

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

Die Rolle von E2F3 in mikrosatelliteninstabilen kolorektalen Karzinomen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ludwig Müller

aus Berlin

Würzburg, März 2014



Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Ralph Melcher

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Peter Gallant

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2015

Der Promovend ist Arzt

1. Einleitung	1
1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	1
1.1.1. Adenom-Karzinom Sequenz	1
1.2. Formen der genetischen Instabilität bei kolorektalen Karzinomen	2
1.2.1. Mikrosatelliteninstabilität (MSI).....	2
1.2.2. Chromosomale Instabilität (CSI)	3
1.2.3. Uniparentale Disomie	4
1.2.3.1. Entstehungsmechanismen der UPD in der Keimbahn	4
1.2.3.2. Entstehungsmechanismen der UPD in somatischen Zellen	5
1.2.3.3. Pathogenetische Konsequenzen der UPD	7
1.2.3.4. Uniparentale Disomie in kolorektalen Karzinomen	8
1.3. E2F Transcription Factor 3.....	8
1.3.1. Die E2F Familie	8
1.3.2. Regulation	9
1.3.3. E2F3.....	9
1.3.4. E2F3 als Onkogen.....	11
2. Zielsetzung	12
3. Material und Methoden	13
3.1. Material und Geräte	13
3.2. Gewebeproben.....	15
3.2.1. Eigenschaften und Pathologie.....	16
3.3. Methoden	17
3.3.1. Herstellung der Dünnschnitte	17
3.3.2. Entparaffinieren	17
3.3.3. Vorbehandlung	18
3.3.4. Proteinblock.....	18
3.3.5. Primärantikörper.....	19
3.3.6. Sekundärantikörper	19
3.3.7. Entwicklung und Färbung.....	20
3.3.8. Aufsteigende Alkoholreihe.....	21
3.3.9. Eindecken in Entellan.....	21

4. Ergebnisse, Immunhistochemische Färbung	21
4.1. Beispiele.....	25
4.1.1. Höhere E2F3-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe.....	25
4.1.2. Unveränderte E2F3-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe.....	27
4.1.3 Geringere E2F3-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe.....	32
4.2. Zusammenfassung der Ergebnisse	37
5. Diskussion	38
6. Zusammenfassung	42
7. Literaturverzeichnis	43
8. Abbildungsverzeichnis	50

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

In Deutschland nehmen maligne Neoplasien als Todesursache den zweiten Platz ein, wobei Männer insgesamt häufiger an malignen Neubildungen erkranken als Frauen. Dabei spielen Neubildungen der Verdauungsorgane sowohl bei Männern (37.516 Verstorbene 2010) als auch bei Frauen (31.432 Verstorbene 2010) eine wichtige Rolle (Bundesamt, 2012). Das Lebenszeitrisko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken beträgt ca. 6%, wobei die Häufigkeit einer Erkrankung mit dem Lebensalter zunimmt. Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland mit mehr als 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr das zweithäufigste Malignom überhaupt (Haberland et al., 2010). Trotz intensiver Bemühungen bezüglich der Verbesserung der Therapie (Chemotherapie, Strahlentherapie, operative Therapie, etc.) liegt die Zahl der durch kolorektale Karzinome verursachten Todesfälle in Deutschland bei ca. 30.000 pro Jahr.

1.1.1. Adenom-Karzinom Sequenz

Das kolorektale Karzinom ist im Hinblick auf seine Genetik vergleichsweise gut untersucht. 1974 publizierte Morson eine Arbeit, die die Adenom-Karzinom Sequenz erstmalig postulierte (Morson, 1974). Es folgten weitere Arbeiten, die unter anderem erbrachten, dass vor allem größere (>10mm Durchmesser) Adenome und Adenome mit villösem Anteil entarten (Konishi und Morson, 1982).

1990 folgten Fearon und Vogelstein mit einer ersten genaueren genetischen Analyse der Adenom-Karzinom Sequenz in kolorektalen Karzinomen (Fearon und Vogelstein, 1990). Zusammengefasst geht man heute davon aus, dass sich das Karzinom aus einer gesunden Epithelzelle über einen Polypen in eine noch benigne Vorstufe des Karzinoms, ein Adenom, entwickelt. Die Adenomzellen

akkumulieren weitere genetische Alterationen, die ihnen Wachstumsvorteile gegenüber nichtalterierten Zellen bringen. Sind die Schlüsselmerkmale eines malignen Phänotyps (unkontrolliertes invasives Wachstum, Metastasierung) erreicht, spricht man von einem Karzinom.

Die folgende Abbildung beschreibt schematisch den zeitlichen Ablauf der Veränderungen im Genom einer Epithelzelle, die letztendlich zur Entartung führen. Dieser Prozess zieht sich in der Regel über Jahre hin. Wichtiger als eine bestimmte Abfolge der genetischen Mutationen ist allerdings das gemeinsame Auftreten dieser Veränderungen.

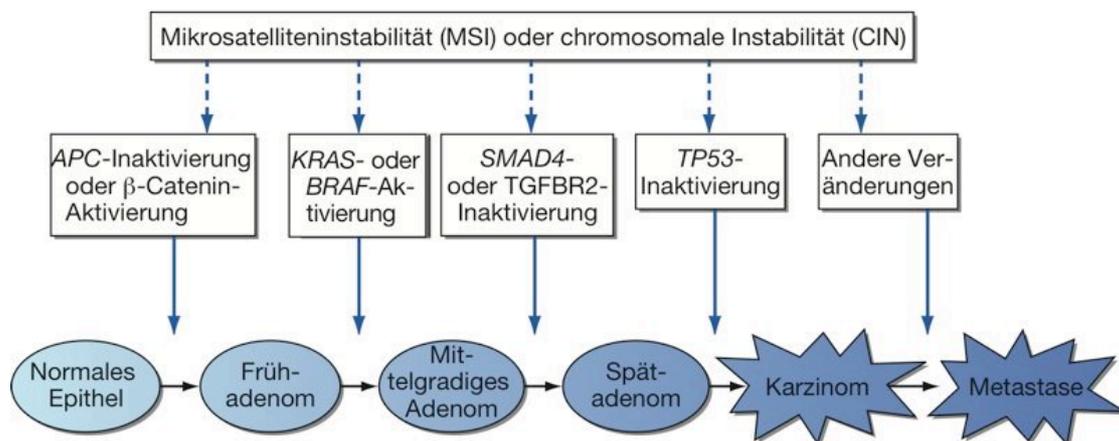


Abbildung 1 - Adenom Karzinom Sequenz aus Harrison 18. Auflage

1.2. Formen der genetischen Instabilität bei kolorektalen Karzinomen

1.2.1. Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Als Mikrosatelliten werden sich tandemartig wiederholende Sequenzen aus bis zu fünf Nukleotiden bezeichnet, die ca. 0,5% des gesamten Genoms ausmachen und im gesamten Genom verstreut vorliegen. Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet die charakteristische

Längendifferenz genetischer Sequenzen in Tumoren gegenüber Normalgewebe, die auf einer Inaktivierung von DNS-Mismatch-Reparatur-Genen (MMR Gene, z.B. MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2) beruht. Diese MMR Gene kodieren Proteine, die die genetische Integrität des Genoms aufrechterhalten. Die Inaktivierung dieser Gene kann ererbt sein oder sporadisch erworben werden und bewirkt eine ausbleibende Reparatur von falsch verbauten Nukleotiden während der Zellteilung. Da Mikrosatelliten im Genom verstreut liegen, kommt es durch das Ausbleiben der Reparatur zur Kumulation von Punktmutationen im gesamten Genom. Diese Mutationen können eine Karzinomentstehung begünstigen. Als Beispiel sei hier das vererbte nicht-polypöse-Kolonkarzinom (HNPCC/Lynch Syndrom) genannt, bei dem dieser Mechanismus das erste Mal nachgewiesen wurde (Aaltonen et al., 1993). Inzwischen geht man davon aus, dass auch bei den sporadischen kolorektalen Karzinomen ein Anteil von bis zu 15% über diesen Mechanismus erworben werden (Melcher, 2008).

1.2.2. Chromosomale Instabilität (CSI)

Die CSI ist in 50 – 65% aller Kolonkarzinome zu beobachten, oft bereits in frühen Tumorstadien (Shih et al., 2001) und bezeichnet strukturelle Veränderungen von Chromosomen durch Prozesse wie Translokationen und Deletionen. Dabei können ganze Chromosomenstücke verloren gehen. Dies kann zu einem Verlust der Heterozygotität führen (LOH - Loss of Heterozygosity). Bei einem LOH kann ein Allel eines Tumorsuppressorgens betroffen sein und inaktiviert werden. Kam es – wie von Knudson postuliert (Knudson, 1971) - davor zu einer Mutation des komplementären Allels, wird das betroffene Tumorsuppressorgen inaktiviert. Ein LOH in einer Tumorzelle kann auf ein in der betroffenen Region liegendes Tumorsuppressorgen hinweisen. Die genaue molekulare Ursache der chromosomalen Instabilität ist bisher nicht vollständig geklärt.

1.2.3. Uniparentale Disomie

Die uniparentale Disomie (UPD) wurde in ihrer hereditären Form das erste Mal 1980 von Engel beschrieben (Engel, 1980) und bezeichnet allgemein den Zustand eines numerisch korrekten Chromosomensatzes, bei dem allerdings beide Homologen eines Chromosoms, komplett oder bruchstückhaft, von einem Elternteil stammen (normalerweise stammt von beiden Elternteilen je ein Chromosom). Dies kann zu einem kompletten oder partiellen Verlust der Heterozygotität für das entsprechende Chromosom führen. Die UPD wurde ursprünglich mit hereditären Krebsyndromen und Entwicklungsstörungen in Zusammenhang gebracht. Erst in jüngerer Zeit wurde auch das Auftreten der UPD in sporadischen Neoplasien, und die einhergehende Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und das Aktivieren von Onkogenen nachgewiesen (Tuna et al., 2009). Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass die UPD häufig (Andersen et al., 2007) sowohl in CSI- als auch in MSI-Karzinomen auftritt. Die UPD kann demnach in der Keimbahn oder in somatischen Zellen entstehen.

1.2.3.1. Entstehungsmechanismen der UPD in der Keimbahn

Die UPD der Keimbahn kann einerseits in der Meiose auftreten und liegt dann konstitutionell vor. Auch eine Entstehung in der ersten Mitose nach Befruchtung ist denkbar, es käme dann zu einer Mosaikform. Die Keimbahn-UPD führt eher zu syndromalen Phänotypen, die zugrunde liegenden Mechanismen wie Trisomy bzw. Monosomy Rescue und Gametenkomplementation sind vergleichsweise gut untersucht. Auf dieser Ebene kann UPD zu verschiedenen Syndromen wie dem Angelmann Syndrom (patUPD15), dem Prader-Willi-Syndrom (matUPD15), dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (patUPD11p15), dem transienten Neugeborenen Diabetes (patUPD6) oder dem Russel-Silver-Syndrom (matUPD7) führen. Zystische Fibrose kann ebenfalls auf dem Boden

einer UPD entstehen (Yamazawa et al., 2010). Hier liegen aufgrund der UPD zwei maternale Kopien des mutierten autosomal rezessiven CFTR Gens vor (Beaudet et al., 1991).

