung III. 2



Das vorliegende Polaroidfoto zeigt das amplifizierte Segment 2, etwa 1,7 kb große Banden von starker bis weniger starker Intensität, die mit gutem Erfolg für die *in vitro* Transkription eingesetzt werden konnten.

4.2.2 PCR-Produkte des Segment 3

Auch vom PCR-Reaktionsgemisch des Segment 3 wurde das DNA-Fragment eines Aliquots von 10µl mit Laufpuffer versetzt und mittels des Ethidiumbromids im Agarosegel unter UV-Lichtbestrahlung sichtbar gemacht.

Die folgende repräsentative Abbildung zeigt das amplifizierte Segment 3 aus 7 der 26 untersuchten Adenombiopsien.

Abbildung III. 3

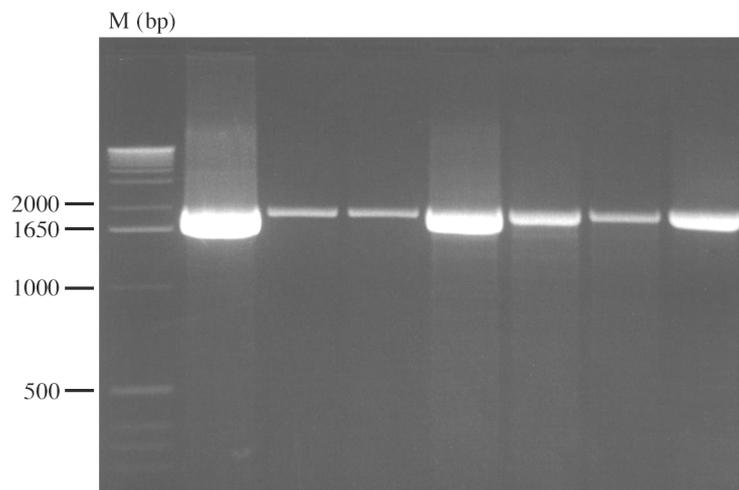
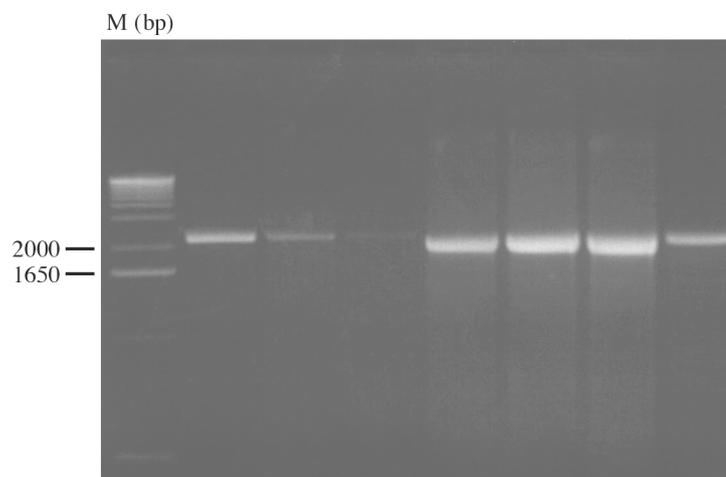


Abbildung III.3 zeigt die 1,95 kb große spezifisch amplifizierte Bande, welche Segment 3 darstellt. Da jeweils gleiche Probenvolumina in die PCR eingesetzt wurden, repräsentiert dieses Foto durch die unterschiedlich starke Fluoreszenz der Banden zum einen die unterschiedliche Ausgangskonzentration der extrahierten DNA und zum anderen die unterschiedliche Qualität der Proben, die sich z.B. durch Inhibitoren der PCR ergeben kann.

4.2.3 PCR-Produkte des Segment 4

Bei Segment 4 handelt es sich mit ca. 2,3 kb um das größte aller Segmente. Das angefertigte Polaroidfoto zeigt auch für dieses Segment sehr unterschiedlich konzentrierte PCR-Produkte. Die Ausbeute ist aber in keinem Fall limitierend für die nachfolgenden analytischen Schritte.

Abbildung III. 4



Anhand des mitaufgetragenen 1 kb- DNA-Molekulargewichtsmarkers können die 2,3 kb großen Banden eindeutig identifiziert werden.

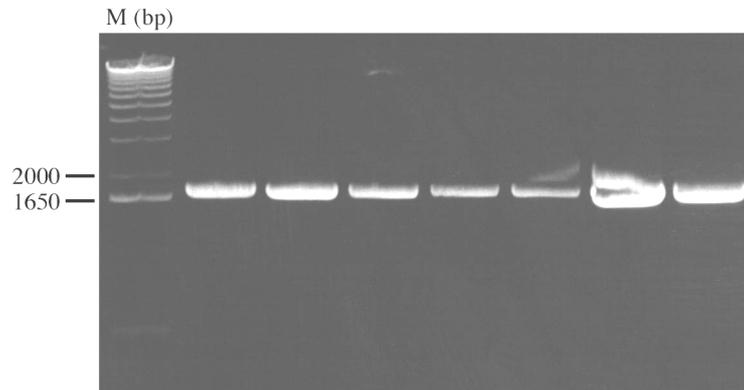
4.2.4 PCR-Produkte des Segment 5

Mit den PCR-Produkten des Segment 5 wurde wie mit denen der anderen Segmente verfahren. Ein Aliquot von 10µl ist mit Ladebuffer versetzt auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen worden. Anschließend erfolgte eine Elektrophorese für eine Stunde bei etwa 80 mA.

Nach dieser Zeit wurde der Erfolg der PCR unter UV-Lichtbestrahlung überprüft.

Folgende Abbildung zeigt die Resultate von 7 repräsentativen Beispielen der 26 Proben:

Abbildung III. 5

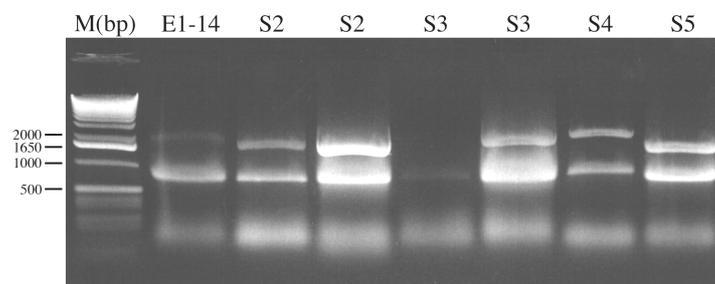


Das Foto zeigt die etwa 1,7 kb großen Banden ähnlich konzentrierter PCR-Produkte unterschiedlicher Proben, die dem amplifizierten Segment 5 entsprechen.

5. *in vitro* Transkription

Es erwies sich als optimal, 10µl PCR-Produkt mit 5µl Transkriptionsmix zu versetzen, auf 20µl mit ddH₂O aufzufüllen und unter streng RNase-freien Bedingungen zu inkubieren. Nach etwa 60 min Inkubationszeit, wurde die eine Hälfte des Ansatzes (10µl) mit einer Stopplösung versetzt auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und die entstandene mRNA auf ihre Integrität hin überprüft. Zuvor waren die für die Agarosegelelektrophorese benötigten Materialien, wie Kammer, Tray und Kamm für eine Stunde in 0,5 M Natronlauge eingelegt worden, um die RNasen zu inaktivieren. Die andere Hälfte des Transkriptionsansatzes wurde nach erfolgreicher Transkriptionsreaktion direkt mit dem Translationsmix inkubiert. Folgende Abbildung zeigt jeweils ein bis zwei Beispiele der Segmente 1 bis 5.

Abbildung III. 6



Das Foto zeigt jeweils zwei Banden. Die untere Bande entspricht der neu synthetisierten mRNA, die obere ist das dazugehörige PCR-Produkt. Die erste Probe des Exon 1-14 beweist, daß auch aus auf dem Gel kaum sichtbaren schwachen PCR-Produkten, eine für die *in vitro* Translation angemessene mRNA-Konzentration synthetisiert werden kann.

Bei der Transkriptionsreaktion handelt es sich im wesentlichen um eine "transcription-based amplification" (TBA) (ROLFS et al., 1992), eine isotherme Amplifikation von Nukleinsäuren. Enzymatische Bestandteile sind eine Reverse Transkriptase, RNase H und eine T7-RNA-Polymerase.

Die RNA-Polymerase generiert von jedem PCR-Molekül ca. 100 Kopien RNA, sofern das PCR-Ausgangsfragment mit einer entsprechend passenden T7-Promotorsequenz ausgestattet ist. Dies erklärt, warum auch von geringen Mengen PCR-Ausgangsprodukt ausreichende Mengen an RNA generiert werden können (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998).

6. Autoradiographien

Die Resultate der Chemilumineszenzreaktion wurden mit den Northern Blots aus der Untersuchung der CEACAM1-Expression von NOLLAU et al., 1997 (siehe Material und Methoden, S.21), die zu Beginn dieser Arbeit vorlagen, verglichen und in Korrelation gebracht.

Das Bild ist die Grundlage für die Korrelation der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen aus der CEACAM1-Expressionsbestimmung. Sämtliche Autoradiographien wurden im Durchschnitt Belichtungszeiten von etwa 1 min ausgesetzt. Diese Zeit ergab die optimalen Resultate.

verwendete Abkürzungen auf den Autoradiographien

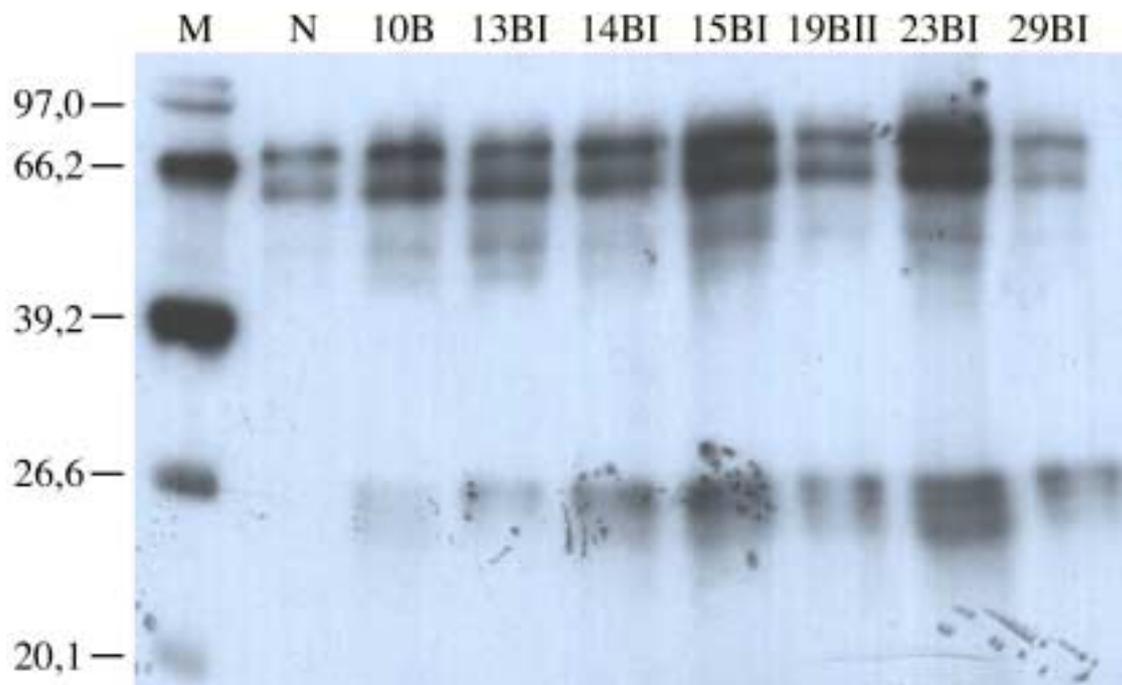
N: Normalprobe

M: Marker in kiloDalton

6.1 Exon1-14 (Segment1)

Lediglich die Proben, die keine Mutationsbande in Segment 2 bzw. 3 aufweisen, welche den "MCR"-Komplex enthalten, wurden auf eine Mutation in diesen Exons hin überprüft. Es konnte keine Mutation identifiziert werden.

Abbildung III. 7

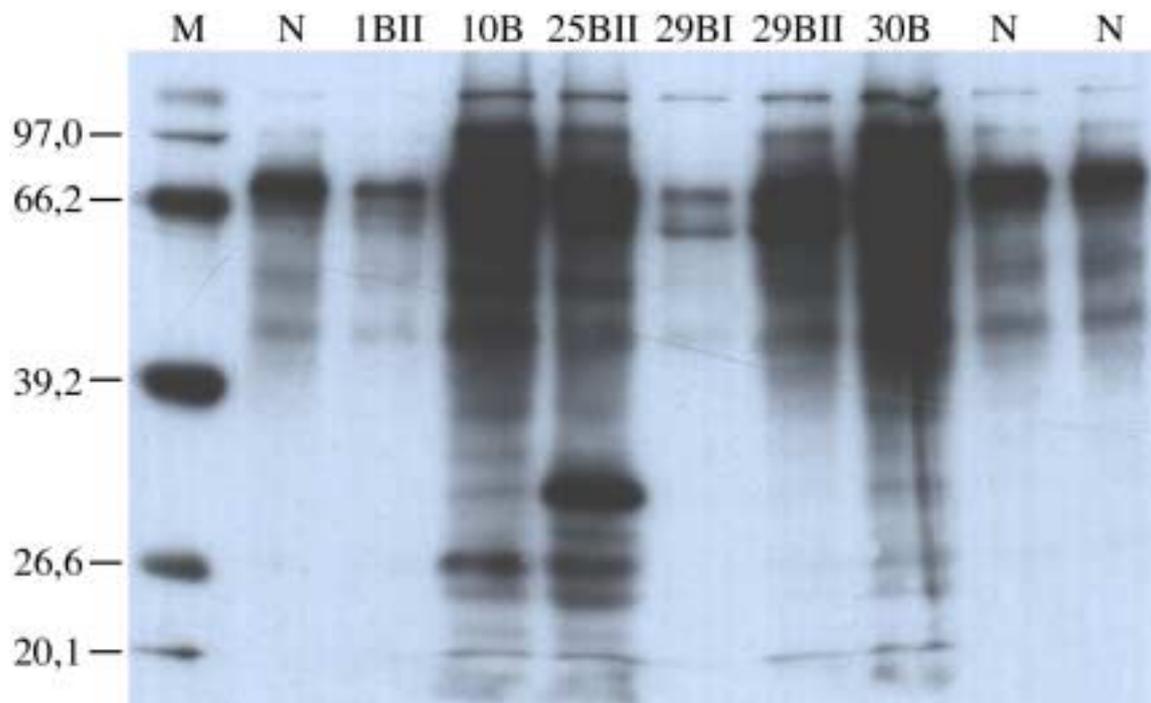


6.2 Segment 2

Segment 2 enthält die "mutation cluster region" (MCR), den Teil des APC-Gens, in dem sich somatische Mutationen überwiegend befinden.

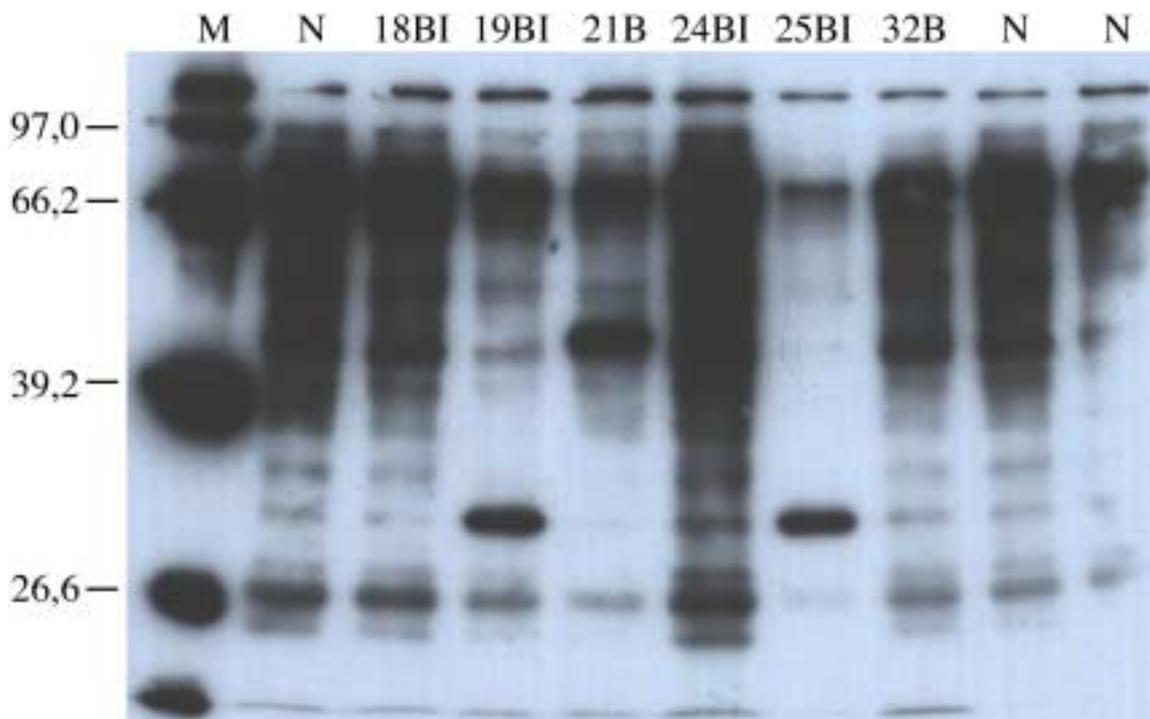
Folgende Autoradiographien stellen das Segment 2 der 26 verschiedenen Proben dar.

Abbildung III. 7



Das Bild zeigt im Vergleich zur Normalprobe eine Mutation der Probe 25BII bei etwa 32 kDa, sowie der Proben 29BI und 29BII bei etwa 60 kDa.

Abbildung III. 8

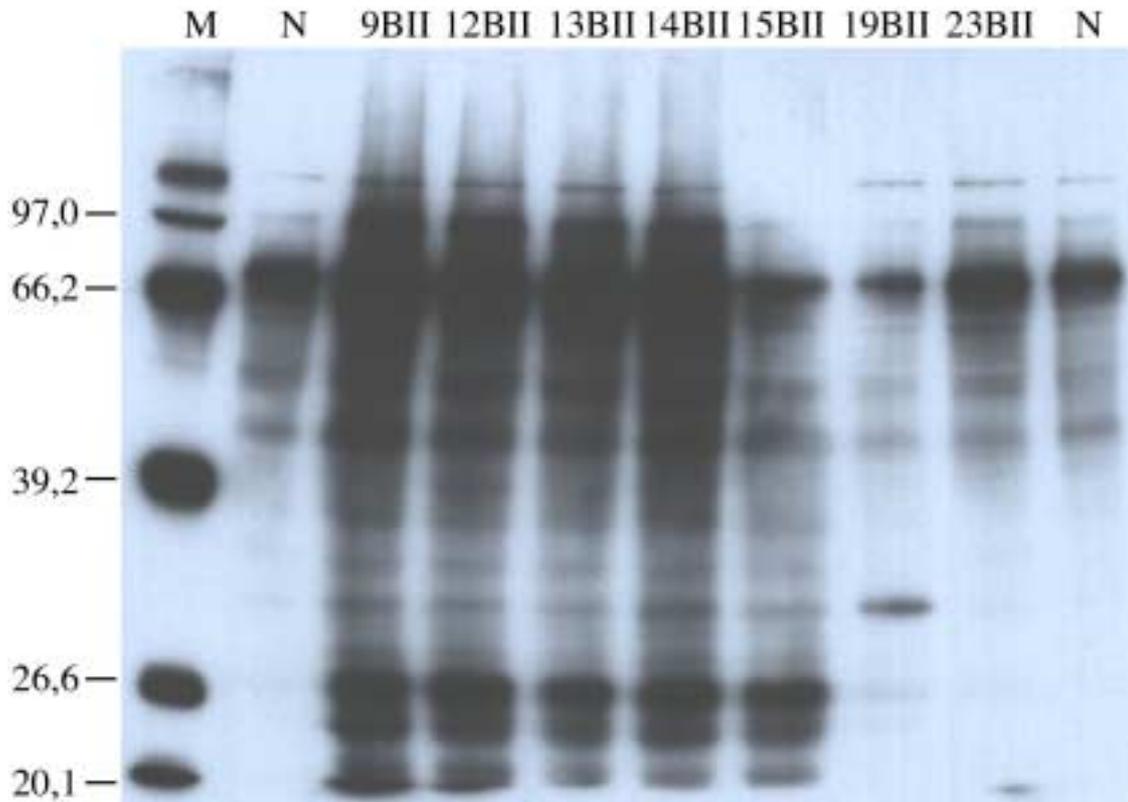


Die Proben 19BI und 25BI weisen eine Mutation bei etwa 32 kDa auf, Probe 21B zeigt ein etwa 50 kDa schweres mutiertes Protein.

Zu dieser und zu den folgenden Abbildungen muß erläutert werden, dass die Banden bei etwa 26 kDa keinen Mutationsbanden entsprechen, sondern Banden aus dem Translationsmix darstellen. Je nach dem, wie beladen die einzelnen Probestaschen sind, kommt diese 26 kDa-Bande mehr oder weniger stark zur Geltung. In vorliegender Abbildung ist diese Bande auch in der Normalprobe ausgeprägt. Das beweist, dass es sich nicht um eine Mutationsbande handelt. Eine weitere Überprüfung dieser Bande erfolgte, indem eine SDS-PAGE von einer reinen Probe Translationsmix durchgeführt wurde. Die Autoradiographie (nicht gezeigt) stellte eine deutliche Bande bei 26 kDa dar.

In anderen Abbildungen, wie z.B. die vorherige Abbildung III.2 ist es für die Beurteilung wichtig, welche Bedeutung die 26 kDa-Bande hat, da sie in diesem Fall in vielen anderen Proben aufgrund der Beladung nicht auftaucht.

Abbildung III. 9



Lediglich Probe 19BII weist ein mutiertes Protein mit einem Gewicht von etwa 32 kDa auf.

Abbildung III. 10

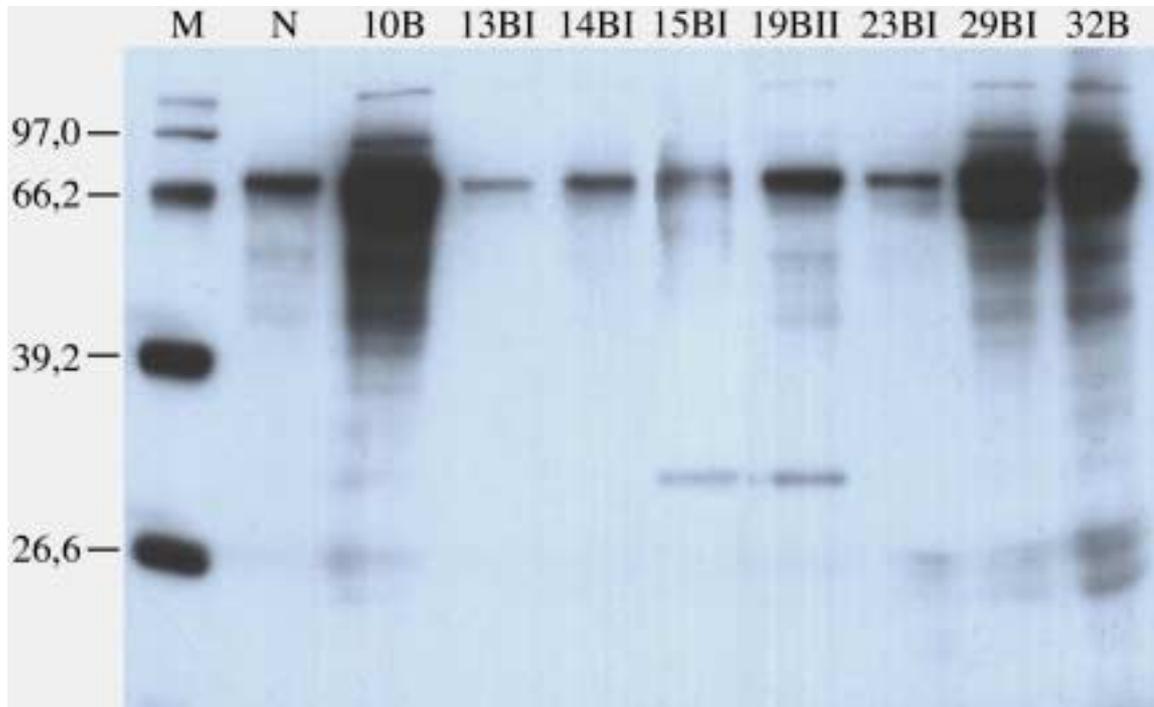
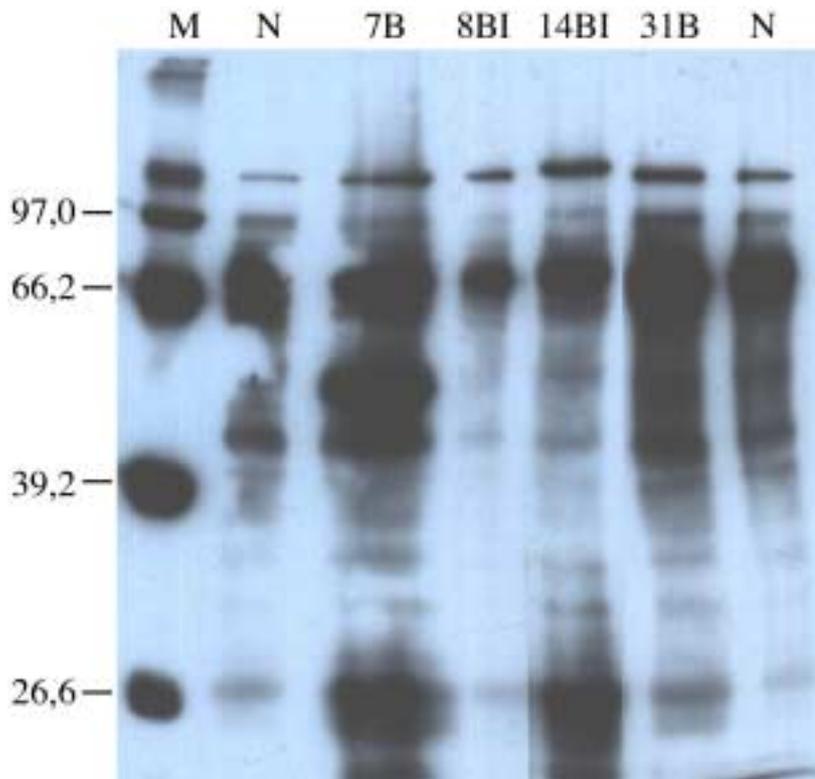


Abbildung III.10 zeigt drei mutierte Proben. Probe 29BI weist ein auf ca. 60 kDa verkürztes Protein auf. Die Proben 15BI und 19BI zeigen wahrscheinlich identische Mutationen mit Proteinfragmenten von rund 32 kDa.

Diese Autoradiographie bestätigt außerdem die Mutation in Probe 19BI (siehe Abbildung III.9).

Abbildung III. 11



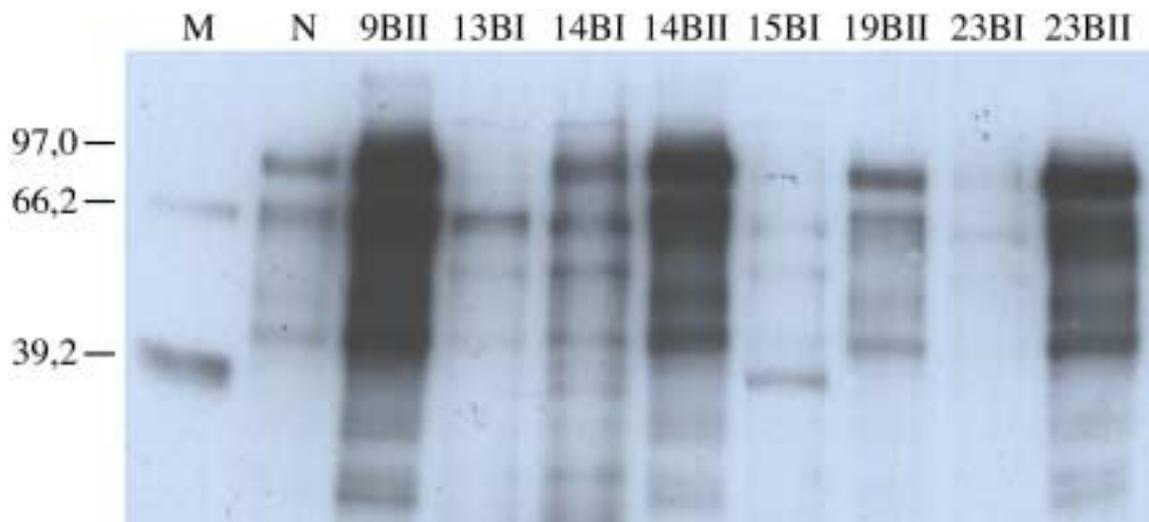
Probe 7B zeigt eine deutliche Bande eines verkürzten Proteins mit einem Gewicht von etwa 55 kDa.

6.3 Segment 3

Segment 3 umfaßt wie auch das Segment 2 den "MCR"-Komplex, in dem sich über 60 % aller somatischer Mutationen befinden.

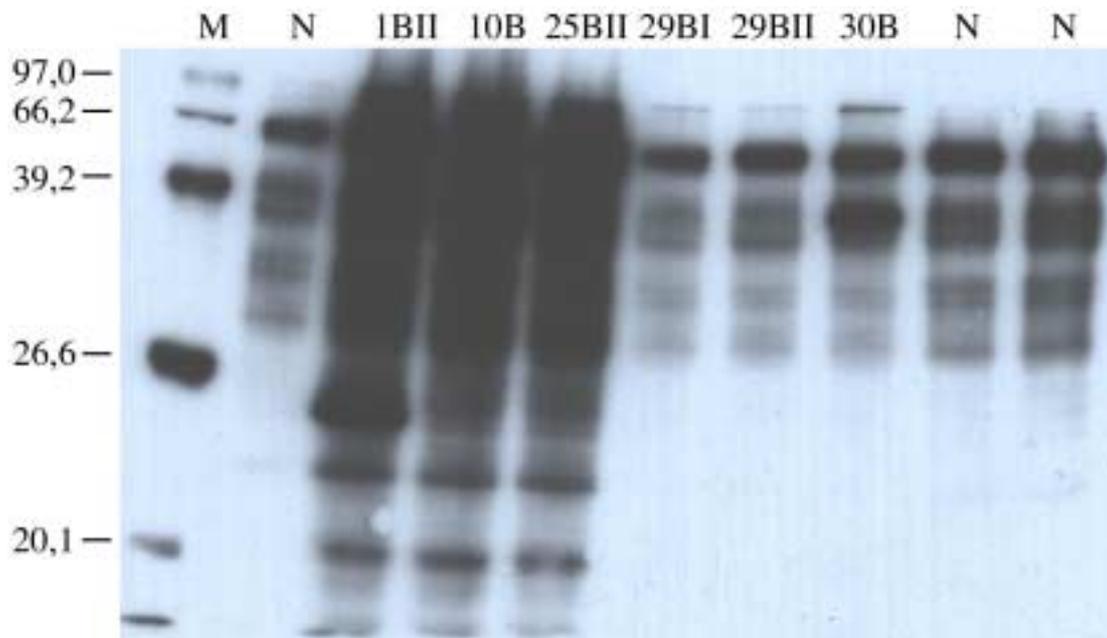
Folgende Autoradiographien stellen die Resultate der Untersuchung des Segment 3 des Exon15 dar.

Abbildung III. 12



Es ist eine Mutationsbande der Probe 15BI bei etwa 39 kDa zu erkennen.