1.2.3.2. Entstehungsmechanismen der UPD in somatischen Zellen

Andererseits kann die UPD auch sporadisch in der mitotischen Teilung somatischer Zellen auftreten und ist dann nur in den Tochterzellen der primär betroffenen Zelle zu finden. Der Entstehungsmechanismus dieser Form der UPD ist noch nicht komplett verstanden und bisher weitaus weniger erforscht. Es gibt mehrere Modelle für die Entstehung einer UPD auf somatischer Ebene in der Mitose einer Zelle.

Segmentale Deletion: Dabei wird durch Replikation des noch vorhandenen homologen Stückes der deletierte Teil ersetzt und rein numerisch gesehen die Integrität des Genoms wiederhergestellt. Funktional gesehen resultiert dieser Vorgang in einem homozygoten Genotyp für das ursprünglich verlorene Stück (Siehe Abb. 2).

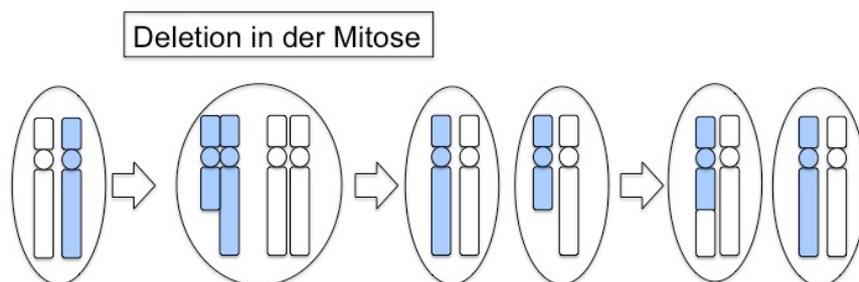


Abbildung 2 - Deletion in der Mitose

Mitotische Rekombination mit Stückaustausch: Dies geschieht vor allem in der G/S2 Phase der Mitose (Stephens et al., 2006). Diese Entstehungsform hat

eine Vielzahl an möglichen Resultaten, so dass auch gesunde Phänotypen bei genetisch ausbalancierten Stückaustauschen möglich sind (siehe Abb. 3).

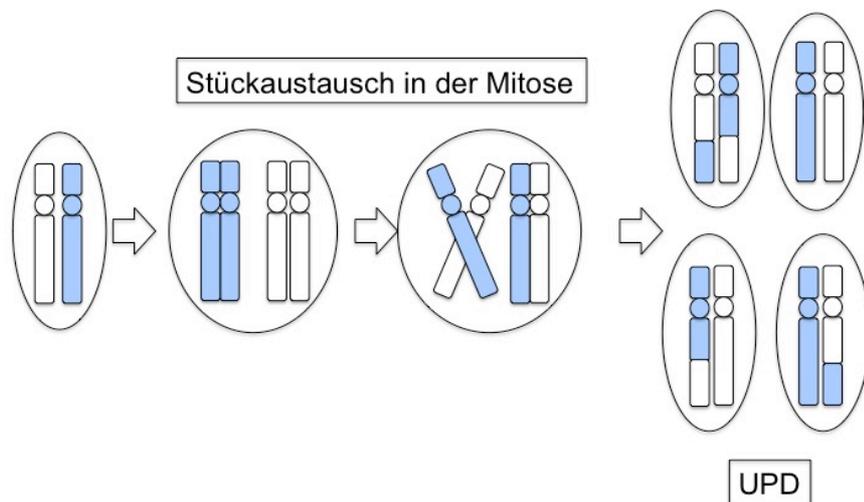


Abbildung 3 - Stückaustausch in der Mitose

Ein Fehler bei der Segregation in der Mitose: Ein Chromosom geht z.B. bei einem Anaphase-Lag verloren, das komplementäre Chromosom wird repliziert. Auch eine Non-Disjunction in der Mitose ist denkbar. Beide Fehler führen zu einem „homozygoten“ Chromosom (siehe Abb. 4).

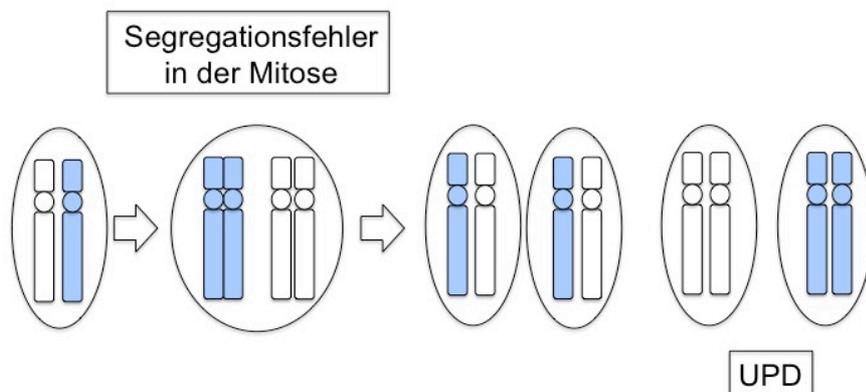


Abbildung 4 - Segregationsfehler in der Mitose

1.2.3.3. Pathogenetische Konsequenzen der UPD

Die UPD kann zu verschiedenen pathogenetischen Konsequenzen für das betroffene Chromosom führen. Dazu gehört die Verdopplung bereits vorbestehender Defekte: Verdopplung einer Deletion oder einer somatischen Mutation sind möglich. Ebenso ist eine Veränderung des epigenetischen Patterns möglich, beispielsweise der Verlust unmethylierter (also aktiver) Gene, oder der Verlust eines methylierten (silenced) Areals.

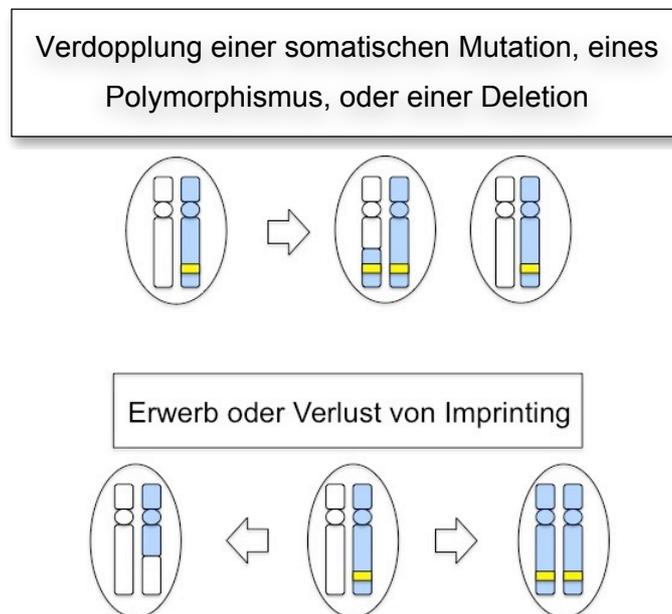


Abbildung 5 - Pathogenetische Konsequenzen der UPD

Durch diese Veränderungen kann die Entstehung eines malignen Phänotypes begünstigt werden: Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung von Onkogenen sind auf diesem Wege möglich. Aber auch der Einfluss auf geprägte Gene kann einen entscheidenden Einfluss auf die Malignomentstehung haben, wenn beispielsweise ein durch Imprinting inaktiviertes Tumorsuppressorgenallel per UPD dupliziert wird (Abb.5 unten rechts), oder das inhibitive Imprinting eines Onkogens durch eine UPD verloren geht (Verlust von Imprinting, siehe Abb.5 unten links).

1.2.3.4. Uniparentale Disomie in kolorektalen Karzinomen

In vorangegangenen Arbeiten konnte die uniparentale Disomie sowohl in chromosomal instabilen als auch bei mikrosatelliteninstabilen kolorektalen Karzinomen nachgewiesen werden, wobei der UPD-Anteil der identifizierten LOH-Regionen in den MSI-Karzinomen mit 94 % deutlich höher war als in CSI-Tumoren (41%) (Zopf et al., 2008). Der UPD wird daher eine wichtige Rolle bei der Entstehung der CSI (wobei hier die Deletion weiterhin im Vordergrund steht), vor allem aber bei der Entstehung von MSI-kolorektalen Karzinomen zugesprochen. Des Weiteren wurde in der gleichen Arbeit eine neue Kandidatenregion für CSI- und MSI-kolorektale Karzinome auf Chromosom 6 im Bereich 6pter -> p22 identifiziert, auf der weitere Tumorkandidatengene vermutet, aber bisher noch nicht identifiziert wurden. In diesem Bereich wiesen 27% der MSI-Tumoren Überschneidungen auf.

1.3. E2F Transcription Factor 3

1.3.1. Die E2F Familie

Ein mögliches Kandidaten-Gen in der 6pter -> p22.2 Region ist das Gen E2F3 (E2 transcription factor 3), welches für das Protein E2F3 codiert und sich auf dem Locus 6p22.3 befindet. Die E2F-Genfamilie gehört zu den Transkriptionsfaktoren und gewährleistet eine normale Zellproliferation und -differenzierung. Der Name E2F (engl.: E2 factor) leitet sich von der Tatsache ab, dass E2F ursprünglich als zelluläre Faktoren identifiziert wurden, die an den E2 Promotor der Adenoviren binden (Kovesdi et al., 1986; Reichel et al., 1987). Bis heute wurden 9 verschiedene Mitglieder der E2F-Familie identifiziert (Attwooll et al., 2004). Diese können, funktional gesehen, in zwei Subklassen aufgeteilt werden: E2F1 - E2F3 werden für die Transaktivierung der Zielgene, die den Übergang von G1 in die S-Phase steuern (Wu et al., 2001), benötigt.

E2F4 - E2F8 besitzen vor allem repressive Funktionen (Muller et al., 1997; Cartwright et al., 1998; Di Stefano et al., 2003).

1.3.2. Regulation

Die E2F-Familie wird über sogenannte Pocketproteine reguliert – zu diesen Proteinen gehören das Retinoblastoma Protein pRB, sowie die Proteine p107 und p130 (Magae et al., 1996). Die Regulation durch diese Pocketproteine geschieht auf zwei Arten: Zum einen binden die Pocketproteine an die Transaktivierungsdomäne von E2F und blockieren deren Funktion. Zusätzlich kann der E2F–Pocketprotein-Komplex Histon-Deacetylasen, Histon-Methyltransferasen und Nukleosom Remodelling Enzyme (z.B. L3MBTL1) rekrutieren, die dann die E2F-Promotoren entsprechend ihrer Funktion modifizieren und somit aktiv deren Transkription inhibieren (Blais und Dynlacht, 2007).