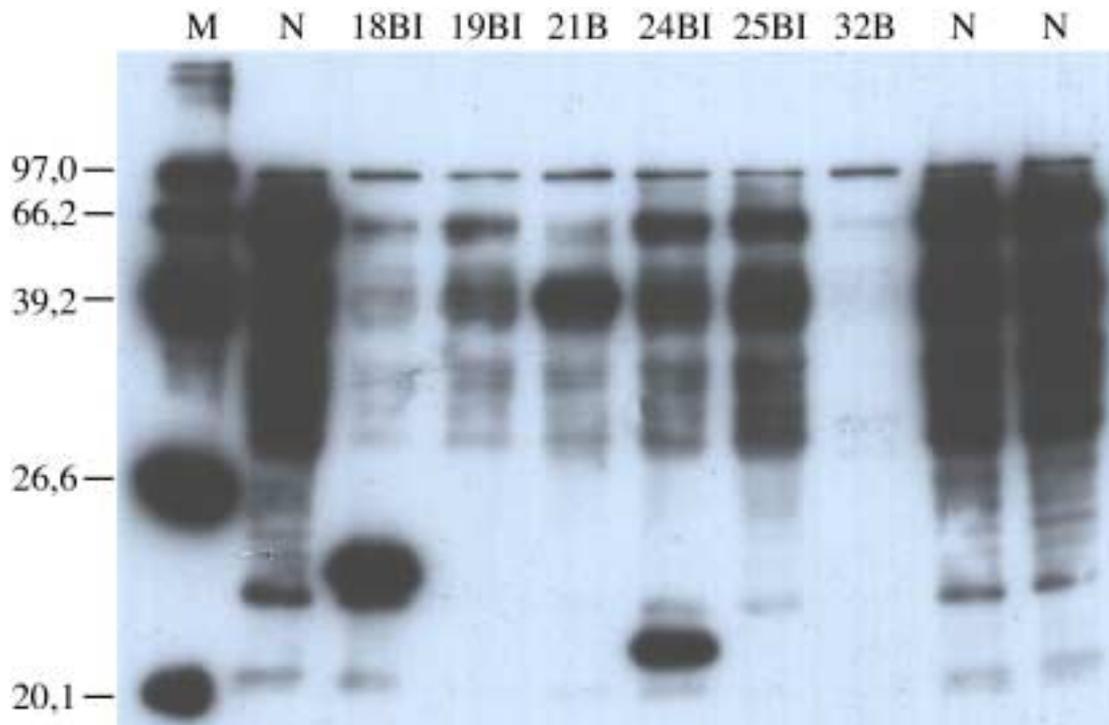
Abbildung III. 13



Die Abbildung zeigt ein mutiertes Protein von etwa 24 kDa in Probe 1BII und eines von etwa 39 kDa in Probe 30B.

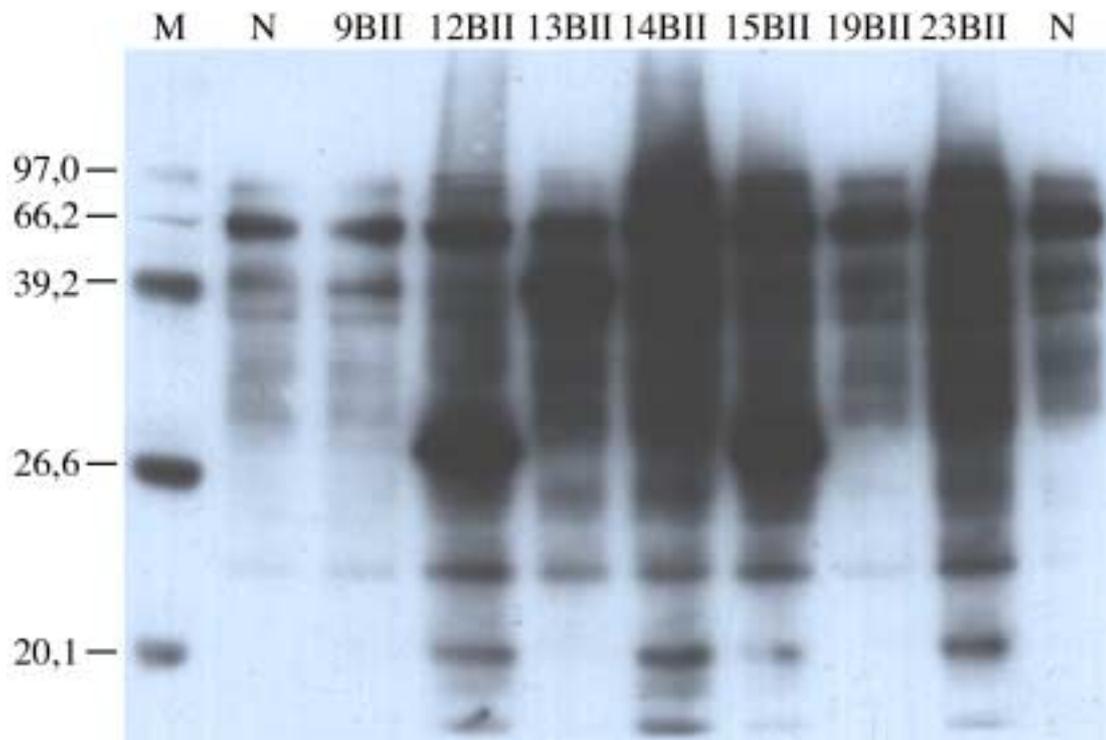
Die mit Probenmaterial überladenen Banden und die dadurch beeinträchtigte Qualität des Bildes erschwert eine exakte Beurteilung der Abbildung ohne Kenntnis der originalen Autoradiographie. In beiden Proben ist jedoch auf dem Original unzweifelhaft eine mutierte Bande der bereits erwähnten Größe zu erkennen. Dies konnte in weiteren nicht gezeigten Daten verifiziert werden.

Abbildung III. 14



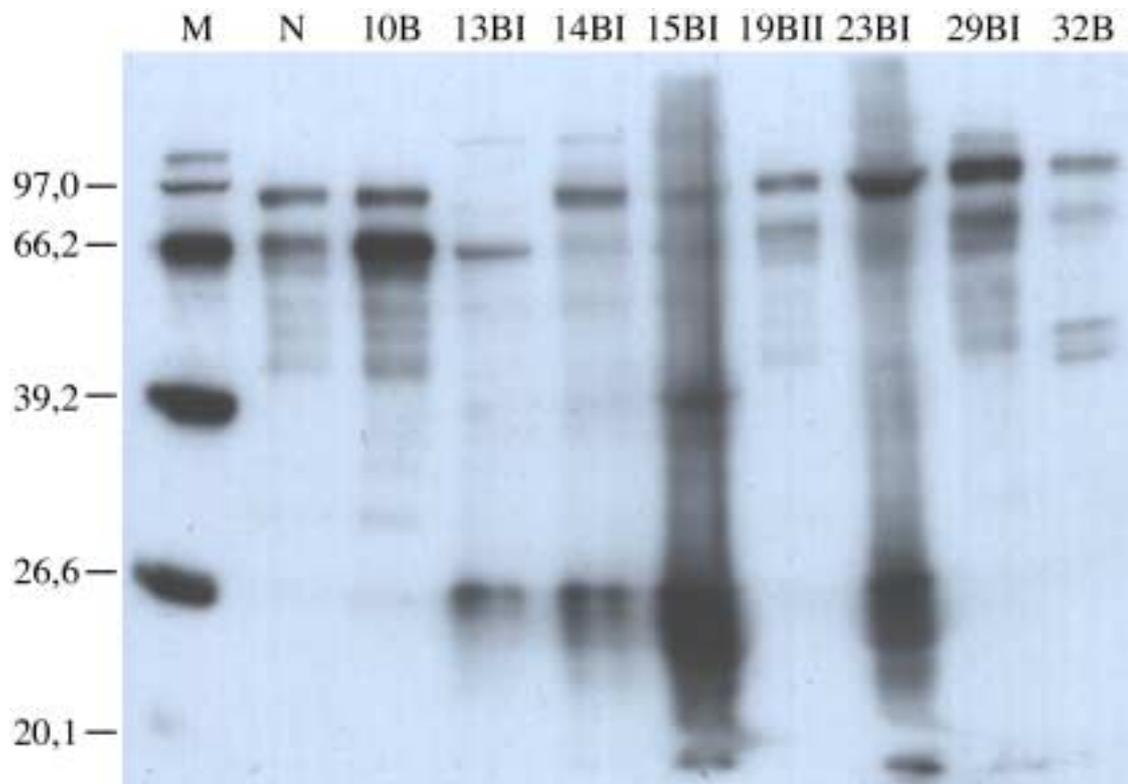
Es ist eine stark fluoreszierende Mutationsbande bei etwa 24 kDa der Probe 18BI und eine der Probe 24BI von etwa 22 kDa. Des weiteren weist Probe 21B eine mutierte Bande bei etwa 39 kDa auf.

Abbildung III. 15



Probe 12BII und 15BII weisen ein mutiertes Protein von etwa 28 kDa auf, Probe 13BII zeigt eine Mutationsbande bei etwa 39 kDa.

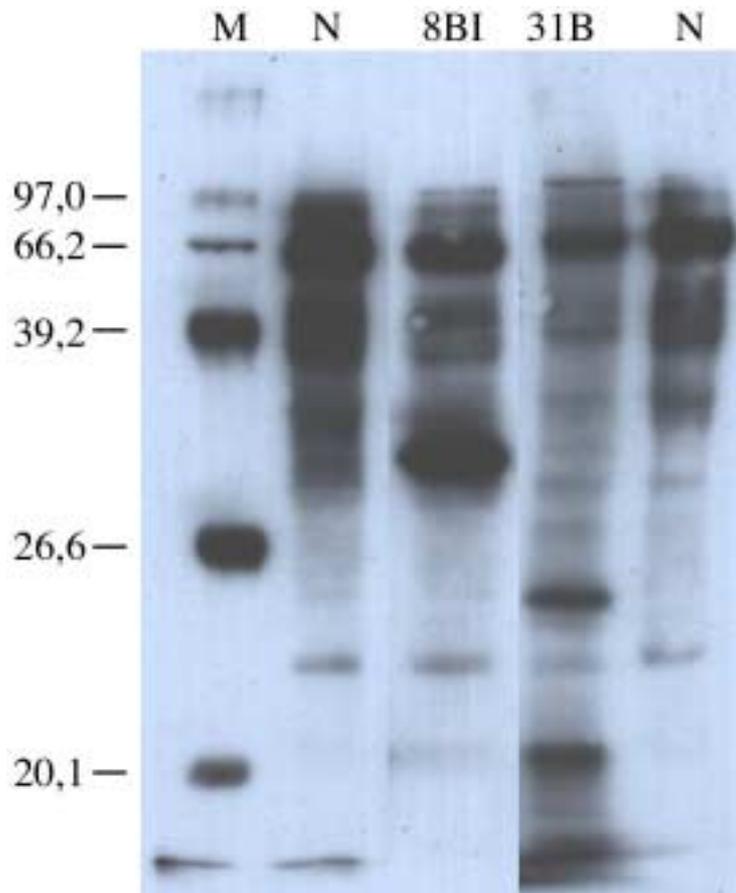
Abbildung III. 16



Probe 32B zeigt zwei Mutationsbanden im Bereich von 30 kDa.

Wie bereits in Abbildung III.12 deutlich dargestellt, weist Probe 15BI eine Mutationsbande bei etwa 39 kDa auf.

Abbildung III. 17

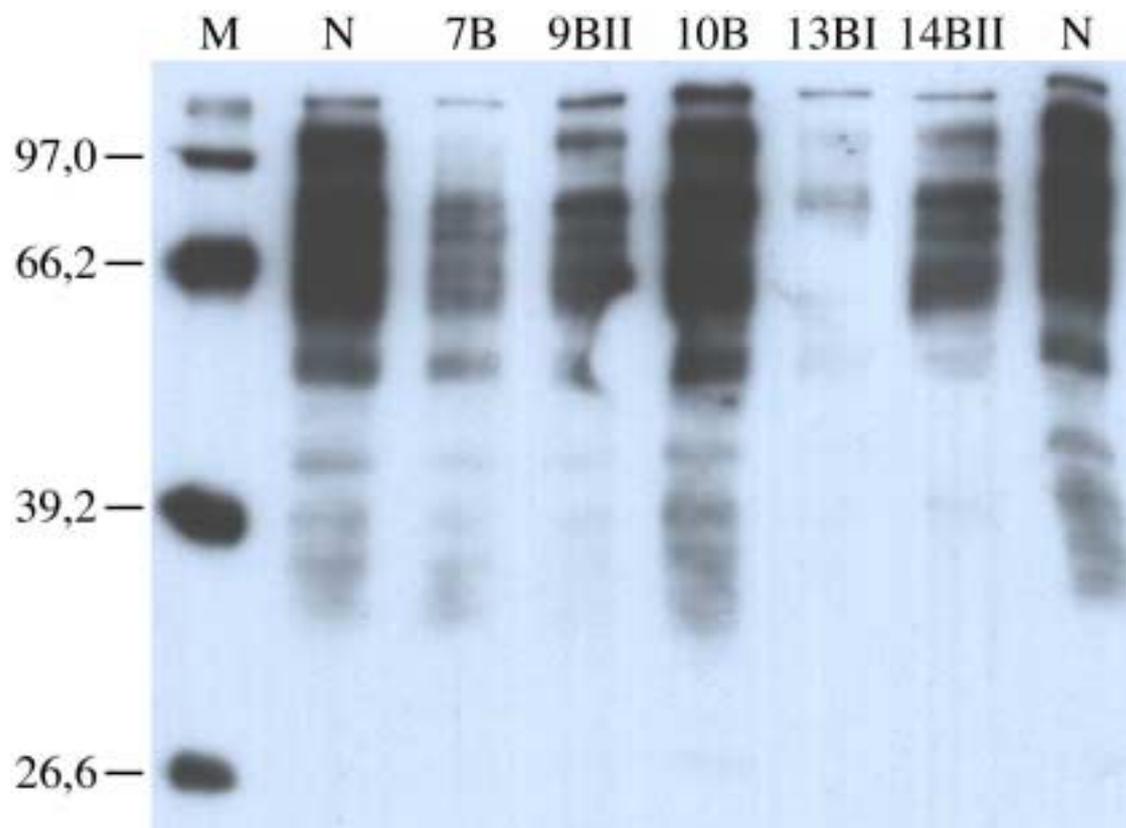


Die Autoradiographie zeigt eine mutierte Proteinbande der Probe 8BI bei etwa 32 kDa und eine der Probe 31B bei etwa 24 kDa.

6.4 Segment 4

Die folgenden Autoradiographien stellen einige repräsentative Beispielproben der Untersuchung des Segment 4 des Exon15 dar. Es konnten keine Mutationsbanden identifiziert werden.

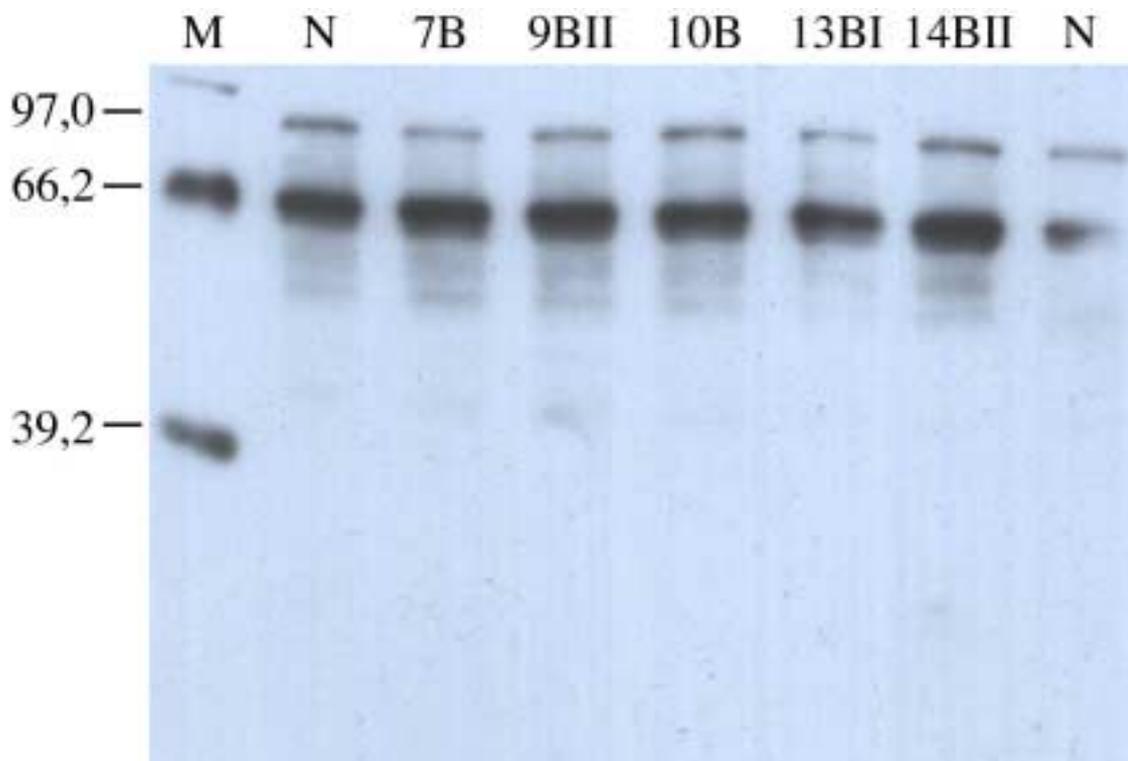
Abbildung III. 18



6.5 Segment 5

Wie in Segment 4 ist auch in Segment 5 kein mutiertes Protein zu detektieren. Daher wird nur eine repräsentative Autoradiographie abgebildet, die einige der untersuchten Proben darstellt.

Abbildung III. 19



7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Von den 26 Adenombiopsien, die auf eine APC-Genmutation untersucht wurden, waren nur für 20 dieser Biopsien Bilder der Northern Blots auswertbar. Folgende Proben konnten berücksichtigt werden:

8BI, 9BII, 13BI, 13BII, 14BI, 14BII, 15BI, 15BII, 18BI, 19BI, 19BII, 23BI, 23BII, 24BI, 25BI, 25BII, 29B, 30B, 31B, 32B.

Diese Proben zeigen eine herabgesetzte Expression von CEACAM1. Einige weisen sogar einen vollständigen Verlust der CEACAM1-Expression auf.

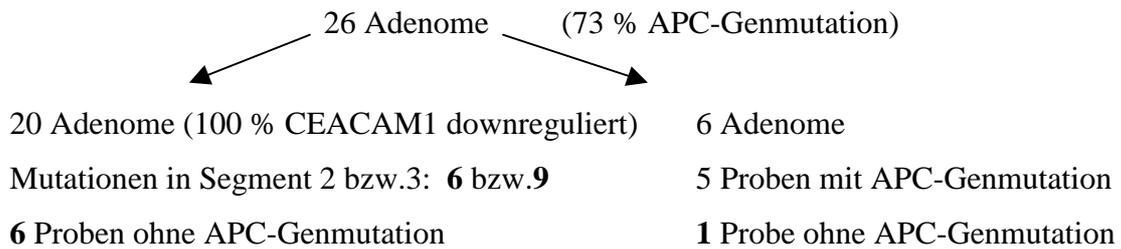
Interessanterweise zeigen zwei Tumorproben (18BI und 29B) im korrespondierenden biopsierten Normalgewebe eine verminderte Expression der 3,9 kb schweren CEACAM1-mRNA, die für die lange Spliceform kodiert.

Die für die CEACAM1-Expression charakterisierten Proben von NOLLAU et al., 1997 wiesen eine CEACAM1-Downregulation von über 80 % der Fälle auf. Die für diese Arbeit zusätzlich auswertbaren Proben waren in 100 % der Fälle CEACAM1-downreguliert.

Von den 26 untersuchten Adenombiopsien zeigen 6 Proben eine mutierte Bande in Segment 2 und 13 Proben weisen eine Mutation in Segment 3 auf. Es konnten insgesamt also 19 von 26 Proben mit einer Mutation identifiziert werden, was einer Zahl von 73 % entspricht. Dies korreliert mit den Daten, die andere Arbeitsgruppen veröffentlicht haben. In den übrigen Segmenten waren keine Mutationen zu finden.

Von den 20 auswertbaren Proben sind 5 in Segment 2 bzw. 9 in Segment 3 mutiert. In 6 CEACAM1-downregulierten Adenomen konnte keine Mutation (Probe 9BII, 13BI, 14BI, 14BII, 23BI und 23BII) identifiziert werden.

Zusammenfassende Übersicht:



Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die 20 auswertbaren CEACAM1-downregulierten Adenome:

Probe	Mutation in S2	Mutation in S3	Sequenzierung von Exon1-14	CEACAM1-Downregulation
8BI		●		***
9BII			sequenziert	**
13BI				***
13BII		●		**
14BI				***
14BII			sequenziert	**
15BI	●	●		**
15BII		●		*
18BI		●		***
19BI	●			**
19BII	●			**
23BI				***
23BII			sequenziert	***
24BI		●		**
25BI	●			***
25BII	●			***
29B	●			****
30B		●		*
31B		●		*
32B		●		**

Zeichenerklärung:

- keine Downregulation nachweisbar
- * gering downreguliert
- ** stark downreguliert
- *** keine Expression mehr nachweisbar
- * nicht nachweisbare 3,9 kb CEACAM1-mRNA im Normalgewebe
- mutiert

8. Sensitivitätstest

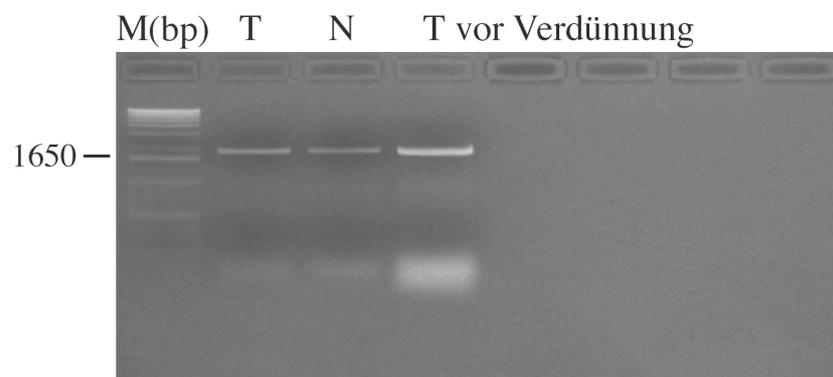
Der Sensitivitätstest dient der Beantwortung der Frage, in bis zu welchem Überschuß an Normalgewebe sich mutierte DNA aus dem Tumor noch nachweisen läßt. Die Beantwortung ist von Bedeutung, als es sich bei den Proben nicht um mikrodissiziertes, sondern um makroskopisch getrimmtes Material handelt.

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit des PTT für die Detektion mutierter Proteine wurde das Segment 2 sowohl einer Normal- als auch einer Tumorprobe, die in diesem Segment eine deutliche Mutation aufzeigt, in einer Verdünnungsreihe miteinander gemischt. Dazu wurden zunächst die DNA-Konzentrationen der Proben photometrisch einander angeglichen. Anschließend wurde eine serielle Verdünnung von 1:2 bis 1:24 (Tumor-/Normalprobe) angefertigt. Dies entspricht Tumoranteilen der Verdünnungsansätze von 50 % bis 4 %.

Die verschiedenen Gemische wurden im Anschluß daran *in vitro* transkribiert und *in vitro* biotinmarkiert translatiert, bevor sie nach SDS-PAGE, Immunoblot und abschließender Chemilumineszenzreaktion auf einem autoradiographischen Bild semiquantitativ ausgewertet werden konnten. Sowohl die Tumor- als auch die Normalprobe wurden mitgeführt. Sie dienen der Identifikation der Tumorbande.

Abbildung III.20 zeigt die PCR-Produkte, die jeweils von Segment 2 sowie der Normal- als auch der Tumorprobe angefertigt wurden. Es erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung. Die DNA-Konzentration der Tumorprobe war größer, als die der Normalprobe. Daher erfolgte eine Angleichung der DNA-Konzentrationen mittels einer TE-Puffer-Verdünnung.

Abbildung III. 20



Abkürzungen:

M: Marker

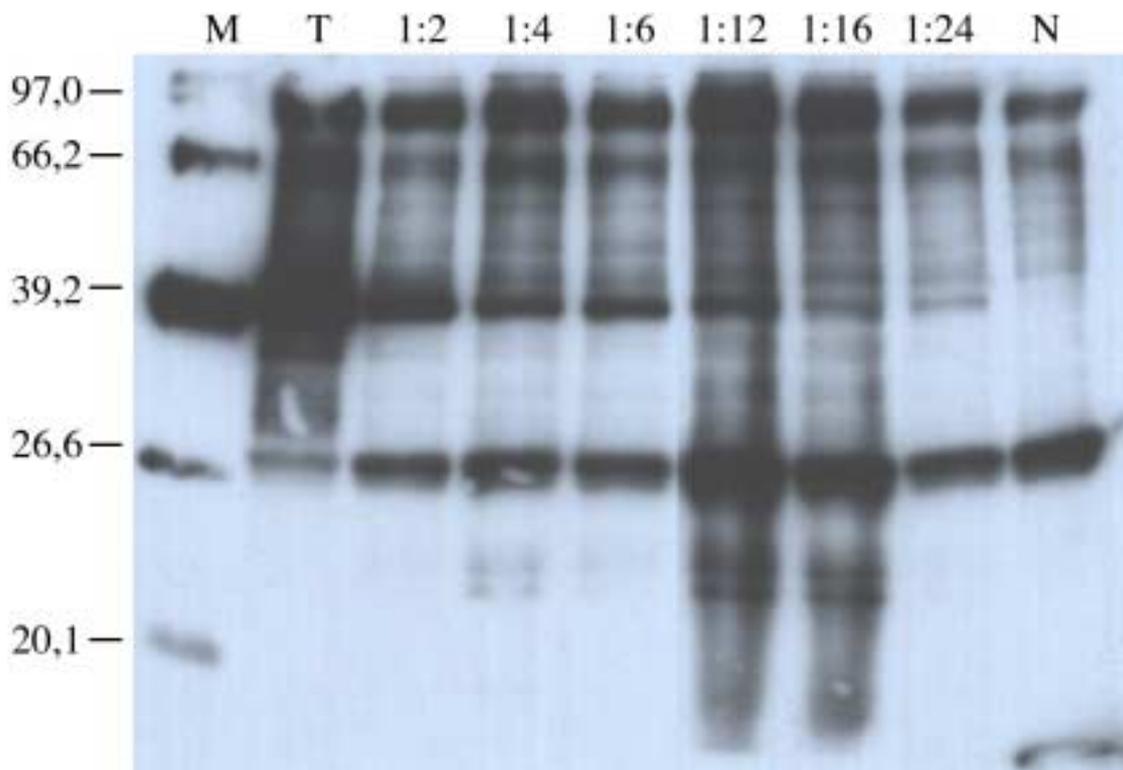
T: Tumorprobe

N: Normalprobe

Abbildung III. 21 zeigt das Ergebnis des Sensitivitätstests.

Die Tumorprobe weist eine Mutationsbande bei etwa 39 kDa auf. Diese ist in jedem Verdünnungsansatz identifizierbar. Sie noch deutlich bei einer Verdünnung von 1:24 zu erkennen.

Abbildung III. 21



Die verwendeten Proben waren makroskopisch disseziert worden. Obwohl der Tumoranteil in der Tumorprobe nicht genau bekannt ist, muß davon ausgegangen werden, dass er bei mehr als 50 % liegt. Zu einem gewissen Prozentsatz befindet sich in jeder Tumorprobe kontaminierendes Normalgewebe (bindegewebiges Stroma, lymphozytäre Infiltration etc.). Die serielle Verdünnungsreihe ist also nicht mit einer reinen Tumorprobe vorgenommen worden. Der Normalgewebsanteil liegt folglich höher als pro Verdünnungsansatz angegeben. Laut Testergebnis kann ein Tumoranteil von deutlich unter 15 % in einer Gesamtprobe mittels des PTT detektiert werden. Insgesamt ist damit eine hohe Empfindlichkeit des PTT zur Detektion von APC-Genmutationen demonstriert.

IV. Diskussion

1. Das „Multi-Step-Modell“ der kolorektalen Karzinogenese

In der heutigen Wissenschaft findet das 1990 von FEARON & VOGELSTEIN aufgestellte „Multi-Step-Modell“ allgemeine Anerkennung. Folgendes Schema gibt das Modell in geänderter Form wieder:

„Genetische Veränderungen während der kolorektalen Karzinogenese“

Abbildung IV.1:



abgeändert nach KINZLER & VOGELSTEIN, 1996

Das Modell besagt nicht nur etwas über die Art und Anzahl der Mutationen, die notwendig sind, um Kolonkarzinome zu entwickeln, sondern es sagt außerdem aus, dass die Reihenfolge des Auftretens solcher Mutationen eine wesentliche Voraussetzung für die Tumorentwicklung ist. Verschiedene Genmutationen sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Tumorentwicklung limitierend. Zur Verdeutlichung sei das k-ras erwähnt. K-ras gehört zur Gruppe der Onkogene. Es besitzt in mutiertem Zustand zelltransformierendes Potential. In mutierter Form ist dieses zwar bereits in den frühesten morphologischen Veränderungen, den hyperplastischen ACF in über 70 % Prozent der Fälle nachweisbar (PRETLOW et al., 1993, OTORI et al., 1995, LOSI et al., 1996, TAKAHASHI et al., 2000), und gilt als ein Schlüsselereignis für deren Bildung, jedoch läßt sich diese Mutation in Folgestadien zunächst nicht mehr darstellen. Die k-ras-Mutation ist also nicht persistierend. Erst bei einem späteren Adenomstadium kommt es als Zweitereignis wieder zu einem verstärkten Auftreten von k-ras-Mutationen. Dies impliziert, dass k-ras-Mutationen an der kolorektalen

Adenomentwicklung nicht zum frühen, sondern erst zu späteren Zeitpunkten kritisch beteiligt ist. Solange das APC-Gen nicht von einer Mutation betroffen ist, sind die früh betroffenen mutierten Zellen nicht zum Progress befähigt (JEN et al., 1994, NUCCI et al., 1997).

Ein anderes Beispiel ist das p53, ein Tumor-Suppressor-Gen. Es ist erst in späteren Tumorstadien von einer durch Mutationen ausgelösten Inaktivierung betroffen (z.B. BAKER et al., 1990, DAMALAS et al., 1999).

Ein häufig zu beobachtendes Ereignis bei der Entstehung von Metastasen ist eine Reduktion der E-Cadherin/alpha-Catenin-Expression (GHADIMI et al., 1999). Das E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsionssystem wird als sogenanntes „Invasion-Suppressor-System“ in Karzinomzellen angesehen (MARUYAMA et al., 1998).

Mutationen des APC-Gens werden heutzutage als früheste persistierende molekulare Veränderung in der Genese von Kolontumoren angesehen und sind somit von besonderem Interesse für die Sequenz „Normalgewebe-Adenom-Karzinom-Metastase“. Die Zahl der APC-Genmutationen wird bei über 65 % angegeben. Aufgrund der erschwerten Analyse des APC-Gens, ist zu vermuten, dass die wirkliche Prozentzahl höher liegt.

1.1 Schwierigkeiten der APC-Genanalytik

Aufgrund der Länge der kodierenden Region des APC-Gens ist die Identifikation von Mutationen in der Regel arbeitsaufwendig, zeitraubend und kostspielig und auf kleinere DNA-Abschnitte beschränkt.

Die Überprüfung der Existenz von Mutationen im APC-Gen wurde üblicherweise mittels folgender Methoden durchgeführt:

Unterschieden werden definitive und Screening-Methoden.

1.1.1 Definitive Methoden

a. Sequenzanalyse

Die Sequenzierung eines Gens weist die höchste Spezifität in der Identifikation von Mutationen auf und läßt definitive Aussagen zu. Die Sensitivität ist hingegen gering, d.h. es gibt einen hohen Anteil an falsch negativen Ergebnissen. Diese Methode wurde zum Beispiel von POWELL et al., 1992 benutzt.

1.1.2 Screening Methoden

a. SSCP-Analyse

Mittels einer sogenannten Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse (engl. single strand conformation polymorphism, SSCP), die z.B. von COTTRELL et al., 1992 und TOYOOKA et al., 1995 zur APC-Analyse angewendet wurde, wird jedes kodierende Exon auf dem APC-Gen mit entsprechenden Oligonukleotidpaaren mit Hilfe einer PCR amplifiziert, über Denaturierung in Einzelstränge getrennt und dann einer nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterzogen. Am Ende des Laufs wird die DNA gefärbt und das Gel ausgewertet. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Länge der Fragmente, die mittels SSCP analysiert werden können, auf etwa 250 Basen begrenzt ist. Bei längeren Fragmenten wird die Wahrscheinlichkeit, eine Mutation nachzuweisen, geringer. Für APC-Gen bedeutet dies, dass für das 6,5 kb schwere Exon 15, in dem sich außerdem der MCR-Komplex mit zwei Drittel aller somatischer Mutationen befindet, viele verschiedene SSCP-Analysen durchgeführt werden müssen. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Wahrscheinlichkeit, eine beliebige Mutation mittels SSCP zu entdecken, bei 60-85 % liegt (MÜLHARDT, 1999). Mutationsqualitäten werden nicht unterschieden. Daneben ist die SSCP-Sensitivität abhängig von der Position der Mutation innerhalb des untersuchten Fragments.

b. DGGE-Analyse

Des Weiteren kommt in der APC-Genanalyse die sogenannte „denaturierende Gradientengelelektrophorese“ (DGGE) zum Einsatz, wie sie z.B. von der Arbeitsgruppe FODDE et al., 1992 eingesetzt wurde. Sie ist im Ansatz der SSCP-Methode ähnlich, wobei hierbei auch Fragmente bis zu 1000 bp Länge analysiert werden können. Bei dieser Methode werden sich die unterschiedlichen Schmelztemperaturen der Schmelzdomänen der einzelnen Fragmente zunutze gemacht. Während einer Gelelektrophorese zeigen die mittels einer denaturierenden Substanz wie z.B. Harnstoff teilgeschmolzenen DNA-Fragmente entsprechend ihrer Schmelztemperatur ein verändertes Laufverhalten auf. Mutationen beeinflussen das Schmelzverhalten der betroffenen Domäne und können somit identifiziert werden.