E2F bildet mit Proteinen der DP-Familie (Dimerisation Partner), DP1 (Helin et al., 1993) und DP2 (Zhang und Chellappan, 1995), einen heterodimeren Komplex, bindet dann an die E2F Recognition-Site 5'-TTTC[CG]CGC-3' und nimmt so Einfluss auf die Transkription. Das Retinoblastom Protein pRB bindet ebenfalls an die Domäne der Pocketproteine und inhibiert auf diese Weise E2F3. Wird pRB phosphoryliert, setzt es E2F3 frei, welches nun Einfluss auf seine Zielgene nehmen kann.

1.3.3. E2F3

Der E2F3 Locus kodiert für zwei Proteine, die durch unterschiedliche Promotoren und 5' kodierende Exons (He et al., 2000; Humbert et al., 2000; Leone et al., 2000) gekennzeichnet sind: E2F3a und E2F3b. Diese Proteine sind nukleär lokalisiert und werden ubiquitär exprimiert (MacLeod und Nagel, 2005).



Abbildung 6 - Schematische Darstellung des E2F3-Gens bestehend aus 8 Exons (blau eingefärbt). Die Exons 1a oder 1b werden alternativ benutzt, um die respektive Variante E2F3A oder E2F3B zu produzieren.

Beide Proteine besitzen gleiche Domänen zur DNS Bindung, Pocketproteinbindung und Heterodimerisation, unterscheiden sich aber in ihren N-Termini (E2F3a 132 Aminosäuren, E2F3b 6 Aminosäuren (King et al., 2008)), ihrer Transaktivierung im Expressionspattern sowie in Teilen ihrer Funktion (Attwooll et al., 2004). Gleichzeitig überlappen beide Proteine teilweise in ihren Funktionen (Danielian et al., 2008).

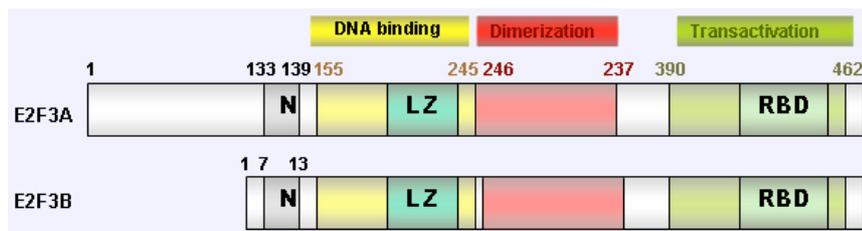


Abbildung 7 – Schematische Darstellung der E2F3 Proteinstruktur. E2F3A oben, E2F3B unten. Sie unterscheiden sich in den N-terminalen Regionen bestehend aus 132 und 6 Aminosäuren,

E2F3a ist verhältnismäßig gut untersucht, wird als Aktivator der Transkription betrachtet und wird vor allem in der S-Phase exprimiert. E2F3b fungiert vermutlich als Transkriptioninhibitor und wird konstitutiv während des Zellzyklus exprimiert (Attwooll et al., 2004; Dimova und Dyson, 2005).

E2F3 reguliert einige Schlüsselgene der Zellproliferation und des Zellzyklus, u.a. B-myb, Cyclin A, cdc2, cdc6 und DHFR (Humbert et al., 2000). Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass E2F3 benötigt wird, um die S-Phase zu induzieren (Leone et al., 1998), außerdem agiert E2F3 als Mediator der durch DNS-Schäden induzierten Apoptose (Martinez et al., 2010) und ist wesentlich für die korrekte kardiale Entwicklung und Funktion (King et al., 2008).

1.3.4. E2F3 als Onkogen

In den letzten Jahren wurden mehr und mehr Belege dafür erarbeitet, dass E2F3 an der Entstehung verschiedenster Tumorentitäten beteiligt ist. Heutzutage gilt es als erwiesen, dass es sich bei E2F3 um ein Onkogen handelt, das regelmäßig in verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert wird (Miles et al., 2012). Es konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass eine Amplifikation und Überexpression von E2F3 mit der Entstehung von Blasenkrebs vergesellschaftet ist (Feber et al., 2004; Oeggerli et al., 2004; Hurst et al., 2008), dabei konnte in 10-20% der Fälle eines Blasenkrebses eine Amplifikation der 6p22.2 Region nachgewiesen werden - die Amplifikation und nachfolgende Überexpression von E2F3 wurde als essentiell für die Tumorentstehung gewertet (Oeggerli et al., 2006).

Weitere Arbeiten belegen die Beteiligung von E2F3 an der Entstehung des Prostatakarzinoms, wobei die Intensität der Expression mit der Aggressivität (Olsson et al., 2007) und letztendlich mit dem klinischen Outcome (Foster et al., 2004) des Prostatakarzinoms korreliert. E2F3 ist außerdem im Wilms Tumor exprimiert. In gesundem Nierengewebe wurde keine E2F3 Expression festgestellt, in Wilms Tumoren hingegen in bis zu 85% der Nuklei eine E2F3 Überexpression nachgewiesen, am häufigsten in high grade Tumoren und Metastasen des Wilms Tumors (Kort et al., 2008). In Lungenkarzinomen wurde ebenfalls eine nukleäre Überexpression von E2F3 beschrieben, wobei 50-70% aller Plattenepithelkarzinome E2F3 überexprimierten und 79% aller Plattenepithelkarzinome betroffen waren. Außerdem konnte eine sehr hohe E2F3 Expression in beinahe allen kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) nachgewiesen werden (Cooper et al., 2006). Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression von E2F3 in Ovarialkarzinomen (Reimer et al., 2011; Smith et al., 2012) sowie malignen Melanomen (Noguchi et al., 2012) nachgewiesen.

2. Zielsetzung

Bei der Analyse auf uniparentale Disomie konnte in MSI-kolorektalen Karzinomen eine neue Tumorgenkandidatenregion (6p22.2) identifiziert werden. Bisher waren in dieser Region noch keine für kolorektale Karzinome relevanten Onkogene bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, die Relevanz des dort (6p22.3) lokalisierten Gens E2F3 für die kolorektale Karzinogenese zu überprüfen. E2F3 befindet sich auf dem Locus 6p22.3 und stellt, gerade in Anbetracht seiner zellregulativen, proliferativen und differenzierenden Funktion sowie seiner bisher ermittelten weitreichenden Beteiligung an anderen Karzinomen wie invasiven Blasenkarzinomen, Wilms Tumoren, Retinoblastomen, Ovarialkarzinomen, malignen Melanomen und Prostatakarzinomen einen vielversprechenden Kandidaten dar. Entsprechend den bisherigen Ergebnissen von bereits veröffentlichten Arbeiten zur Beteiligung von E2F3 an Karzinomen konnte ebenfalls von einer Überexpression von E2F3 im Tumorgewebe im Falle einer Beteiligung ausgegangen werden. Die Expression des Proteins E2F3 in humanen, mikrosatelliteninstabilen kolorektalen Karzinomzellen wurde mit immunhistochemischen Methoden erfasst und mit der Expression in der zugehörigen, autologen Normalschleimhaut verglichen.

3. Material und Methoden

3.1. Material und Geräte

- SuperFrost® Plus Objektträger, Art.-Nr.: 03-0060, R. Langenbrinck, Labor und Medizintechnik
- Delta Select, Aqua, Spüllösung / Irrigation Solution
- Ethanol absolut puriss. p.A., Art.-Nr.: 32205, Sigma-Aldrich
- Bovine Serum Albumin (BSA), Art.-Nr.: sc-2323, Santa Cruz Biotechnology
- Methanol, Art.-Nr.: 32213, Sigma-Aldrich
- Roticlear für die Histologie, Art.-Nr. A538.5, Roth
- Roti-Mount für die Mikroskopie, Art. HP68.1, Roth
- Target Retrieval Solution, Ready-to-use, Art.-Nr.; REF S1700, Dako
- Wasserstoffperoxid 30% zur Analyse, Art.-Nr. 107209 MERCK
- Power Block™, Universal Blocking Reagent (x10), Art.-Nr.: REF HK085-5KE, BioGenex
- Diluent (for Streptavidin Peroxidase), Art.-Nr.: REF HK157-5K, BioGenex
- Rabbit polyclonal to E2F3, IgG, Art.-Nr.: ab50917, Abcam
- Supersensitive™ Link-Label IHC Detection System (RTU MultiLink HRP), Art.-Nr.: REF QP900-9L, Biogenex
- 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), Serva Electrophoresis
- Mayers Hämalaunlösung (enthält Ethandiol), MERCK
- Research Pipetten (0,5-10µl, 200µl, 1000µl), Eppendorf
- Research Multipette® Plus, Eppendorf
- Combitips plus 5ml, Eppendorf
- Pipetboy acu, Integra Bioscience
- Costar Stripette 5ml, Corning Incorporated
- Laborlux S Mikroskop, Leitz
- BZ – 9000 HS-All in one Fluorescence Microscope, Keyence
- Abzug
- Eppendorf

- Feinwaage
- Feuchtkammer
- Filterpapier
- Gefrierschrank
- Glasküvetten
- Heizplatte
- Küvetten (Glas)
- Küvetten (Plastik)
- Kühlschrank
- Mikrotom
- Objektträger-Ständer (Glas)
- Objektträger-Ständer (Plastik)
- Ofen
- pH-Meter
- Pinzetten
- Pipettenspitzen
- Schüttler
- Trichter
- Wasserbad

3.2. Gewebeproben

In dieser Arbeit wurden Gewebeproben von 19 humanen Kolonkarzinomen untersucht, wobei immer eine Normal-Block-Fraktion mit einer korrespondierenden Tumor-Block-Fraktion verglichen wurde. Es wurden zwei separate Durchläufe pro Tumor und Positivkontrolle durchgeführt.

Path.-Nr.	Normal-Block (#Fraktion)	Tumor-Block (#Fraktion)	Geschlecht	Geburtsdatum
4591/01	2	3	F	03.04.1919
6015/01	1onk	3	F	15.04.1915
4732/03	1	3	M	13.11.1963
14400/03	3B	3C	M	1.03.1959
H7277/04	Norm und TU auf einem Block		F	17.02.1960
13929/04	2	4	M	01.04.1979
26839/04	4	5	F	12.08.1944
24386/06	2	7	M	13.05.1924
26317/06	1	3	M	14.03.1984
1632/07	2	6	M	22.07.1941
2974/07	2	X	M	26.10.1931
11499/07	2	3	F	14.06.1957
23752/07	2	3	F	09.06.1929
29287/07	2A	1D	M	30.09.1967
H10623/08	Norm und TU auf einem Block		M	03.09.1953
22202/08	2B	2C	M	06.05.1945
4215/01	Norm und TU auf einem Block		n/a	n/a
22911 /03 /04	Norm und TU auf einem Block		n/a	n/a
30808/01	Norm und TU auf einem Block		n/a	n/a

Tabelle 1 - Übersicht der Gewebeproben

3.2.1. Eigenschaften und Pathologie

Path.-Nr.	Staging	Grading	Positive MSI Marker(5/5) n. Boland CR et al.
4591/01	4	3	4/5
6015/01	3	2	2/5
4732/03	1	2	4/5
14400/03	2	2	5/5
H7277/04	n/a	n/a	3/5 bzw. 4/5
13929/04	4	3	2/5
26839/04	3	2	3/5
24386/06	4	3	5/5
26317/06	3	2	2/5
1632/07	3	3	5/5
2974/07	2	3	4/5
11499/07	3	3	4/5
23752/07	3	3	4/5
29287/07	3	3	5/5
H10623/08	n/a	n/a	2/5
22202/08	3	2	2/5
4215/01	n/a	n/a	n/a
22911/03 /04	n/a	n/a	n/a
30808/01	n/a	n/a	n/a

Tabelle 2 - Eigenschaften der Gewebeproben

3.3. Methoden

3.3.1. Herstellung der Dünnschnitte

Die Tumorblöcke werden in ein Mikrotom eingespannt, wobei die Schnittdicke auf 3 µm eingestellt wird. Die so hergestellten Dünnschnitte werden auf Objektträgern platziert, die silanisiert sind. Dann werde die Schnitte mit frischem und filtriertem Streckwasser beträufelt. Streckwasser besteht aus:

- 40 ml Aqua dest. (A.d.)
- 10 ml Aceton
- 500 µl Hühnereiweiß

Anschließend werden die Objektträger für fünf Sekunden auf eine 39°C warme Wärmeplatte gestellt, um Restflüssigkeit abtropfen zu lassen. Die Schnitte werden dann zum Festtrocknen an den Wärmeplattenrand gestellt. Nach dem Antrocknen werden die Schnitte für drei Tage bei 37°C in einem Wärmeschrank weitergetrocknet.

3.3.2. Entparaffinieren

Zu Beginn werden die Dünnschnitte für 30 Minuten bei 55°C in einem Wärmeofen erhitzt. Um eine Rehydrierung zu erreichen, werden die Schnitte direkt im Anschluss einer absteigenden Alkoholkette ausgesetzt, beginnend mit Xylol. Diese Reihe ist wie folgt aufgebaut:

- | | |
|---------------------|------------|
| - 3 x Xylol | 10 Minuten |
| - 2 x 100 % Ethanol | 5 Minuten |
| - 2 x 90 % Ethanol | 5 Minuten |
| - 2 x 70 % Ethanol | 5 Minuten |

3.3.3. Vorbehandlung

Nach den oben aufgeführten Schritten werden die Schnitte für 30 Minuten in einem Gemisch aus Methanol (200ml) und 30% Wasserstoffperoxid (5ml) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Schnitte erst in destilliertes Wasser und dann in Ready-to-use-Buffer umgesetzt. Nun werden die Schnitte in einem auf 90°C vorgeheizten Wasserbad für 30 Minuten inkubiert. Die Küvette wird nach Ablauf der Zeit aus dem Wasserbad genommen und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es ist wichtig, bei jedem dieser Schritte auf eine vollständige Bedeckung der Schnitte zu achten, um ein Austrocknen zu verhindern.

3.3.4. Proteinblock

Die Objektträger werden jetzt in ein - am Versuchstag frisch angesetztes - PBS/BSA (phosphate buffered saline / bovine serum albumine) Gemisch gesetzt. Für einen 1 Liter werden benötigt:

- Natriumchlorid (NaCl)		7,2 g
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄)		1,48 g
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ HPO ₄)		0,43 g
- Aqua dest.	ad	1 l
- pH auf 7,4 einstellen		
- BSA		1 g

Die Objektträger verbleiben insgesamt 10 Minuten in dem Gemisch und werden in dieser Zeit auf den Schüttler gestellt. Nach 5 Minuten werden sie in frisches PBS/BSA Gemisch umgesetzt. Die Dünnschnitte werden dann abgetrocknet. Hierzu lässt man zunächst das PBS/BSA-Gemisch vom Objektträger abtropfen und trocknet dann mittels Präzisionswischtüchern die Objektträger. Wichtig ist dabei, die auf dem Objektträger enthaltene Probe auszusparen. Anschließend wird dann pro Schnitt 100 µl einer Proteinblock-Lösung aufgetragen (10x Proteinblock (Biogenex Power Block), 1:10 verdünnt mit Aqua dest.). Die

Schnitte werden dann in eine Feuchtkammer gesetzt, die Inkubationszeit beträgt 7 Minuten bei Raumtemperatur. Den Proteinblock dann abtropfen lassen.

3.3.5. Primärantikörper

Anschließend werden die Dünnschnitte wieder in 2 Durchgängen jeweils eine Minute lang in PBS/BSA - Lösung gespült. Danach werden die Objektträger wie in 3.3.4 geschildert mit Präzisionswischtüchern getrocknet. Die Primärantikörper (Abcam Rabbit Polyclonal to E2F3) werden im Verhältnis 1:200 mittels Diluent (BioGenex, Diluent for Streptavidin-Peroxidase) verdünnt. Pro Dünnschnitt werden 100µl der verdünnten Antikörper aufgetragen. Auf die Negativkontrollen werden jeweils 100µl Diluent (ohne Primärantikörper) aufgetragen. Danach werden die Dünnschnitte in eine Feuchtkammer gesetzt. Die Inkubation von mindestens 12 Stunden findet bei 4°C statt.

3.3.6. Sekundärantikörper

Nach 12 Stunden Inkubationszeit wird zunächst die Lösung mit dem Primärantikörper vorsichtig, unter Zuhilfenahme einer Pipette mit neu angesetzter PBS/BSA-Lösung, von den Objektträgern abgespült. Anschließend werden diese zweimal für 5 Minuten in PBS/BSA auf dem Schüttler gewaschen. Die Objektträger werden dann wieder vorsichtig getrocknet. Hierzu lässt man zunächst das PBS/BSA-Gemisch abtropfen und trocknet mit Wischtüchern die Objektträger mit Ausnahme der Schnitte. Die Gewebeproben werden dann mit einigen Tropfen MultiLink (biotinylierte Anti-Immunglobuline, Biogenex) bedeckt und inkubieren für 20 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Danach werden die Schnitte vorsichtig mit Hilfe einer Pipette mit PBS/BSA abgespült. Wieder werden die Objektträger mit Ausnahme der Gewebeprobe mit Präzisionswischtüchern getrocknet. Nun werden die Gewebeproben mit dem Peroxidase-Label (Streptavidin-Peroxidase, Biogenex) bedeckt. Die

Schnitte inkubieren danach erneut 20 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Danach werden die Schnitte wieder per Pipette mit PBS/BSA gründlich abgespült und erneut für zweimal 5 Minuten in PBS/BSA auf dem Schüttler gewaschen.

3.3.7. Entwicklung und Färbung

Die Objektträger werden nun in destilliertes Wasser überführt.

Für die Farbentwicklung wird folgende Lösung verwendet:

- 230 ml 50mM Tris-Puffer pH 7,6
- 35 µl 30% H₂O₂
- 40 mg DAB gelöst in 1 ml H₂O

Die einzelnen Bestandteile werden vermischt und gefiltert, um unlösliche Partikel (DAB) zu entfernen. Die Objektträger werden für ca. 30 Sekunden in die Entwicklungslösung gegeben und dann wieder in destilliertes Wasser überführt. Ob die Entwicklungszeit ausreichend war, wird unter dem Mikroskop überprüft. Falls nötig werden die Objektträger erneut in die Entwicklungslösung gegeben, bis die Färbung ausreichend ist. Als Maß dient die Positivkontrolle der Normalmukosa. In der vorliegenden Arbeit wurde eine ausreichende Färbung in der Regel nach 40 bis 60 Sekunden erreicht.

Diesem Entwicklungsschritt folgt die Zellfärbung. Hierfür dient eine Häkalaunlösung (Häkalaun 1:2 in H₂O). Diese wird vor der Färbung ebenfalls filtriert. Die Objektträger werden für ca. 3 Sekunden in die Häkalaunlösung gegeben, und danach zum Stoppen der Häkalaunfärbung direkt in destilliertes Wasser überführt. Zum Nachbläuen der Gewebeschnitte werden diese dann in eine Küvette gegeben und diese für 7 Minuten unter schwach laufendes warmes Leitungswasser gestellt. Dann werden sie wieder in destilliertes Wasser gegeben.

3.3.8. Aufsteigende Alkoholreihe

Nach der Entwicklung und Färbung werden die Gewebeschnitte dehydriert. Hierfür durchlaufen sie eine aufsteigende Alkoholreihe:

- | | |
|--------------------|-----------|
| - 2 x 50% Ethanol | 5 Minuten |
| - 3 x 70% Ethanol | 5 Minuten |
| - 2 x 80% Ethanol | 5 Minuten |
| - 3 x 96% Ethanol | 5 Minuten |
| - 2 x 100% Ethanol | 5 Minuten |
| - 3 x Xylol | 5 Minuten |

3.3.9. Eindecken in Entellan

Nach den Inkubationsschritten in Xylol werden die Objektträger vorsichtig mit Kompressen getrocknet. Auf die Gewebeschnitte wird dann mit einem Glasstab ein Tropfen Entellan gegeben. Darauf wird ein Deckglas gelegt.

4. Ergebnisse, Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen wurden parallel an mehreren Gewebsschnitten gleichzeitig vorgenommen. Dabei wurden alle Gewebeproben identisch behandelt. In jedem Durchgang wurde eine Normalmukosa mitbehandelt. Diese sogenannte Negativkontrolle wurde allerdings nicht mit Primärantikörper, sondern mit reinem Diluent für mind. 12 Stunden inkubiert. Parallel zu jeder Tumorgewebeprobe wurde die korrespondierende autologe Normalschleimhaut mitgefärbt, um einen Vergleich zwischen der Intensität der Anfärbung des Tumorgewebes und der Normalschleimhaut ziehen zu können. Im folgenden Bild (Abb. 8) ist eine

Normalschleimhaut zu sehen, die nicht mit Primärantikörper behandelt wurde (Negativkontrolle). Bei einwandfreiem Arbeitsablauf ist im Allgemeinen nur die Hämalaunfärbung zu sehen.