Auch dieses Verfahren kann für das große Exon 15 nicht als optimal betrachtet werden, da im Voraus nicht bekannt ist, in welchem Bereich der Schmelzkurve sich die

Mutation auf die Laufeigenschaft auswirkt und somit das Risiko besteht, eine Mutation durch eine nicht angemessene Harnstoffkonzentration nicht identifizieren zu können (MÜLHARDT, 1999). Die geringe Sensitivität kommt außerdem zustande durch die Notwendigkeit, die Reaktionsbedingungen für jedes spezifisch zu untersuchende Fragment erneut optimieren zu müssen, da für jedes unterschiedliche optimale Bedingungen gelten.

Des weiteren muß die Mutation an einer bestimmten Stelle innerhalb des Fragments lokalisiert sein, da sonst ein detektierbarer Unterschied im Schmelzverhalten nicht zur Geltung kommt. Eine Mutation am Ende eines Fragments würde das Schmelzverhalten nicht ausreichend verändern. Im Gegensatz zum PTT, bei dem eine Mutation lediglich das Ergebnis beeinflusst, sofern sie eines der drei Stopcodons betrifft, wirkt sich bei Methoden wie der DGGE- oder SSCP-Analyse jede durch die Taq-Polymerase während der PCR verursachten Mutation auf das Resultat im Sinne einer Verfälschung aus.

c. RNase Protektions-Analyse

Diese Methode, die z.B. von NAGASE et al., 1992 angewendet wurde beruht wieder auf einer Unterteilung des APC-Gens in viele Segmente, die dann mittels PCR amplifiziert werden. Die PCR-Produkte werden mit ³²P-markierten RNA-Transkripten, die mit normaler APC-Sequenz korrespondieren, hybridisiert und mittels RNase A, die zwischen fehlgepaarten DNA-RNA-Hybriden spaltet, verdaut. Die Größe der Produkte des Verdaus wird mit Hilfe einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese durch Autoradiographie ermittelt. Auch diese Methode hat sich zur Analyse des großen APC-Gens nicht durchgesetzt, da sie wenig robust ist.

d. PTT

Der Protein Truncation Test, der 1993 von ROEST et al. entwickelt wurde, gilt als schnelle und sensitive Methode der Wahl bei der Analytik von großen multi-exonischen Genen, wie dem APC-Gen. Er deckt selektiv translations-terminierende Mutationen auf und informiert grob über die Lokalisation der Mutation.

Da über 98 % der Mutationen des APC-Gens durch Punktmutationen oder Rasterverschiebungen in Stopcodons und dementsprechend in verkürzten Proteinen resultieren, ist die Kombination von RT-PCR, *in vitro* Transkription und *in vitro* biotinmarkierter Translation mit anschließender Chemilumineszenzreaktion die

effektivste Methode zum Nachweis solch verkürzter Proteine. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass eine Mutation in unmittelbarer Nähe der Bindungsstelle des 5`-Primers auftritt, was zu der Synthese eines sehr kleinen Translationsproduktes führt, das dem Nachweis entgehen könnte. Liegt eine Mutation nahe des 3`-Primers, tritt der umgekehrte Fall ein und die Größe des mutierten Proteins ist nach der Auflösung mittels SDS-PAGE kaum noch vom Normalprodukt zu unterscheiden (VAN DER LUIJT et al., 1994). Dieses Problem wird durch die Verwendung sich überlappender Primerpaare, wie es in dieser Arbeit geschehen ist, gelöst. Der PTT wird trotz Komplexität der verschiedenen Protokollschritte als robust gefunden. Die Limitierung des PTT ist, dass er keine anderen als translations-terminierende Mutationen aufdecken kann. Dies ist aber aufgrund der oben genannten Mutationsqualitäten des APC-Gens unbedeutend.

d.1 alternatives Splicing der Exons 1-14

Für Exon 1-14 ist differentiales Splicing des Exon 9, 10 und 14 beschrieben (BALA et al., 1998) und in geringerem Maße der Exons 2, 3, 4, 11, 12 und 13 (SANTORO & GRODEN 1997), was zu mehreren unterschiedlichen Banden nach Durchführung des PTT führt. Es erschwert die Differenzierung der Splicebanden zu Mutationsbanden. In dieser Arbeit stellte dies kein Problem dar, da auf dem autoradiographischen Bild in allen Proben keine vom Normalgewebe abweichenden Bandenmuster beobachtet wurden.

d.2 Sensitivität des PTT

In einem Verdünnungsexperiment wurde die Sensitivität in der Aufdeckung von Mutationen in Gegenwart von Normalgewebe geprüft, da davon auszugehen ist, dass auch zugeschnittene Tumorproben kontaminierendes Normalgewebe enthalten. Es stellte sich heraus, dass bei einer Tumor/Normalgewebe-Verdünnung von bis zu 1:24 immer noch eine deutliche Mutationsbande auf dem autoradiographischen Bild zu erkennen war. Folglich ist ein Anteil von etwa 4 % Tumorgewebe in einer untersuchten Probe immer noch detektierbar. Dies spricht für eine sehr hohe Sensitivität des PTT. Der Versuch stützt die Aussage, der PTT sei Methode der Wahl für die Analyse des APC-Gens.

1.2 Wertung der verwendeten Methoden zur APC-Genanalytik

a. PTT - PCR

Bei dem verwendeten PCR-System handelt es sich um das Expand™ High Fidelity PCR System von Roche Diagnostics. Es enthält einen Enzym-Gemisch, das aus einer thermostabilen Taq DNA- und einer Pwo DNA-Polymerase besteht. Es ist optimiert, große DNA-Fragmente bis zu 5 kb von humaner genomischer DNA effizient zu amplifizieren. Die Pwo-Polymerase besitzt eine 3`-5` „exonuclease proofreading activity“, d.h. sie erkennt eventuell aufgetretene Synthesefehler und korrigiert diese. Bei einer Fehlerrate von $8,5 \times 10^{-6}$ ist diese Polymerase anderen Polymerasen wie der Taq DNA-Polymerase, die eine Fehlerrate von $2,6 \times 10^{-5}$ besitzt, deutlich überlegen. Das verwendete PCR-System zeigt also eine dreifach erhöhte Genauigkeit in der Synthese von PCR-Produkten auf und vermindert somit das Auftreten von PCR-bedingten Mutationen.

a.1. Optimierung der PCR-Bedingungen

Um ideale Reaktionsbedingungen zu erreichen, wurde die Mg^{2+} -Konzentration im PCR-Reaktionsgemisch optimiert. Dies ist wichtig, da das Kation neben dem Primerannealing, der Trennung der DNA-Stränge bei der Denaturierung, der Produktspezifität und der Bildung von Primerdimeren, die Fehlerrate bei der Synthese der PCR-Produkte beeinflusst und von Primern und Nukleotiden weggefangen wird. Da letztlich im APC-Gen Mutationen identifiziert werden sollen, muß die Mutationsrate, die durch die PCR hervorgerufen wird, möglichst gering gehalten werden. Für die PCR dieser Arbeit erwies sich für höchste Effizienz ein Einsatz von einer 1,5 mM Magnesium-Konzentration als optimal.

a.2. Bedeutung PCR-verursachter Mutationen

Das Argument, die hier im APC-Gen identifizierten Mutationen seien auf die während der PCR aufgetretenen Mutationen zurückzuführen, läßt sich durch die Natur der Mutationen im APC-Gen entkräften, da über 98 % dieser Mutationen in Stopcodons resultieren. Der genetische Code enthält jedoch nur drei Stopcodons. Die Wahrscheinlichkeit, dass also eine der ohnehin minimal auftretenden PCR-verursachten Mutationen ausgerechnet ein Stopcodon erzeugt, ist verschwindend gering. Zudem müssen die Mutationen früh während der Amplifikation auftreten, damit eine

ausreichend große mittels des PTT detektierbare Menge an mutierten PCR-Produkten entsteht.

b. PTT - *in vitro* Transkription

Das PCR-Produkt kann ohne weitere Aufreinigung für die Transkriptionsreaktion eingesetzt werden, die eine derartige Effizienz besitzt, dass sogar das wenige Material einer schwachen PCR, für eine ausreichende Produktion von mRNA eingesetzt werden kann. Die Qualität der Transkriptionsreaktion ist durch das ubiquitäre Vorhandensein von RNasen als kritisch zu betrachten. Daher wurde unter streng RNase-freien Bedingungen gearbeitet und im Anschluß an die Reaktion ein Aliquot auf einem Agarosegel auf die Integrität der mRNA hin überprüft.

2. Früheste genotypische Veränderungen in der kolorektalen Karzinogenese

Mutationen des APC-Gens werden heutzutage als früheste persistierende molekulare Veränderung in der Genese von Kolontumoren angesehen.

2.1 Funktionen des APC-Genproduktes

Die zentrale Rolle des APC-Proteins erklärt sich aus der Interaktion seiner funktionellen Domänen und Sequenzmerkmale mit Proteinen der Proliferationskontrolle und der Signaltransduktion.

Es besitzt ein amino-terminales Ende, das oligomerisieren kann (JOSLYN et al., 1993). Bestimmte APC-Abschnitte binden Proteine, wie z.B. EB1, ein hoch konserviertes 30 kDa schweres Protein unbekannter Funktion (SU et al., 1995) oder DLG, das humane Homolog vom Drosophila DLG (engl. drosophila discs large tumor suppressor gene), von dem aufgrund von experimentellen Beobachtungen angenommen wird, dass der Komplex an der Regulation sowohl der Zellzyklus-Progression, als auch der neuronalen Funktionen beteiligt ist (MATSUMINE et al., 1996). Des Weiteren ist APC mit den zytoplasmatischen Mikrotubuli der Zelle assoziiert und fördert deren Zusammenspiel (MUNEMITSU et al., 1994).

Wird das vollständige APC-Protein in kolorektalen Karzinomzellen exprimiert, resultiert dies in deren Apoptose (MORIN et al., 1996).

Außerdem besitzt das APC-Protein zwei Sequenzmotive, die β -Catenin binden. Über diese Assoziation ist das APC-Protein indirekt auch an der Zelladhäsion beteiligt. Eine der β -Catenin-Bindungsstellen dient zusätzlich als GKS-Phosphorylierungsstelle (MUNEMITSU et al., 1995).

In intaktem Zustand fungiert das APC-Gen wie bereits erwähnt als Tumor-Suppressor-Gen. Dies kommt dadurch zustande, dass es β -Catenin bindet, reguliert und dessen Abbau stimuliert.

In mutiertem Zustand des APC-Gens verliert das APC-Protein die Fähigkeit, β -Catenin zu binden. Über die vermehrte β -Cateninexpression und dessen folgende Akkumulation im Zytosol und Nukleus kommt es mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren wie dem T-Zell-Transkriptionsfaktor 4 (Tcf-4) zur Aktivierung bestimmter Gene, die wiederum für die Zellproliferation verantwortlich sind.

Die β -Catenin-Akkumulation ist somit das erste sichtbare Zeichen des Verlustes der APC-Genfunktion. Auf dem Weg von Mikroadenomen zu Karzinomen nimmt das Ausmaß der β -Catenin-Akkumulation im Nukleus immer mehr zu. Die immunhistochemische Detektion von β -Catenin kann daher als Surrogatmarker dienen, um das maligne Potential bei der Auswertung von Kolontumoren während früher Progression abschätzen zu können (HERTER et al., 1999).

Es wurde aber auch gezeigt, dass APC-Genmutationen allein nicht für die vermehrte nukleäre Expression von β -Catenin genügen und dass β -Catenin noch zusätzlich wichtige Funktionen hat, um eine bestimmte Schwellen-Tumorgröße überschreiten zu können (BRABLETZ et al., 2000).

Die jeweiligen Lokalisationen von APC-Genmutationen sind für bestimmte dadurch hervorgerufene Krankheiten wie z.B. die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) verantwortlich.

2.2 Catenine

Catenine sind Teil einer höheren Ordnung von Proteinstrukturen, die von äußerster Wichtigkeit für die adhäsive Funktion der Cadherine sind. Es werden alpha- (α -), beta- (β -) und gamma- (γ -) Catenin unterschieden, die alle über Cadherine oder andere transmembrane und zytoplasmatische Proteine mit dem Netz aus Aktinfilamenten verbunden sind. α -Catenin ist homolog zu Vinculin, β -Catenin ist das humane Homolog

zum Drosophila-Gen Armadillo und γ -Catenin scheint mit dem Plakoglobin identisch zu sein (KEMLER, 1993).

Die durch Cadherin/Catenin-Komplexe vermittelte interzelluläre Adhäsion ist Voraussetzung für epitheliale Integrität und Differenzierung durch Schaffung und Stabilisierung von zellulären Junktionen (ALBERLE et al., 1996, GHADIMI et al., 1999). Der intrazelluläre Anker der Cadherine wird reguliert durch die dynamische Assoziation der Catenine. Die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin bildet entweder mit β - oder γ -Catenin Komplexe, die dann über die α -Catenin-Bindung an das Netzwerk der Aktinfilamente gebunden wird. Der Anker der Cadherine zum Zytoskelett der Zelle wird durch Tyrosin-Phosphorylierung reguliert. Eine phosphorylierungsvermittelte „getrennte“ Zelljunktion zielt also auf die Catenine ab, wodurch Catenine als Komponenten des Weges der Signaltransduktion angesehen werden können (ALBERLE et al., 1996).

Catenine agieren nicht nur mit Cadherinen, sondern auch direkt oder indirekt mit dem APC-Protein. α -Catenin kann APC nur indirekt über die Bindung mit β -Catenin binden, γ -Catenin bindet sowohl APC, als auch α -Catenin und den APC/ β -Catenin-Komplex. Obwohl Catenine mit Cadherinen und mit dem APC-Protein Komplexe eingehen können, assoziieren Cadherine und das APC-Protein weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von Cateninen miteinander (RUBINFELD et al., 1995).

Für α -Catenin wurde eine verminderte Expression in kolorektalen Karzinomen, die mit schlechter Differenzierung, hohem metastatischem Potential und ungünstiger Prognose assoziiert sind, festgestellt, wodurch dem α -Catenin ein gewisser Wert als Marker für Invasivität, Metastasenausbildung und Überleben von Kolonkarzinompatienten zukommen könnte (RAFTOPOULOS et al., 1998).

β -Catenin ist ein multifunktionales Protein, das eine integrale Komponente von Adhäsionsjunktionen, wie auch ein wichtiges Mitglied auf dem Weg der Signaltransduktion darstellt. Der humane β -Catenin-Locus (CTNNB1) ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 auf der Bande p21 lokalisiert worden, einer Region, die in zahlreichen Tumoren durch somatische Alterationen betroffen ist (KRAUS et al., 1994). β -Catenin besitzt zwei wichtige Funktionen. Zum einen interagiert es als Signalprotein mit der zytoplasmatischen Domäne des Zell-Adhäsionsmoleküls

E-Cadherin, wodurch es auf die Regulation der Zellproliferation Einfluß nimmt (MULLER et al., 1998). Außerdem interagiert es mit dem APC-Tumor-Suppressor-Gen, wobei APC und E-Cadherin um die armadilloähnlichen Bindungsstellen im β -Catenin konkurrieren. Die aminoternale Domäne des β -Catenins vermittelt die Interaktion von E-Cadherin bzw. APC-Komplexen mit dem Aktinzytoskelett der Zelle, indem sie an α -Catenin (alpha-Catenin) gebunden werden.

Zum anderen besitzt β -Catenin zelltransformierendes Potential, da es in Verbindung mit Transkriptionsfaktoren, Gene für die Zellproliferation transaktivieren kann.

Für γ -Catenin (gamma-Catenin, Plakoglobin) wurde eine ähnliche transformierende Aktivität wie für β -Catenin beschrieben (HULSKEN et al., 1994). Auch γ -Catenin wird durch das APC-Protein reguliert. Das onkogene Potential kommt auch bei γ -Catenin aufgrund einer durch eine APC-Genmutation ausgelösten „Upregulation“ mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren deren Zielgene zu aktivieren, zustande. Im Gegensatz zu β -Catenin aktiviert γ -Catenin stark die c-Myc-Expression, die wiederum für die Transformation von γ -Catenin notwendig ist. (KOLLIGS et al., 2000).