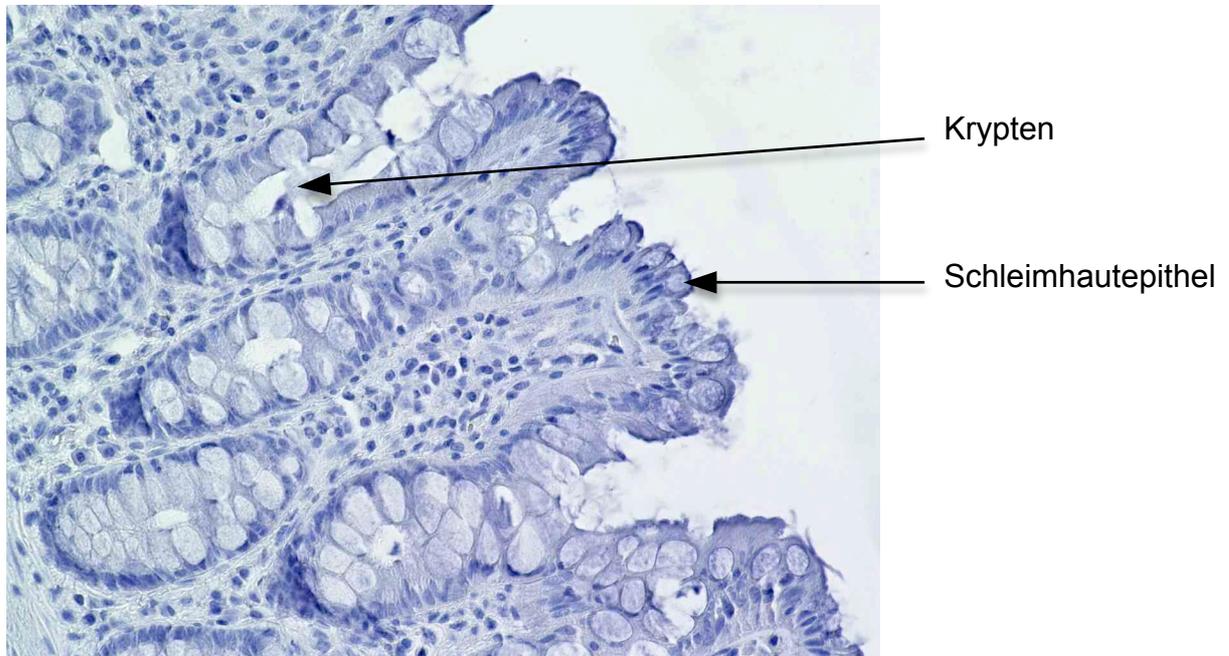


Abbildung 8 - Normalmukosa ohne Primärantikörper (Negativkontrolle)

In den folgenden Bildern (Abb. 9 und Abb. 10) sind nun zwei mit Primärantikörper behandelte Normalmukosen zu sehen. Man beachte die Braunfärbung des epithelialen Zytoplasmas sowie die bräunliche Färbung einiger Zellkerne.

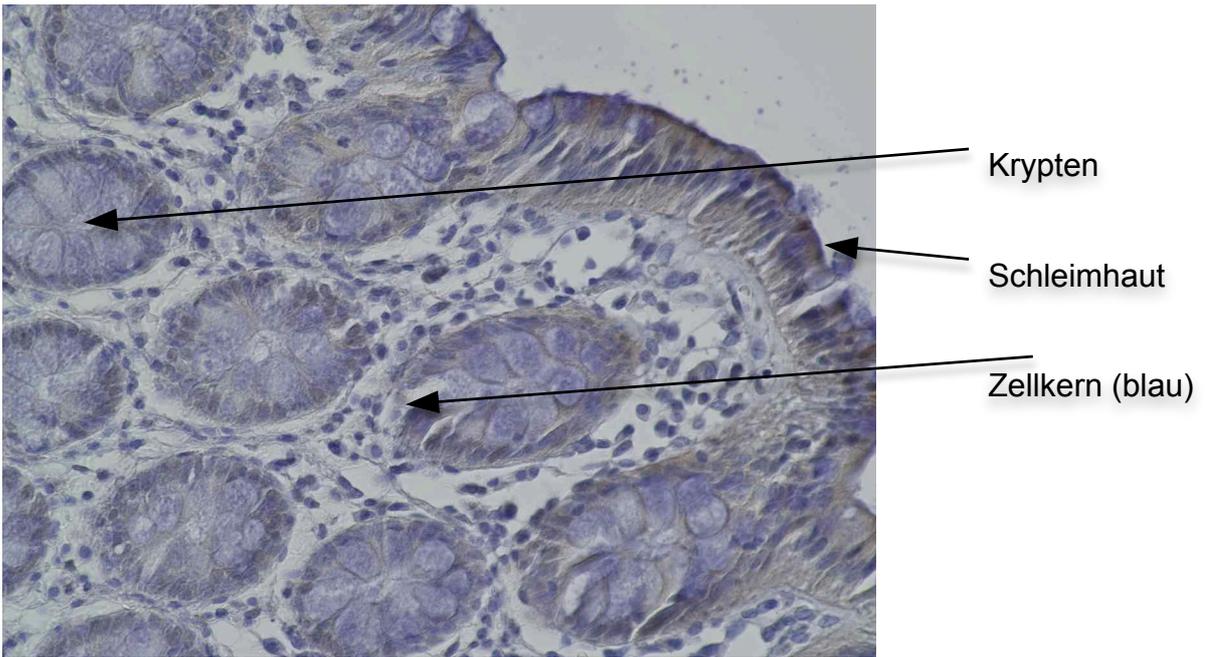


Abbildung 9 - Normalmukosa, inkubiert mit Primärantikörper (Positivkontrolle)

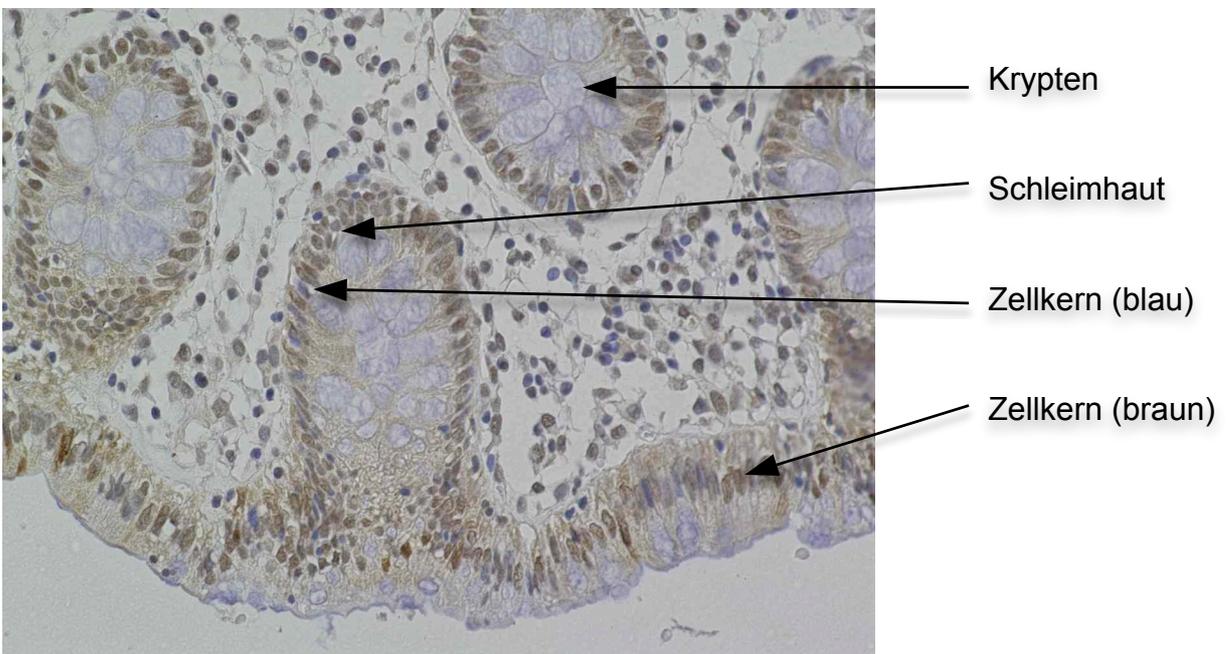


Abbildung 10 - Normalmukosa inkubiert mit Primärantikörper (Positivkontrolle)

Nach dem Färben wurde die Intensität der Färbung des Tumorgewebes mit der komplementären Normalschleimhaut verglichen. Als „gleich“ wurde eine

gleichstarke Intensität von Positivkontrolle und zugehörigem Tumorgewebe gewertet (E2F3 wird exprimiert). „Schwächer“ wurde für eine ausbleibende, oder für eine zwar noch erkennbare, aber deutlich schwächere Anfärbung des Tumorzytosplasmas im Vergleich zur komplementären Positivkontrolle vergeben. Dies weist auf eine erniedrigte, aber noch vorhandene Expression von E2F3 hin. Als „stärker“ wurden solche Proben bezeichnet, bei denen sich das Zytoplasma der Tumorzellen im Vergleich zur zugehörigen Positivkontrolle der komplementären Normalmukosa intensiver färbte - hier ist dementsprechend von einer erhöhten E2F3 Expression im Vergleich zur Normalschleimhaut auszugehen.

Die Ergebnisse der Auswertung sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

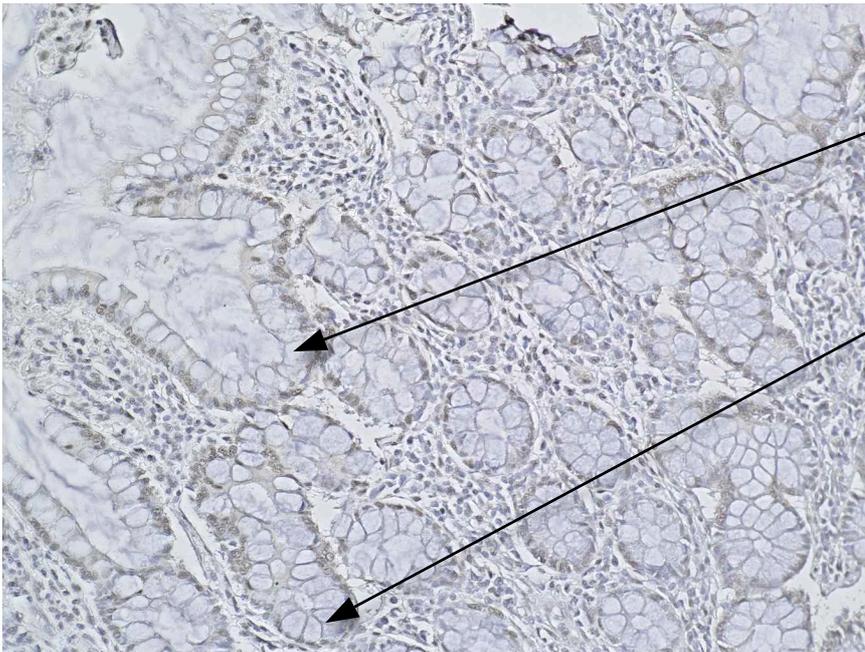
Path.-Nr.	Intensität der Färbung
1632/07	Gleich
2974/07	Schwächer
4215/01	Schwächer
4591/01	Schwächer
4732/03	Schwächer
6015/01	Gleich
14499/07	Gleich
13929/04	Gleich
14400/03	Gleich
22202/08	Gleich
22911/03	Stärker
23725/07	Schwächer
24386/06	Gleich
26317/06	Schwächer
26839/04	Schwächer
29287/07	Gleich
30808-01	Gleich
H7277/04	Gleich
H10623/08	Gleich

4.1. Beispiele

4.1.1. Höhere E2F3-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe

Probe 22911/03

Normalmukosa x20

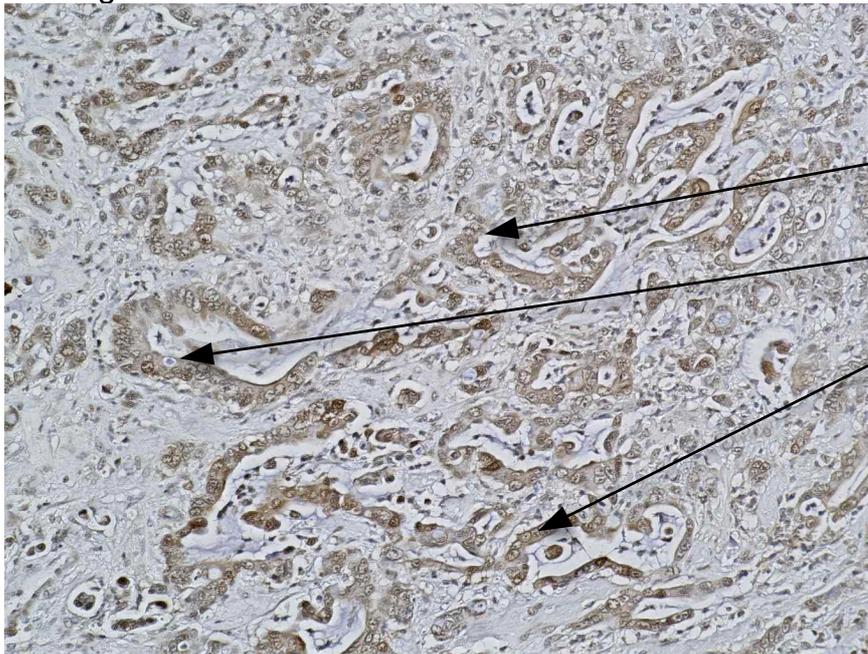


Krypten

Schleimhaut

Abbildung 11 - 22911/03 Normalmukosa, gefärbt (x20)

Tumorgewebe x20



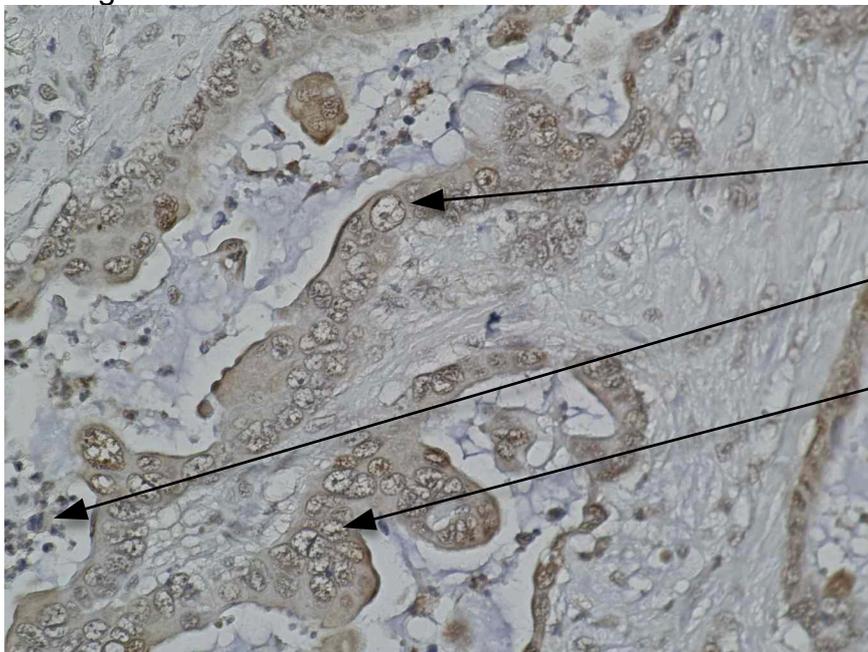
Tumorzellen

Zellkern (blau)

Zellkern (braun)

Abbildung 12 - 22911/03 Tumorgewebe, gefärbt (x20)

Tumorgewebe x40



Tumorzellen

Zellkern (blau)

Zellkern (braun)

Abbildung 13 - 22911/03 Tumorgewebe, gefärbt (x40)

4.1.2. Unveränderte E2F3-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe

Probe 1632-07

Normalmukosa (x20)

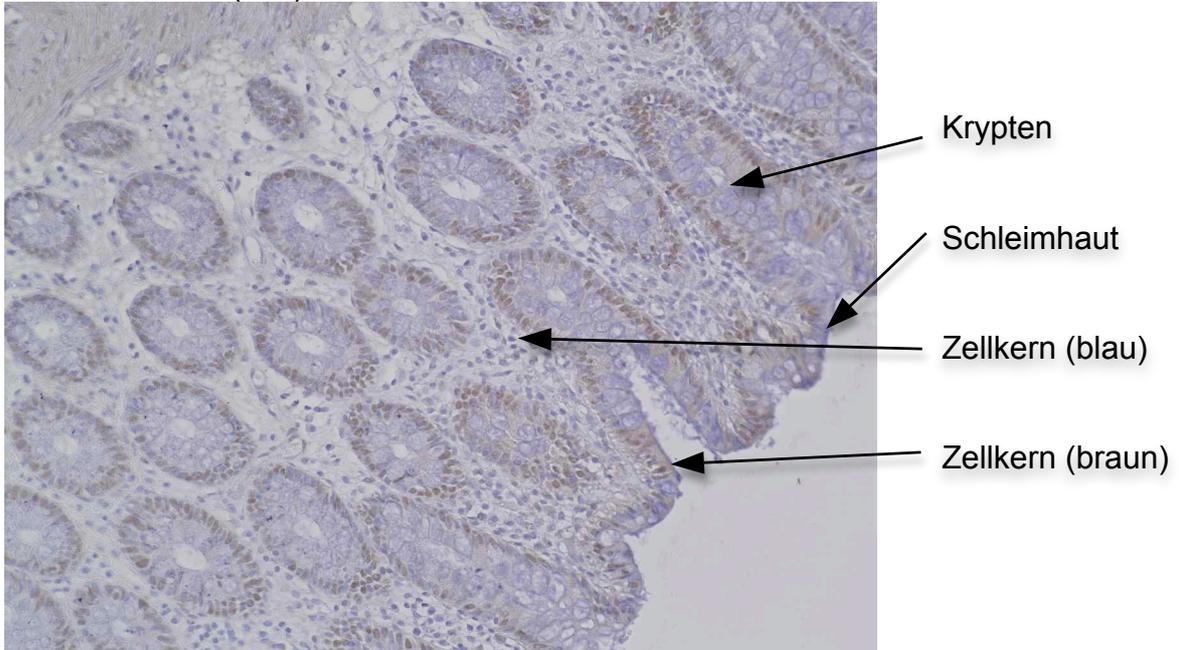


Abbildung 14 - 1632/07 Normalmukosa, gefärbt (x20)

Tumorgewebe (x20)

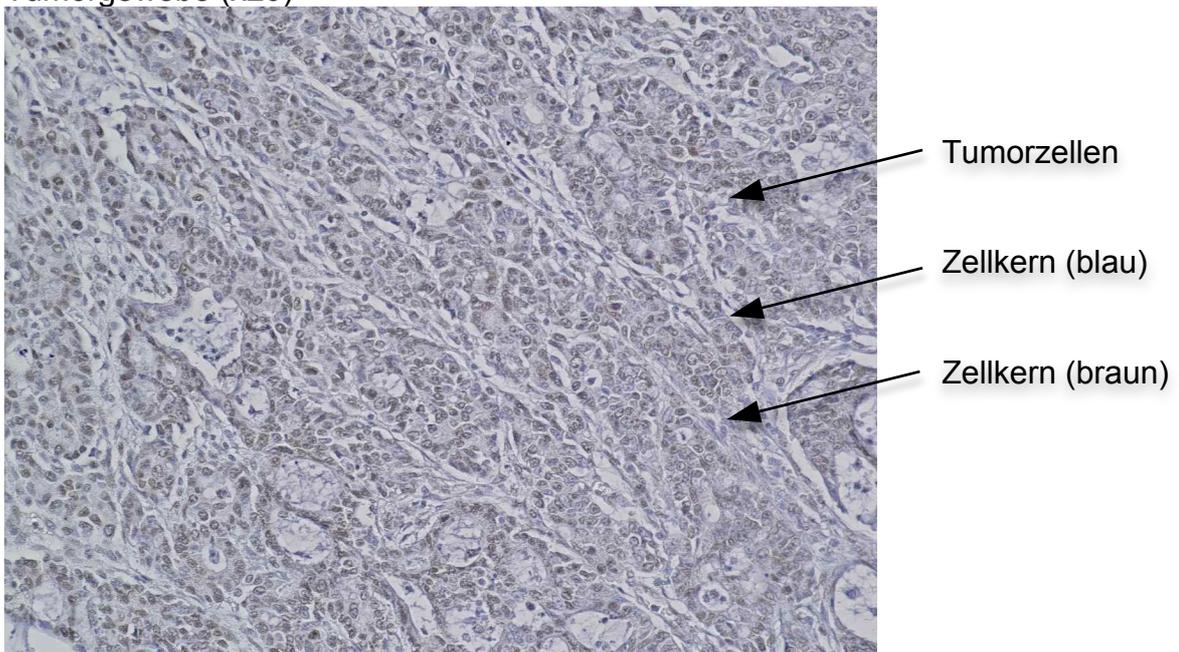
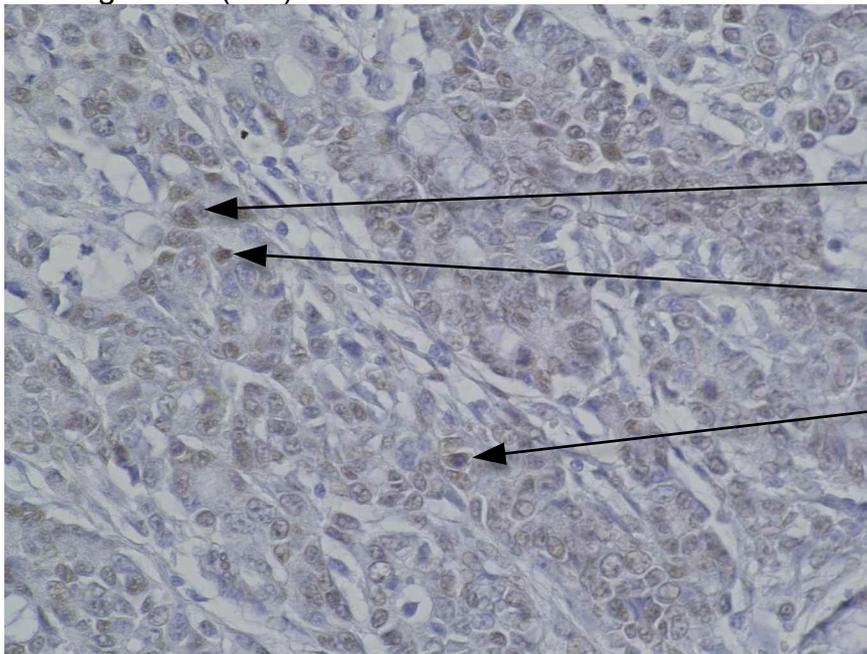