2.2.1 Interaktion des β -Catenin mit dem APC-Protein

β -Catenin wird vom APC-Protein gebunden und somit in seiner Aktivität kontrolliert, reguliert und reduziert, indem es ein überschüssiges Angebot an zytoplasmatischem β -Catenin eliminiert. Für diese funktionelle Regulation ist die zentrale Region des APC-Proteins verantwortlich, die in Tumoren durch Mutationen im APC-Gen typischerweise stark verkürzt sind und somit die Eigenschaft, β -Catenin zu binden verliert (MUNEMITSU et al., 1995) und folglich nicht mehr regulatorisch in dessen Interaktionen eingreifen kann. β -Catenin wird post-translational stabilisiert, was zu einer Anreicherung im Zytoplasma bzw. im Nukleus der betroffenen Zelle führt (KOBAYASHI et al., 2000), wo es zu einer Interaktion mit dem DNA-bindenden Protein Tcf 4 kommt, welches ein transkriptionales Aktivierungspotential besitzt. Das onkogene Potential von nukleärem β -Catenin erklärt sich daher aus der Tatsache, dass es mit Hilfe von Tcf 4 in der Lage ist, Zielgene wie c-Myc, Cyclin D1 und Matrilysin, die für Tumorphiliferation oder maligner Progression verantwortlich sind, zu transaktivieren (BRABLETZ et al., 2000).

2.2.2 Prävalenz von Mutationen im APC- und β -Catenin-Gen

Sporadische Adenome des Kolons weisen in etwa 70 % der Fälle eine APC-Genmutation auf. Es stellt sich die Frage, welche molekularen Mechanismen sich hinter dem verbleibenden Rest verbergen. SPARKS et al. haben 1998 festgestellt, dass etwa die Hälfte durch eine β -Cateninmutation verursacht wird. Während in FAP-Patienten die Keimzell-Mutation des APC-Gens nicht durch eine Keimzell-Mutation des β -Catenin-Gens ersetzt werden kann (MULLER et al., 1998, CAO et al., 1999), so besteht in sporadischen Adenomen prinzipiell die Möglichkeit einer Substitution der sporadischen APC-Genmutation durch aktivierende Mutationen im β -Catenin-Gen. Veränderte funktionell signifikante Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen des β -Catenin-Proteins (MORIN et al., 1997, SAMOWITZ et al., 1999) haben ähnliche Auswirkungen auf die Zellbiochemie hat, wie der Verlust der APC-Genfunktion (SPARKS et al., 1998). Die Gesamthäufigkeit der β -Catenin-Genmutation in frühen Stadien der kolorektalen Tumorgenese wird zwischen 5,5 % und 12,5 % angegeben (MULLER et al., 1998, SAMOWITZ et al., 1999). Die Tatsache, dass eine β -Catenin-Genmutation in fortgeschrittenen Tumorstadien wie großen Adenomen oder invasiven Karzinomen sehr viel weniger häufig als in kleinen Adenomen auftritt (1,4 % bzw. 2,4 %), legt nahe, dass die APC- und die β -Catenin-Genmutation nicht funktionell äquivalent sind, und dass APC neben der β -Catenin-Regulation noch andere Tumor-Suppressor-Eigenschaften hat (SAMOWITZ et al., 1999).

Für die restlichen Tumoren, die ein intaktes APC-Gen besitzen, können heterogene molekulare Mechanismen wie Mikrosatelliteninstabilitäten, K-ras-Mutationen oder Verluste von bestimmten Allelen ursächlich in Betracht gezogen werden (LAMLUM et al., 2000).

2.2.3 Wertung der eigenen Ergebnisse hinsichtlich einer β -Catenin-Genmutation

Im Rahmen dieser Arbeit ist eine β -Catenin-Genmutation in den Proben nicht untersucht worden. Aufgrund der niedrigen Mutationsrate des β -Catenin-Gens von durchschnittlich 9 % (MULLER et al., 1998: 5,5 %, SAMOWITZ et al., 1999: 12,5 %), ist es eher unwahrscheinlich, dass sie in allen 6 APC-Gen-intakten und CEACAM1-downregulierten Proben, die APC-Genmutation substituiert hat.

Ein zentraler Befund der vorliegenden Arbeit ist, dass der CEACAM1-Verlust häufiger beobachtet wird als APC-Genmutationen. Es ist daher nicht wahrscheinlich, dass die

Downregulation der CEACAM1-Expression ein Epiphänomen der frühesten molekulargenetischen Defekte im APC / Catenin-System darstellt.

Es besteht nach den vorliegenden Ergebnissen umgekehrt eher die Möglichkeit, dass die Defekte, die zum CEACAM1-Verlust führen, vor dem Verlust der APC-Genfunktion auftreten und somit im Rahmen der kolorektalen Tumorentstehung die Ausbildung bösartiger Tumoren einleiten können.

Ob es sich um getrennte Wege handelt, ist ohne funktionelle Analyse nicht klärbar. Die hohe Frequenz beider Phänomene macht eine Verbindung jedoch denkbar.

3. Früheste phänotypische Veränderungen in der kolorektalen Karzinogenese

Wie bereits einleitend erwähnt, sind die frühesten morphologisch sichtbaren Veränderungen der Kolonschleimhaut die sogenannten atypischen Krypten-Foci (engl. „atypic crypt foci“ oder auch „aberrant crypt foci“ (ACF) genannt).

3.1 Klassifizierung und Merkmale der ACF

Atypische Krypten-Foci gelten als die frühesten morphologisch sichtbaren, die Kolonmukosa betreffende Veränderungen in der Sequenz „Normalgewebe-Adenom-Karzinom-Metastase“. Die entsprechenden Krypten sind vergrößert, haben eine elliptische luminale Öffnung, eine dickere Epithelschicht und eine vergrößerte perikryptale Region (PRETLOW et al., 1992). Die Krypten sind überwiegend monoklonalen Ursprungs (SIU et al., 1999). Histologisch betrachtet handelt es sich bei ACF um heterogene Läsionen, d.h. sie können normales Epithel besitzen, Hyperplasien, atypische Hyperplasien oder Dysplasien aufweisen. ACF werden jeweils gemäß des Grades ihrer histologischen Veränderungen durch eine zunehmende durchschnittliche Größe ausgezeichnet (BOUZOURENE et al., 1999). Anhand ihrer histologischen Merkmale werden sie in drei Gruppen unterteilt. Es werden hypertrophische ACF mit nur milden Veränderungen, hyperplastische ACF und dysplastische ACF (DI GREGORIO et al., 1997) unterschieden. Letztere werden auch als sogenannte „Mikroadenome“ bezeichnet (RONCUCCI et al., 1991). Die Histologie der ACF deutet darauf hin, dass sie sowohl Vorläufer von hyperplastischen als auch von dysplastischen bzw. adenomatösen Polypen sind (RONCUCCI et al., 1998). Molekularmethodische

Untersuchungen haben diese Tatsache in den letzten Jahren zunehmend unterstützt (SMITH et al., 1994, HEINEN et al., 1996, NUCCI et al., 1997, SIU et al., 1997, OTORI et al., 1998).

3.2 ACF-Entstehung

Zwar sind die Entstehungsmechanismen von ACF bisher nicht genau bekannt, aber in einem Tierexperiment mit transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine Karzinogenbelastung mit einem potenten murinen intestinalen Mutagen die Bildung von ACF fördert (SORENSEN et al., 1997). Dagegen soll die Verwendung protektiver Substanzen wie z.B. NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs, SHPITZ et al., 1998, HAO et al., 1999, BARON & SANDLER, 2000) deren Auftreten hemmen (OLIVO et al., 1998, KAWAMORI et al., 2000, WARGOVICH et al., 2000).

BEAZER-BARCLAY et al. haben 1996 an der *Min* (multiple intestinal neoplasia)-Maus zeigen können, dass die Entstehung von kolorektalen Tumoren durch die Aufnahme von Sulindac über das Trinkwasser der Mäuse gehemmt werden kann. Das Auftreten solcher Tumoren war in den *Min*-Mäusen nach Sulindac-Behandlung signifikant erniedrigt. Für NSAIDs wird die Wirkung dadurch erklärt, dass sie auf die Cyclo-Oxygenase 2 (COX2) abzielen, dem Schlüsselenzym im Arachidonsäuremetabolismus. Es wurde festgestellt, dass die mRNA-Expression des COX 2-Enzyms sowohl in Adenomen als auch in Karzinomen des Kolons im Vergleich zur Normalmukosa signifikant erhöht ist (HAO et al., 1999, BARON & SANDLER, 2000). Zudem wurde für die protektiven Substanzen ein apoptosefördernder und zellproliferationshemmender Effekt gezeigt (PEREIRA, 1999).

3.3 ACF-Eigenschaften

Die Vermutung, ACF seien Vorläuferläsionen für Adenome bzw. Karzinome konnte in einem weiteren Tierexperiment, welches 1996 von SHPITZ et al. durchgeführt wurde, bestätigt werden. Nach Karzinogenbelastung entstanden zwar vermehrt ACF, der Großteil unterlag jedoch nach einer gewissen Zeit der Regression. Einige ACF hingegen hatten sich zu dysplastischen Tumorstadien weiterentwickelt. In solchen Vorläufer-Läsionen ist das Entartungsrisiko um den Faktor 17 erhöht.

Andere Studien erbringen den Nachweis einer „low grade“ Mikrosatelliteninstabilität in ACF (HEINEN et al., 1996, AUGENLICHT et al., 1996) bzw. in hyperplastischen Polypen (IINO et al., 1999). Dadurch wird die Hypothese unterstützt, dass auch Polypen

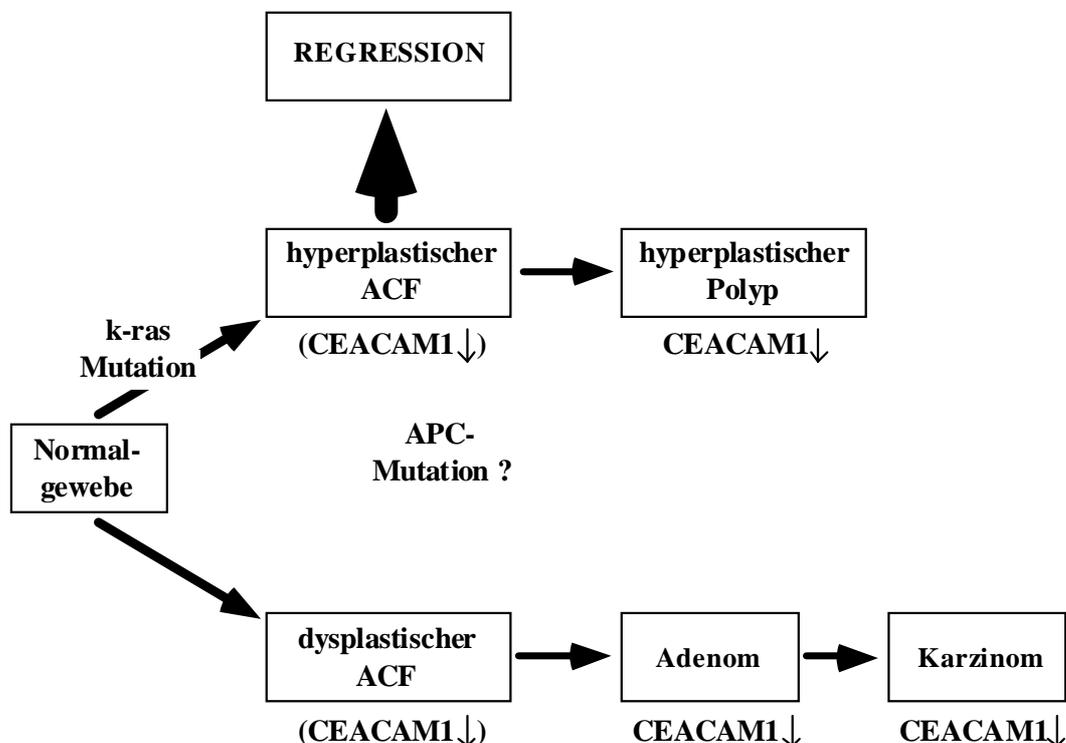
als Vorläuferläsionen für Kolonkarzinome dienen können. ACF weisen in 0-40 % der Fälle eine APC-Genmutation auf (SMITH et al., 1994, OTORI et al., 1998, DE FILIPPO et al., 1998). Die Mutation läßt sich jedoch lediglich in dysplastischen bzw. adenomatösen ACF nachweisen.

OTORI et al. haben 1995 entdeckt, dass einige dysplastische ACF zusammen mit hyperplastischen Arealen und adenomatöse ACF (Mikroadenome) zusammen mit dysplastischen Arealen existieren. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass sich einige hyperplastische ACF anstatt zu hyperplastischen Polypen, zu adenomatösen ACF weiterentwickeln können, ohne dass dafür die erforderlichen genetischen oder epigenetischen Veränderungen aufgedeckt wurden.

OTORI et al. haben 1998 weiterhin gezeigt, dass in einigen dysplastischen bzw adenomatösen ACF das APC-Gen mutiert ist.

Folgendes Schema soll die Möglichkeiten der Weiterentwicklung von ACF verdeutlichen und die mögliche Stellung von CEACAM1 und APC illustrieren:

Abbildung VI.2



4. Deutung der Ergebnisse unter Einbeziehung des aktuellen Forschungsstands

4.1 APC-Genmutation

Von 26 Adenomproben ist in 19 Proben eine Mutation identifiziert worden. Dies entspricht einer Prozentzahl von 73 %. Mittels des PTT konnten also mehr Mutationen detektiert werden, als mit den herkömmlichen Methoden, mit denen im Durchschnitt in 65 % der Fälle APC-Genmutationen entdeckt werden konnten. Der PTT stellt folglich das Mittel der Wahl zur APC-Genanalyse dar.

Des Weiteren konnten die Mutationen lediglich im MCR entdeckt werden. Laut Literatur liegt der überwiegende Anteil der somatischen APC-Genmutationen im MCR. Dies kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit verifiziert werden.

Es muß davon ausgegangen werden, dass Mutationen in anderen Bereichen des Gens in einem größeren Probenkollektiv gefunden werden können.

4.2 Korrelation der CEACAM1-Dysregulation mit der APC-Genmutation

CEACAM1 ist in Karzinomen, in sporadischen Adenomen sowie auch in hyperplastischen Polypen downreguliert.

Mit dem Ergebnis von 6 der untersuchten Proben, die eine verminderte bzw. verlorengegangene CEACAM1-Expression, jedoch keine APC-Genmutation aufweisen, wird zum ersten Mal gezeigt, dass es ein früheres persistierendes Ereignis auf dem Weg der kolorektalen Karzinogenese gibt, als die bisher als früheste molekulare Veränderung angesehene APC-Genmutation, die zwar in einigen dysplastischen ACF und in zunehmenden Maße in fortgeschrittenen Tumorstadien, hingegen nicht in Hyperplasien nachgewiesen werden konnte (OTORI et al., 1998).

4.3 CEACAM1 – ein Zwischenschritt von Hyperplasie zu Dysplasie?

Da CEACAM1 auch in hyperplastischen Polypen vermindert exprimiert ist, ist es naheliegend, dass dies auch schon in hyperplastischen ACF der Fall sein könnte. Eine verminderte CEACAM1-Expression beeinträchtigt die Zell-Zelladhäsion bzw. Interaktion, wie z.B. der Signaltransduktion, durch die wiederum aufgrund erhöhter Proliferationsaktivität, eine gesteigerte Anfälligkeit für bestimmte Genmutationen oder dergleichen, dysplastische Läsionen ausgebildet werden könnten.

Die 6 Adenome, die eine CEACAM1-Downregulation zeigen, aber keine APC-Genmutation aufweisen, deuten an, dass es sich bei der Dysregulation der CEACAM1-Expression um eine dieser gesuchten genetischen Veränderungen handeln könnte. Sie könnte einen Zwischenschritt repräsentieren, der notwendig ist, um den normalerweise im Großteil der Fälle der Regression unterliegenden hyperplastischen ACF die Möglichkeit zu eröffnen, Dysplasien zu entwickeln und somit in das „Multi-Step-Modell“ einzumünden und zur Karzinomentstehung beizutragen. Außerdem liefert die Tatsache, dass eine CEACAM1-Unterexpression bereits in hyperplastischen Polypen nachgewiesen werden konnte, einen Erklärungsansatz dafür, dass auch aus denselben obigen genannten Gründen auch aus hyperplastischen Polypen bösartige Tumoren entstehen können.

Diese Möglichkeit ist auch schon von anderen Projekten anhand des Nachweises von Mikrosatelliten-Instabilitäten in solchen Polypen gezeigt worden, die dann durch bestimmte Genmutationen über die intermediäre Bildung eines dysplastischen Zustandes zum Karzinom führen können (IINO et al., 1999).

Für die übrigen 14 Proben, in denen anhand der Adenombiopsate eine CEACAM1-Downregulation und eine APC-Genmutation gezeigt werden konnten, ist eine Aussage über einen eventuellen zeitlichen Zusammenhang nicht möglich.