Abbildung 15 - 1632/07 Tumorgewebe, gefärbt (x20)

Tumorgewebe (x40)



Tumorzellen

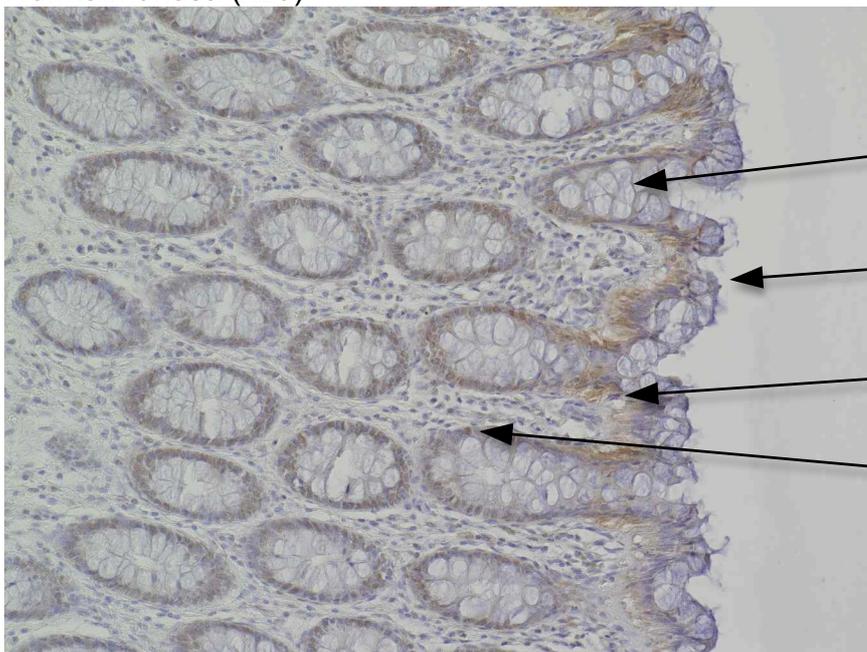
Zellkern (blau)

Zellkern (braun)

Abbildung 16 - 1632/07 Tumorgewebe, gefärbt (x40)

Probe 6015/01

Normalmukosa (x20)



Krypten

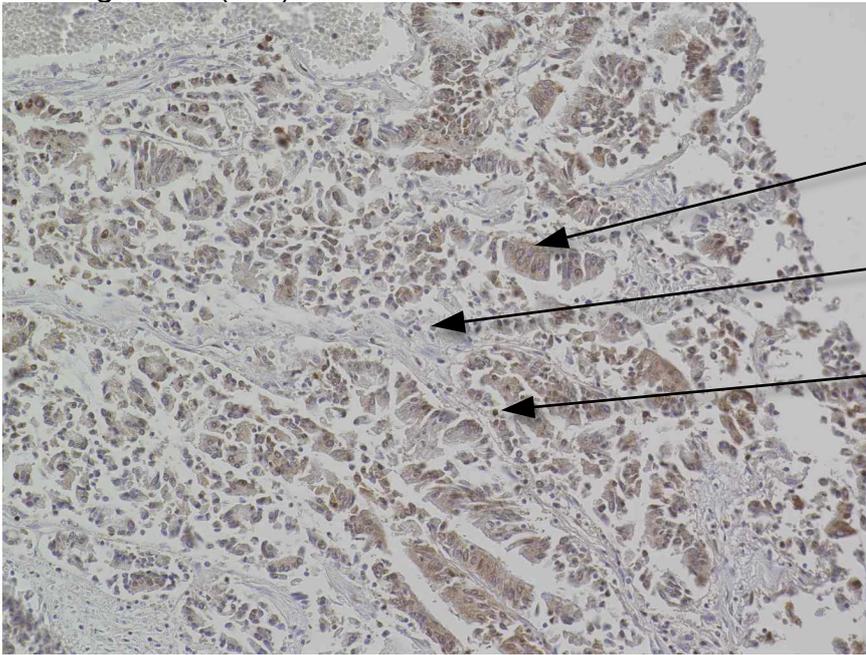
Schleimhaut

Zellkern (blau)

Zellkern (braun)

Abbildung 17 - 6015/01 Normalmukosa, gefärbt (x20)

Tumorgewebe (x20)



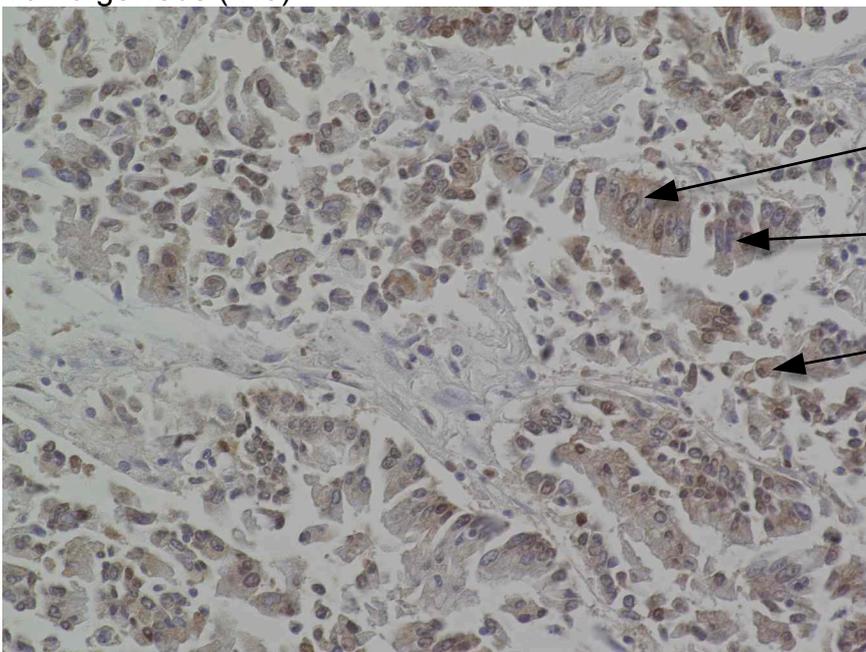
Tumorzellen

Zellkern (blau)

Zellkern (braun)

Abbildung 18 - 6015/01 Tumorgewebe, gefärbt (x20)

Tumorgewebe (x40)



Tumorzellen

Zellkern (blau)

Zellkern (braun)

Abbildung 19 - 6015/01 Tumorgewebe, gefärbt (x40)

Probe 13929/04

Normalmukosa (x20)

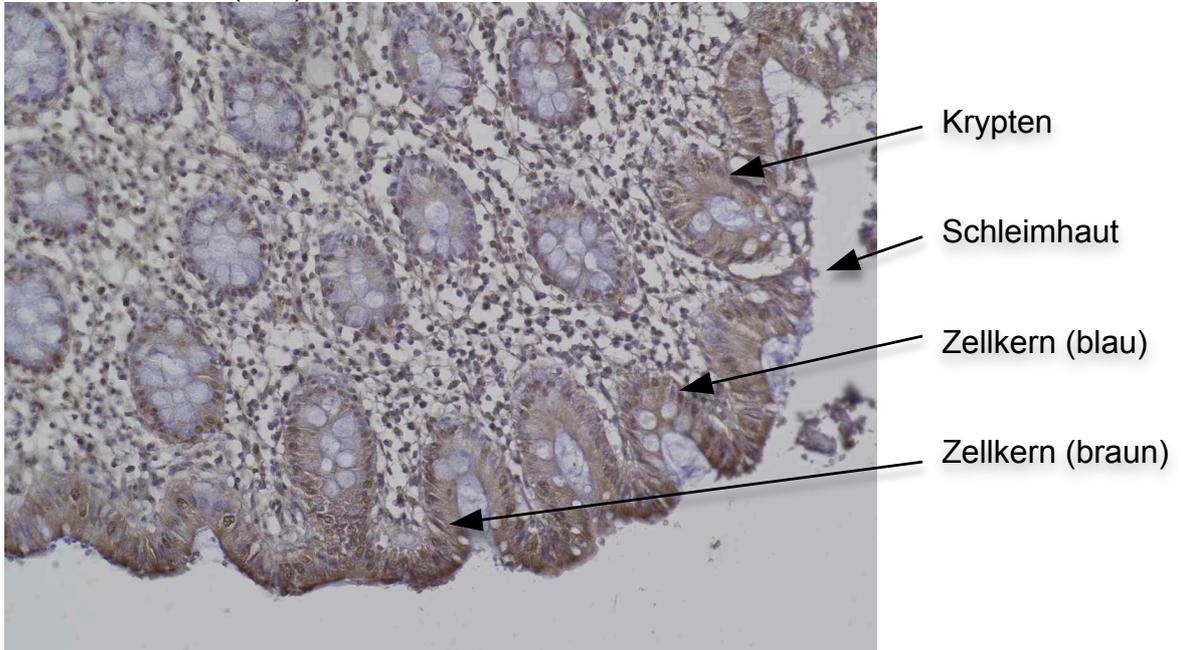


Abbildung 20 - 13929/04 Normalmukosa, gefärbt (x20)

Tumorgewebe (x20)