Zusammenfassend sind die Fragen, die eingangs gestellt wurden, anhand der Ergebnisse dieser Arbeit folgendermaßen beantwortbar:

Zu Frage 1: In 20 Adenomproben, die eine CEACAM-Downregulation zeigen, konnte in 14 Fällen (70 %) eine APC-Genmutation festgestellt werden, was mit der Literatur zu diesem Thema konform geht und diese bestätigt.

Zu Frage 2: CEACAM1-Veränderungen und APC-Genmutationen können miteinander korreliert werden.

Es gibt Adenome mit CEACAM1-Verlust ohne APC-Genmutation, wodurch diese als initiiertes Ereignis in der kolorektalen Karzinogenese in Frage gestellt wird. Da die übrigen Tumoren beide Veränderungen aufzeigen, kann für sie keine Aussage hinsichtlich der zeitlichen Reihenfolge gemacht werden. Adenome, die eine APC-Genmutation aufweisen, ohne eine CEACAM1-Downregulation konnten in dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Die Existenz einer solchen Konstellation kann aufgrund des relativ kleinen Probenkollektivs jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Zu Frage 3: Der PTT ist unter Einbeziehung der Ergebnisse des Sensitivitätstests Methode der Wahl in der APC-Genanalytik. Trotz eines eventuellen Vorhandenseins von kontaminierendem Normalgewebe, weist er eine hohe Empfindlichkeit bei der Detektion eines mutierten APC-Proteins auf. Daher ist es für diese Art der Analyse nicht erforderlich, in der Zukunft mit mikrodissiziertem Gewebe aus makroskopisch isolierten Tumoren zu verfahren.

V. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass bei der kolorektalen Karzinogenese eine persistierende molekulargenetische Veränderung auftritt, die häufiger als die APC-Genmutation zu beobachten ist. Jene wurde bislang im allgemein anerkannten „Multi-Step-Modell“, das 1990 von FEARON & VOGELSTEIN aufgestellt wurde, als einleitendes Schlüsselereignis angesehen.

Für CEACAM1, einem Zelladhäsionsmolekül aus der CEACAM-Familie, deren Mitglieder in der Glykokalixschicht der Kolonmukosa exprimiert werden, ist eine verminderte oder verlorengegangene Expression in kolorektalen Karzinomen, in sporadischen Adenomen, sowie in hyperplastischen Polypen gezeigt worden. 20 Biopsien sporadischer Adenome, die alle eine CEACAM1-Downregulation aufweisen, sind zwecks einer Zuordnung der CEACAM1-Expression in das „Multi-Step-Modell“ auf eine APC-Genmutation hin untersucht worden, um diese zeitlich miteinander zu korrelieren. Da über 98 % dieser Mutationen in Stopcodons bzw. verkürzten Proteinen resultieren, erfolgte die Analytik mittels des Protein Truncation Tests (PTT).

Dazu wird das 8,5 kb große APC-Gen in 5 sich überlappende Segmente unterteilt, von denen Segment 1 die Exons 1-14 umfaßt. Die Segmente 2, 3, 4 und 5 umfassen das 6,5 kb große Exon 15. Dafür wird nukleäre DNA benutzt.

14 der 20 CEACAM1-downregulierten Proben zeigen eine APC-Genmutation (70 %), wodurch eine Korrelation des zeitlichen Auftretens dieser molekulargenetischen Veränderungen nicht möglich ist. Für die übrigen 6 Proben konnte jedoch keine APC-Genmutation identifiziert werden.

Die höhere Frequenz der CEACAM1-Downregulation belegt, dass es sich hierbei nicht um ein Epiphänomen, sondern um ein unabhängiges Ereignis handelt.

Diese Tatsache läßt die Schlußfolgerung zu, dass die verminderte Expression von CEACAM1 die bisher früheste persistierende molekulargenetische Veränderung in der kolorektalen Tumorigenese darstellen könnte.

VI. Literaturverzeichnis

Afar DE, Stanners CP, Bell JC: Tyrosine phosphorylation of biliary glycoprotein, a cell adhesion molecule related to carcinoembryonic antigen. *Biochem Biophys Acta* 1992 Feb 19;1134(1):46-52

Alberle H, Schwartz H, Kemler R: Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 1996 Jun 15;61(4):514-23

Augenlicht LH, Richards C, Corner G, Pretlow TP: Evidence for genomic instability in human colonic aberrant crypt foci. *Oncogene* 1996 Apr 18;12(8):1767-72

Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B: p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990 Dec 1;50(23):7717-22

Bala S, Kraus C, Wijnen J, Khan PM, Ballhausen WG: Multiple products in the protein truncation test due to alternative splicing in the adenomatosis polyposis coli (APC) gene. *Hum Genet* 1996, 98:528-533

Bamberger AM, Riethdorf L, Nollau P, Naumann M, Erdmann I, Gotze J, Brummer J, Schulte HM, Wagener C, Loning T: Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM) an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer. *Am J Pathol* 1998 Jun;152(6):1401-6

Barnett TR, Drake L, Pickle W 2d: Human biliary glycoprotein gene: characterization of a family of novel alternatively spliced RNAs and their expressed proteins. *Mol Cell Biol* 1993 Feb;13(2):1273-82

Baron JA, Sandler RS: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med* 2000;51:511-23

Beazer-Barclay Y, Levy DB, Moser AR, Dove WF, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: Sulindac suppresses tumorigenesis in the Min mouse. *Carcinogenesis* 1996 Aug;17(8):1757-60

Beauchemin N, Kunath T, Robitaille J, Chow B, Turbide C, Daniels E, Veillette A: Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene* 1997 Feb 20;14(7):783-90

Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W: Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996 Aug 15;382(6592):638-42

Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP: Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 1989 Apr 21;57(2):327-34

Berling B, Kolbinger F, Grunert F, Thompson JA, Brombacher F, Buchegger F, von Kleist S, Zimmermann W: Cloning of a carcinoembryonic antigen gene family member expressed in leukocytes of chronic leukemia patients and bone marrow. *Cancer Res* 1990 Oct 15;50(20):6534-9

Bérout C, Soussi T: APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Research* 1996, Vol 24, No.1, 121-124

Birchmeier W, Hulsken J, Behrens J: Adherens junction proteins in tumor progression. *Cancer Surv* 1995;24:129-40

Bonneton C, Larue L, Thiery JP: Current data on the role of APC protein in the origin of colorectal cancer. *Bull Cancer* 1997 Nov;84(11):1053-60

Bos MP, Grunert F, Belland RJ: Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Opa variants of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 1997 Jun;65(6):2353-61

Bouzourene H, Chaubert P, Seelentag W, Bosman FT, Saraga E: Aberrant crypt foci in patients with neoplastic and nonneoplastic colonic disease. *Hum Pathol* 1999 Jan;30(1):66-71

Brabletz T, Herrmann K, Jung A, Faller G, Kirchner T: Expression of nuclear beta.catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas. *Am J Pathol* 2000 Mar;156(3):865-70

Brandriff BF, Gordon LA, Tynan KT, Olsen AS, Mohrenweiser HW, Fertitta A, Carrano AV, Trask BJ: Order and genomic distances among members of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family determined by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1992 Apr;12(4):773-9

Brummer J, Neumaier M, Gopfert C, Wagener C: Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* 1995 Oct 19;11(8):1649-55

Cao X, Eu KW, Seow-Choen F, Cheah PY: Germline mutations are frequent in the APC gene but absent in the beta-catenin gene in familial adenomatous polyposis patients. *Genes Chromosomes Cancer* 1999 Aug;25(4):396-8

Chen T, Grunert F, Medina-Marino A, Gotschlich EC: Several carcinoembryonic antigens (CD66a) serve as receptors for gonococcal opacity proteins. *J Exp Med* 1997 May 5;185(9):1557-64

Compton SR: Interactions of enterotropic mouse hepatitis viruses with BGP2 receptor proteins. *Adv Exp Med Biol* 1998;440:25-31

- Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, Bodmer WF: Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 1992 Sep 12;340(8820):626-30
- Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I, Shtutman M, Leal JF, Zhurinsky J, Geiger B, Oren M: Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *EMBO J* 1999 Jun 1;18(11):3054-63
- De Filippo C, Caderni G, Bazzicalupo M, Briani C, Giannini A, Fazi M, Dolara P: Mutations of the APC gene in experimental colorectal induced by azoxymethane in F344 rats. *Br J Cancer* 1998 Jun;77(12):2148-51
- Di Gregorio C, Losi L, Fante R, Modica S, Ghidoni M, Pedroni M, Tamassia MG, Gafa L, Ponz de Leon M, Roncucci L: Histology of aberrant crypt foci in human colon. *Histopathology* 1997 Apr;30(4):328-34
- Dveksler G, Nedellec P, Lu JH, Keck U, Basile A, Cardellichio C, Zimmermann W, Beauchemin N, Holmes KV: Characterization of a new gene that encodes a functional MHV receptor and progress in the identification of the virus-binding site (s). *Adv Exp Med Biol* 1995;380:345-50
- Dveksler GS, Dieffenbach CW, Cardellichio CB, McCuaig K, Pensiero MN, Jiang GS, Beauchemin N, Holmes KV: Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59. *J Virol* 1993 Jan;67(1):1-8
- Eades-Perner AM, van der Putten H, Hirth A, Thompson J, Neumaier M, von Kleist S, Zimmermann W: Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. *Cancer Res* 1994 Aug 1;54(15):4169-76
- Edelman GM, Crossin KL: Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu. Rev. Biochem* 1991, 60,155-190
- Edlund M, Gaardsvoll H, Bock E, Obrink B: Different isoforms and stock-specific variants of the cell adhesion molecule C-CAM (cell-CAM 105) in rat liver. *Eur J Biochem* 1993 May 1;213(3):1109-16
- Ergun S, Kilik N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Gotze J, Wurmbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagener C: CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell* 2000 Feb;5(2):311-20
- Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990 Jun1;61(5):759-67
- Fodde R, van der Luijt R, Wijnen J, Tops C, van der Klift H, van Leeuwen-Cornelisse I, Griffioen G, Vasen H, Khan PM: Eight novel inactivating germ line mutations at the APC gene identified by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 1992 Aug;13(4):1162-8

Frangsmyr L, Baranov V, Hammarstrom S: Four carcinoembryonic antigen subfamily members, CEA, NCA, BGP and CGM2, selectively expressed in the normal human colonic epithelium, are integral components of the fuzzy coat. *Tumour Biol* 1999 Sep-Oct;20(5):277-92

Frangsmyr L, Baranov V, Prall F, Yeung MM, Wagener C, Hammarstrom S: Cell- and region-specific expression of biliary glycoprotein and its messenger RNA in normal colonic mucosa. *Cancer Res* 1995 Jul 15;55(14):2963-7

Ghadimi BM, Behrens J, Hoffmann I, Haensch W, Birchmeier W, Schlag PM: Immunohistological analysis of E-cadherin, alpha-, beta- and gamma-catenin expression in colorectal cancer: implications for cell adhesion and signaling. *Eur J Cancer* 1999 Jan;35(1):60-5

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991 Aug 9;66(3):589-600

Hammarstrom S: The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999 Apr;9(2):67-81

Hanenberg H, Baumann M, Quentin I, Nagel G, Grosse-Wilde H, von Kleist S, Gobel U, Burdach S, Grunert F: Expression of the CEA gene family members NCA-50/90 and NCA-160 (CD66) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALLs) and in cell lines of B-cell origin. *Leukemia* 1994 Dec;8(12):2127-33

Hao X, Bishop AE, Wallace M, Wang H, Willcocks TC, Maclouf J, Polak JM, Knight S, Talbot IC: Early expression of cyclo-oxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 1999 Feb;187(3):295-301

Hauck W, Nedellec P, Turbide C, Stanners CP, Barnett TR, Beauchemin N: Transcriptional control of the human biliary glycoprotein gene, a CEA gene family member down-regulated in colorectal carcinomas. *Eur J Biochem* 1994 Jul 15;223(2):529-41

Hedrick L, Cho RK, Vogelstein B: *Trends Cell Biol* 1993, 3,36-39

Heinen CD, Shivapurkar N, Tang Z, Groden J, Alabaster O: Microsatellite instability in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1996 Dec 1;56(23):5339-41

Hensley LE, Holmes KV, Beauchemin N, Baric RS: Virus-receptor interactions and interspecies transfer of a mouse hepatitis virus. *Adv Exp Med Biol* 1998;440:33-41

Herter P, Kuhnen C, Muller KM, Wittinghofer A, Muller O: Intracellular distribution of beta-catenin in colorectal adenomas, carcinomas and Peutz-Jeghers polyps.

J Cancer Res Clin Oncol 1999;125(5):297-304

Hinoda Y, Neumaier M, Hefta SA, Drzeniek Z, Wagener C, Shively L, Hefta LJ, Shively JE, Paxton RJ: Molecular cloning of a cDNA coding biliary glycoprotein I: primary structure of a glycoprotein immunologically crossreactive with carcinoembryonic antigen.

Proc Natl Acad Sci U S A 1988 Sep;85(18):6959-63

Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Ando H, Yanagisawa A, Tsuchiya E, Kato Y, Nakamura Y: Frequent somatic mutations of the APC gene in human pancreatic cancer.

Cancer Res 1992 Dec 1;52(23):6696-8

Huang J, Hardy JD, Sun Y, Shively JE: Essential role of biliary glycoprotein (CD66a) in morphogenesis of the human mammary epithelial cell line MCF10F. *J Cell Sci* 1999 Dec;112 (Pt23):4193-205

Huber M, Izzi L, Grondin P, Houde C, Kunath T, Veillette A, Beauchemin N: The carboxyl-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells. *J Biol Chem* 1999 Jan 1;274(1):335-44

Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J: E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 1994 Dec;127(6Pt2):2061-9

Hunakova L, Duraj J, Holomanova D, Sedlak J, Chorvath B: Myeloid activation antigen CD66/67: immunochemical and immunocytometric characterization with the Vth workshop monoclonal antibodies.

Neoplasma 1994;41(3):129-35

Hunter I, Sigmundsson K, Beauchemin N, Obrink B: The cell adhesion molecule C-CAM is a substrate for tissue transglutaminase. *FEBS Lett* 1998 Mar 20;425(1):141-4

Iino H, Jass JR, Simms LA, Young J, Leggett B, Ajioka Y, Watanabe: DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer?

J Clin Pathol 1999 Jan;52(1):5-9

Ichii S, Horii A, Nakatsuru S, Furuyama J, Utsunomiya J, Nakamura Y: Inactivation of both alleles in an early stage of colon adenomas in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP).

Hum Mol Genet 1992 Sep;1(6):387-90

Ichii S, Takeda S, Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Emi M, Fujiwara Y, Koyama K, Furuyama J, Utsunomiya J, et al: Detailed analysis of genetic alterations in colorectal tumors from patients with and without familial adenomatous polyposis (FAP). *Oncogene* 1993 Sep;8(9):2399-405

Izzi L, Turbide C, Houde C, Kunath T, Beauchemin N: cis-Determinants in the cytoplasmic domain of CEACAM1 responsible for its tumor inhibitory function. *Oncogene* 1999 Sep 30;18(40):5563-72

Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 1994 Nov 1;54(21):5523-6

Joslyn G, Richardson DS, White R, Alber T: Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90,11109-11113

Kammerer R, Hahn S, Singer BB, Luo JS, von Kleist S: Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T-cell activation. *Eur J Immunol* 1998 Nov;28(11):3664-74

Kawamori T, Takahashi M, Watanabe K, Ohta T, Nakatsugi S, Sugimura T, Wakabayashi K: Suppression of azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci by a nitric oxide synthase inhibitor. *Cancer Lett* 2000 Jan 1;148(1):33-7

Kemler R: From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 1993 Sep;9(9):317-21

Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; Vol 87, 159-170

Kleinerman DI, Tronosco P, Lin SH, Pisters LL, Sherwood RE, Brooks T, von Eschenbach AC, Hsieh JT: Consistent expression of an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) during human prostate development and loss of expression in prostate cancer: implication as a tumor suppressor. *Cancer Res* 1995, 55:1215-1220

Kobayashi M, Honma T, Matsuda Y, Suzuki Y, Narisawa R, Ajioka Y, Asakura H: Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000 May;82(10):1689-93

Kolligs FT, Kolligs B, Hajra KM, Hu G, Tani M, Cho KR, Fearon ER: gamma-catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes Dev* 2000 Jun 1;14(11):1319-31

Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H: Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 1997 Mar 21;275(5307):1784-7

Kraus C, Liehr T, Hulsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH, Ballhausen WG: Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics* 1994 Sep 1;23(1):272-4

Kunath T, Ordonez-Garcia C, Turbide C, Beauchemin N: Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene* 1995 Dec 7;11(11):2375-82

Kuroki M, Arakawa F, Matsuo Y, Oikawa S, Nakazato H, Matsuoka Y: Three novel molecular forms of biliary glycoprotein deduced from cDNA clones from a human leukocyte library.

Biochem Biophys Res Commun 1991 Apr 30;176(2):578-85

Laken SJ, Papadopoulos N, Petersen GM, Gruber SB, Hamilton SR, Giardiello FM, Brensinger JD, Vogelstein B, Kinzler KW: Analysis of masked mutations in familial adenomatosis polyposis.

Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Mar 2;96(5):2322-6

Lamlum H, Papadopoulou A, Ilyas M, Rowan A, Gillet C, Hanby A, Talbot I, Bodmer W, Tomlinson I: APC mutations are sufficient for the growth of early colorectal adenomas.

Proc Natl Acad Sci U S A 2000 Feb 29;97(5):2225-8

Losi L, Roncucci L, di Gregorio C, de Leon MP, Benhattar J: K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J Pathol* 1996 Mar;178(3):259-63

Lottspeich F, Zorbas H (Hrsg.): Bioanalytik *Spektrum Akademischer Verlag* Heidelberg · Berlin 1998

Luo W, Tapolsky M, Earley K, Wood CG, Wilson DR, Logothetis JC, Lin SH: Tumor-suppressive activity of CD66a in prostate cancer. *Cancer Gene Ther* 1999 Jul-Aug;6(4):313-21

Luo W, Wood CG, Earley K, Hung MC, Lin SH: Suppression of tumorigenicity of breast cancer cells by an epithelial cell adhesion molecule (C-CAM1): the adhesion and growth suppression are mediated by different domains. *Oncogene* 1997 Apr 10;14(14):1697-704

Maruyama K, Ochiai A, Nakamura S, Baba S, Hirohashi S: [Dysfunction of E-cadherin-catenin system in invasion and metastasis of colorectal cancer]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1998 Jul;99(7):402-8

Matsumine A, Ogai A, Senda T, Okumura N, Satoh, K, Baeg GH, Kawara T, Kobayashi S, Okada M, Toyoshima K, Akiyama T: Binding of APC to the human homolog of the drosophila discs large tumor suppressor gene. *Science* 1996;272,1020-3

McLellan EA, Medline A, Bird RP: Sequential analysis of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. *Cancer Res* 1991 Oct 1;51(19):5270-4

Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y: Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene.

Hum Mol Genet 1992b, 4:229-233

Moller MJ, Kammerer R, Grunert F, von Kleist S: Biliary glycoprotein (BGP) expression on T-cells and on natural-killer-cell subpopulation. *Int J Cancer* 1996 Mar 15;65(6):740-5

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW: Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997 Mar 21;275(5307):1787-90

Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93,7950-7954

Mülhardt C: Der Experimentator: Molekularbiologie, 1.Auflage
Gustav Fischer Verlag, 1999, Stuttgart · Jena · Lübeck · Ulm

Muenzner P, Dehio C, Fuliwara T, Achtman M, Meyer TF, Gray-Owen SD: Carcinoembryonic antigen family receptor specificity of neisseria meningitidis opa variants influences adherence to and invasion of proinflammatory cytokine-activated endothelial cells. *Infect Immun* 2000 Jun;68(6):3601-7

Muller O, Nimmrich I, Finke U, Friedl W, Hoffmann I: A beta-catenin mutation in a sporadic colorectal tumor of the RER phenotype and absence of beta-catenin germline mutations in FAP patients. *Genes Chromosomes Cancer* 1998 May;22(1):37-41

Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P: Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Mar 28;92(7):3046-50

Munemitsu S, Souza B, Muller O, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P: The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res* 1994 Jul 15;54(14):3676-81

Nedellec P, Dveksler GS, Daniels E, Turbide C, Chow B, Basile AA, Holmes KV, Beauchemin N: BGP2, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *J Virol* 1994 Jul;68(7):4525-37

Nedellec P, Turbide C, Beauchemin N: Characterization and transcriptional activity of the mouse biliary glycoprotein 1 gene, a carcinoembryonic antigen-related gene. *J Eur Biochem* 1995 Jul 1;231(1):104-14

Neumaier M., Paululat S., Chan A., Matthaes P. and Wagener C.: Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:10744-10748

Neumaier M, Zimmermann W, Shively L, Hinoda Y, Riggs AD, Shively JE: Characterization of a cDNA clone for the nonspecific cross-reacting antigen (NCA) and a comparison of NCA and carcinoembryonic antigen. *J Biol Chem* 1988 Mar 5;263(7):3202-7

Nollau P, Prall F, Helmchen U, Wagener C, and Neumaier M: Dysregulation of carcinoembryonic antigen group members CGM2, CD66a (BGP), and nonspecific cross-reacting antigen in colorectal carcinomas. *Am J Pathol* 1997 August,151, 521-30

Nollau P., Scheller H., Kona-Horstmann M., Rohde S., Hagenmüller F., Wagener C. and Neumaier M.: Expression of CD66a (human C-CAM) and other members of the carcinoembryonic antigen family of adhesion molecules in human colorectal adenomas. *Cancer Res* 57, 2354-2457, June 15, 1997

Nucci MR, Robinson CR, Longo P, Campbell P, Hamilton SR: Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum Pathol* 1997 Dec,28(12):1396-407

Oikawa S, Kuroki M, Matsuoka Y, Koaki G, Nakazato H: Homotypic and heterotypic Ca(++)-independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of the carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Jul 31;186(2):881-7

Olivo S, Wargovich MJ: Inhibition of aberrant crypt foci by chemopreventive agents. *In Vivo* 1998 Mar-Apr;12(2):159-66

Otori K, Konishi M, Sugiyama K, Hasebe T, Shimoda T, Kikuchi-Yanoshita R, Mukai K, Fukushima S, Miyaki M, Esumi H: Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. *Cancer* 1998 Sep 1;83(5):896-900

Otori K, Sugiyama K, Hasebe F, Fukushima S, Esumi H: Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. *Cancer Res* 1995 Nov 1;55(21):4743-6

Pereira MA: Prevention of colon cancer and modulation of aberrant crypt foci, cell proliferation and apoptosis by retinoids and NSAIDs. *Adv Exp Med Biol* 1999;470:55-63

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay R, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW: APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992 Sep 17; Vol 359, 235-7

Prall F, Nollau P, Neumaier M, Haubeck HD, Drzeniek Z, Helmchen U, Loning T, Wagener C: CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1996 Jan;44(1):35-41

Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL: K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst* 1993 Dec15;85(24):2004-7

Pretlow TP, O'Riordan MA, Pretlow TG, Stellato TA: Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions. *J Cell Biochem Suppl* 1992;16G:55-62

Pretlow TP, Pretlow TG: Putative preneoplastic changes identified by enzyme histochemical and immunohistochemical techniques. *J Histochem Cytochem* 1998 May;46(5):577-83

Rafter J, Glinghammar B: Interactions between the environment and genes in the colon. *Eur J Cancer Prev* 1998 May;7 Suppl 2:S69-74

Raftopoulos I, Davaris P, Karatzas G, Karayannacos P, Kouraklis G: Level of alpha-catenin expression in colorectal cancer correlates with invasiveness, metastatic potential, and survival. *J Surg Oncol* 1998 Jun;68(2):92-9

Roest PA, Roberts RG, van der Tuijn AC, Heikoop JC, van Ommen GJ, den Dunnen JT: Protein truncation test (PTT) to rapidly screen the DMD gene for translation terminating mutations. *Neuromuscul Disord* 1993 Sep-Nov;3(5-6):391-4

Rojas M, Fuks A, Stanners CP: Biliary glycoprotein, a member of the immunoglobulin supergene family, functions in vitro as a calcium-dependent intercellular adhesion molecule. *Cell Growth Differ* 1990 Nov, 1(11):527-33

Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I: PCR: Clinical Diagnostics and Research
Springer Verlag Berlin-Heidelberg 1992

Roncucci L, Modica S, Pedroni M, Tamassia MG, Ghidoni M, Losi L, Fante R, Di Gregorio C, Manenti A, Gafa L, Ponz de Leon M: Aberrant crypt foci in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998 Jun;77(12):2343-8

Roncucci L, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR: Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol* 1991 Mar;22(3):287-94

Rosenberg M, Nedellec P, Jothy S, Fleiszer D, Turbide C, Beauchemin N: The expression of mouse biliary glycoprotein, a carcinoembryonic antigen-related gene, is down-regulated in malignant mouse tissue. *Cancer Res* 1993 Oct 15;53(20):4938-45

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S, Polakis P: The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin and plakoglobin. *J Biol Chem* 1995 Mar 10;270(10):5549-55

Sadekova S, Lamarche-Vane N, Li X, Beauchemin N: The CEACAM1-L glycoprotein associates with the actin cytoskeleton and localizes to cell-cell contact through activation of Rho-like GTPases.

Mol Biol Cell 2000 Jan;11(1):65-77

Saeki K, Ohtsuka N, Taguchi F: Isolation and characterization of murine coronavirus mutants resistant to neutralization by soluble receptors. *Adv Exp Med Biol* 1998;440:11-6

Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN, Nollet F, van Roy F, Slattery ML: Beta-catenin mutations are more frequent in small adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas.

Cancer Res 1999 Apr 1;59(7):1442-4

Santoro IM, Groden J: Alternative splicing of the APC gene and its association with terminal differentiation. *Cancer Res* 1997 Feb 1;57(3):488-94

Scholzel S, Zimmermann W, Schwarzkopf G, Grunert F, Rogaczewski B, Thompson J: Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas.

Am J Pathol 2000 Feb;156(2):595-605

Shpitz B, Bomstein Y, Kariv N, Shalev M, Buklan G, Bernheim J: Chemopreventive effect of aspirin on growth of aberrant crypt foci in rats. *Int J Colorectal Dis* 1998;13(4):169-72

Shpitz B, Hay K, Medline A, Bruce WR, Bull SB, Gallinger S, Stern H: Natural history of aberrant crypt foci. A surgical approach. *Dis Colon Rectum* 1996 Jul;39(7):763-7

Singer BB, Scheffrahn I, Obrink B: The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. *Cancer Res* 2000 Mar 1;60(5):1236-44

Siu IM, Pretlow TG, Amini SB, Pretlow TP: Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. *Am J Pathol* 1997 May;150(5):1805-13

Siu IM, Robinson DR, Schwartz S, Kung HJ, Pretlow TG, Petersen RB, Pretlow TP: The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci. *Cancer Res* 1999 Jan 1;59(1):63-6

Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV, Gallinger S: Somatic APC and k-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1994 Nov 1;54(21):5527-30

Smith KJ, Johnson KA, Bryan TM, Hill DE, Markowitz S, Willson JK, Paraskeva C, Petersen GM, Hamilton SR, Vogelstein B, et al: The APC gene product in normal and tumor cells.

Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Apr 1;90(7):2846-50

Sorensen IK, Kristiansen E, Mortensen A, van Kranen H, van Kreijl C, Fodde R, Thorgeirsson SS: Short-term carcinogenicity testing of a potent murine intestinal mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine (PhIP), in Apc1638N transgenic mice.

Carcinogenesis 1997 Apr;18(4):777-81

Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998 Mar 15;58(6):1130-4

Stocks SC, Ruchaud-Sparagano MH, Kerr Ma, Grunert F, Haslett C, Dransfield I: CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. *Eur J Immunol* 1996 Dec;26(12):2924-32

Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW: APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res* 1995;55,2972-77

Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA, Dove WF: Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene.

Science 1992 May 1;256(5057):668-70

Svenberg T: Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization. *Int J Cancer* 1976 May 15;17(5):588-96

Takahashi M, Mutoh M, Kawamori T, Sugimura T, Wakabayashi K : Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis.

Carcinogenesis 2000 Jul;21(7):1319-1327

Thompson J, Mossinger S, Reichardt V, Engels U, Beauchemin N, Kommos F, von Kleist S, Zimmermann W: A polymerase-chain-reaction assay for the specific identification of transcripts encoded by individual carcinoembryonic antigen (CEA)-gene-family members.

Int J Cancer 1993 Sep 9;55(2):311-9

Thompson J, Zimmermann W, Nollau P, Neumaier M, Weber-Arden J, Schreve H, Craig I, Willcocks T: CGM2, a member of the carcinoembryonic antigen gene family is down-regulated in colorectal carcinomas. *J Biol Chem* 1994 Dec 30;269(52):32924-31

Thompson JA: Molecular cloning and expression of carcinoembryonic antigen gene family members.

Tumour Biol 1995;16(1):10-6

Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W: Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 1991;5(5):344-66

- Toyooka M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Iwama T, Miyaki M: Somatic mutations of the Adenomatous Polyposis Coli Gene in gastroduodenal tumors from patients with Familial Adenomatous Polyposis. *Cancer Res* 1995 Jul 15;55:3165-70
- Turbide C, Rojas M, Stanners CP, Beauchemin N: A mouse carcinoembryonic antigen gene family is a calcium-dependent cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 1991 Jan 5;266(1):309-15
- Valizadeh A, Karayiannakis AJ, el-Hariry I, Kmiot W, Pignatelli M.: Expression of E-cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120) in colorectal polyps. *Am J Pathol* 1997 June;150(6):1977-84
- Van Der Luijt R, Khan PM, Vasen H, Van Leeuwen C, Tops C, Roest P, Den Dunnen J, Fodde R: Rapid detection of translation-terminating mutations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene by direct protein truncation test. *Genomics* 1994; 20, 1-4
- Wargovich MJ, Jimenez A, McKee K, Steele VE, Velasco M, Woods J, Price R, Gray K, Kelloff GJ: Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis* 2000 Jun;21(6):1149-1155
- Watt SM, Sala-Newby G, Hoang T, Gilmore DJ, Grunert F, Nagel G, Murdoch SJ, Tchilian E, Lennox ES, Waldmann H: CD66 identifies a neutrophil-specific epitope within the hematopoietic system that is expressed by members of the carcinoembryonic antigen family of adhesion molecules. *Blood* 1991 Jul 1;78(1):63-74
- Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997 May 23; Vol 276, 1268-1272

DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. Ch. Wagener danke ich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung für Klinische Chemie des Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg.

Herrn Prof. Dr. M. Neumaier danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung. Die gute Zusammenarbeit und konstruktive Kritik waren der Antrieb für den intensiven Arbeitseinsatz.

Ein großes freundschaftliches Dankeschön gilt unserer Biologisch Technischen Assistentin Frau Anja Voigt, die mir stets tatkräftig zur Seite stand und ohne die wertvolle Zeit verloren gegangen wäre.

Frau Nicole Müller und Herrn Philipp Hoffmann danke ich für ihre Bemühungen, mir bei aufgetretenen Problemen Hilfestellungen zu geben.

Ein besonderer Dank geht an unsere Grafikerin Frau Sabine Wuttke, die mich bei der Darstellung der Abbildungen und der Grafiken sehr unterstützt hat.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an alle nicht genannten Kollegen im Hormonlabor, die bei Fragen immer ein offenes Ohr für mich hatten.

LEBENS LAUF

Juliane Günther, geboren am 25.12.1974 in Frankfurt

Tochter von Regine Günther geb. Bartel und Wolfgang Günther

Familienstand ledig

Schulen: 1981-1985 Grundschule, Frankfurt
1985-1994 Gymnasium, Hamburg
Juni 1994 Abitur

Universität: Oktober 1994 bis November 2000:
Medizinstudium am Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
Sommersemester 1999: Tulane Universität, New Orleans, USA

Examen: September 1996 Physikum
August 1997 Erstes Staatsexamen
Juni 1998 Erstes Amerikanisches Staatsexamen, USMLE Step1
September 1999 Zweites Staatsexamen
November 2000 Drittes Staatsexamen

Famulaturen: Februar 1997 St.Josef Hospital, Regensburg
Februar 1998 Praxis-Famulatur, Hamburg
September 1998 Louisiana State University Medical Center,
New Orleans, USA
Frühjahr 1999 Central Hospital, Windhoek, Namibia

Praktisches Jahr: Chirurgie: Hôtel Dieu, Paris, Frankreich
Innere Medizin: Albert Einstein College, New York
Ev. Amalie-Sieveling-Krankenhaus, Hamburg
Wahlfach: Dermatologie, UKE, Hamburg

Dissertation:

Seit Oktober 1997 Doktorandin bei Prof. Dr. M. Neumaier, Abteilung für Klinische Chemie, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

Titel der Dissertation:

„Charakterisierung früher molekularer Veränderungen während der kolorektalen Tumorgenese: Relation der dysregulierten CEACAM1-Expression zum "Multi-Step-Modell" der Karzinogenese.“

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....