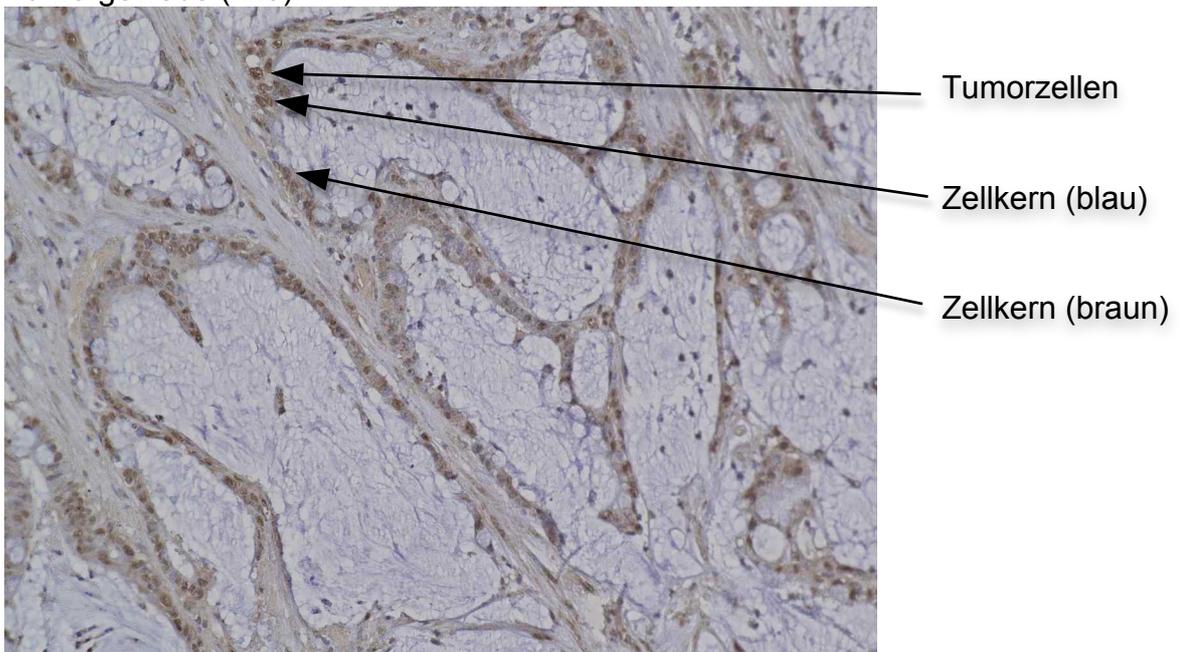
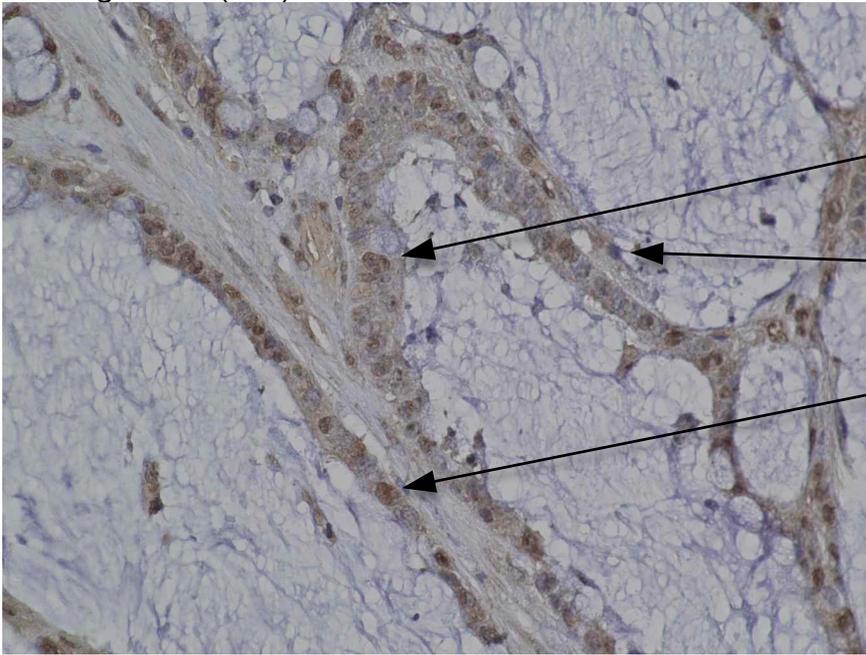


Abbildung 21 - 13929/04 Tumorgewebe, gefärbt (x20)

Tumorgewebe (x40)



Tumorzellen

Zellkern (blau)

Zellkern (braun)

Abbildung 22 - 13929/04 Tumorgewebe, gefärbt (x40)

4.1.3. Geringere E2F3-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe

Probe 2974/07

Normalmukosa (x20)

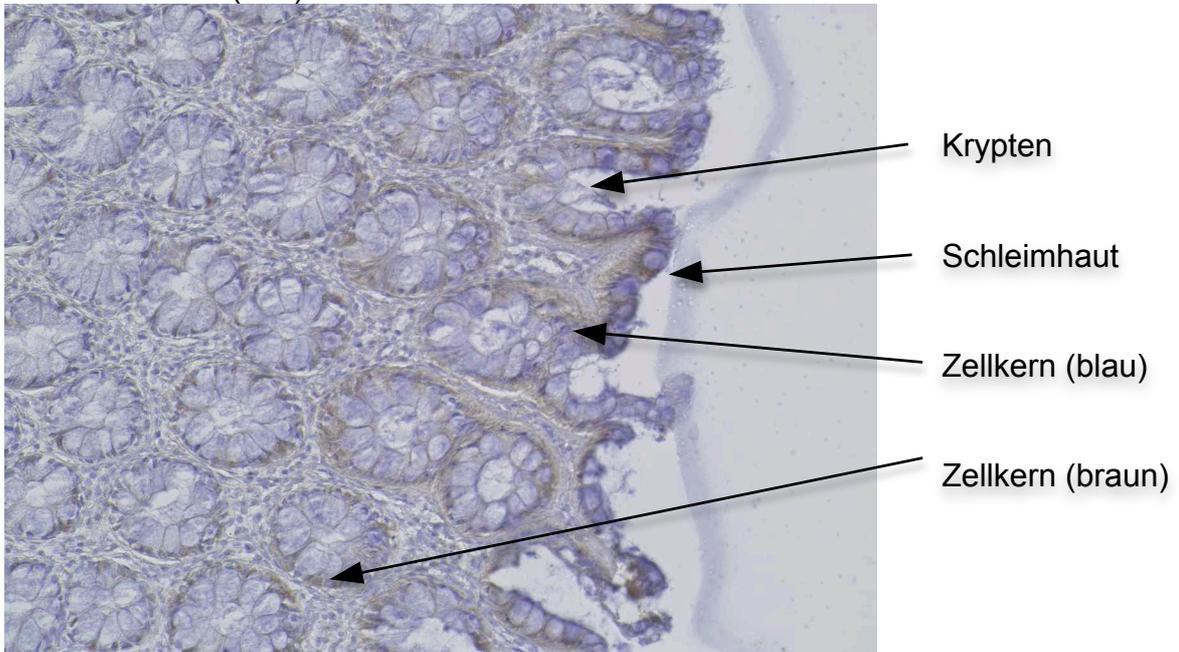


Abbildung 23 - 2974/07 Normalmukosa gefärbt (x20)

Tumorgewebe (x20)

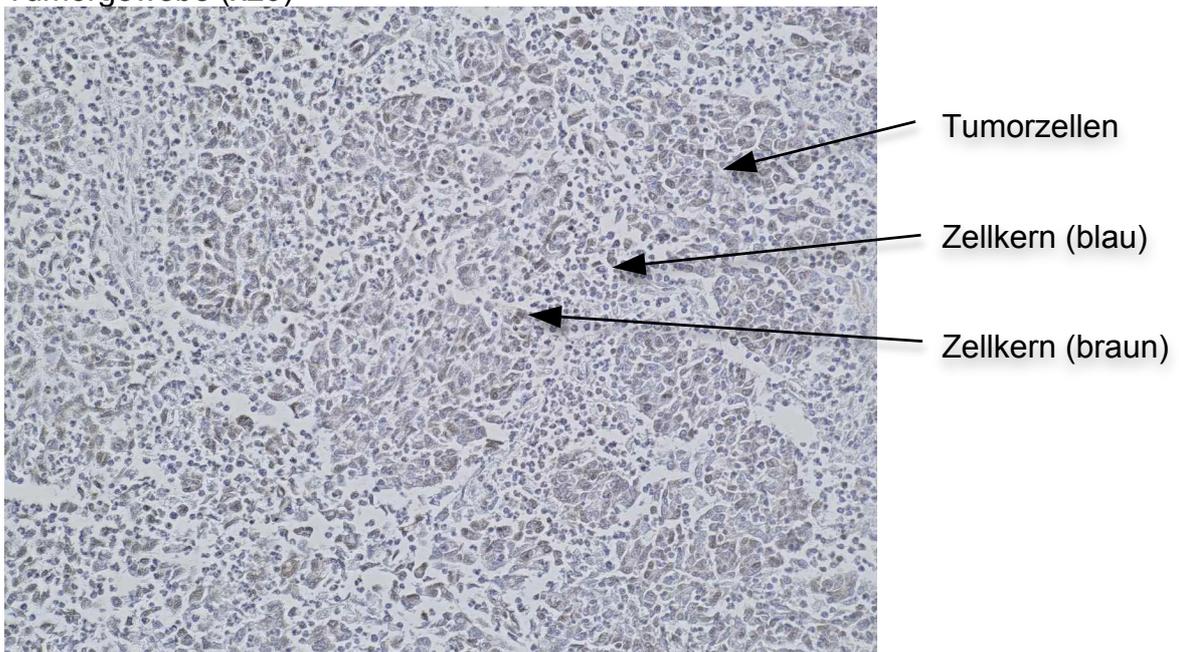
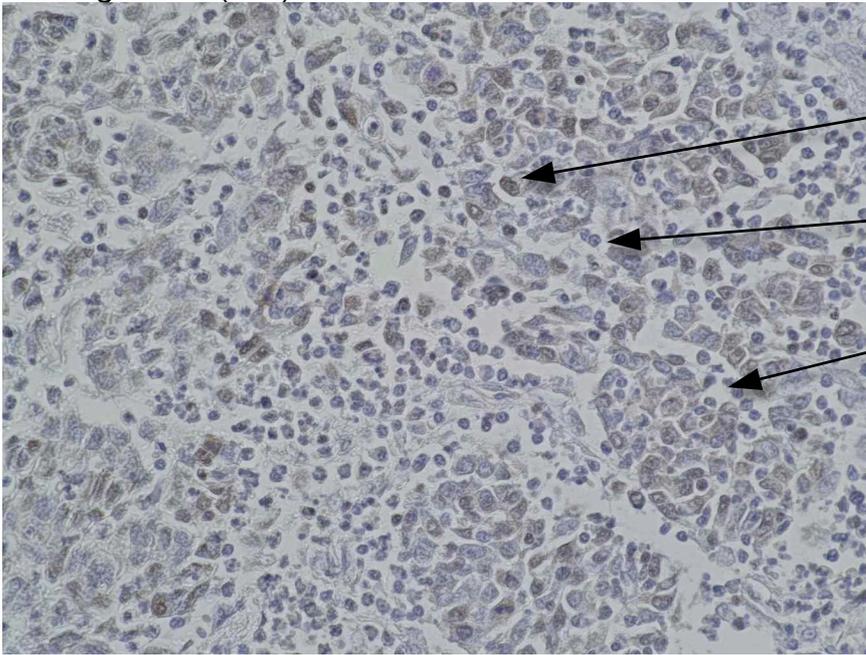


Abbildung 24 - 2974/07 Tumorgewebe, gefärbt (x20)

Tumorgewebe (x40)



Tumorzellen

Zellkern (blau)

Zellkern (braun)

Abbildung 25 - 2974/07 Tumorgewebe, gefärbt (x20)

Probe 4215/01

Normalmukosa (x20)



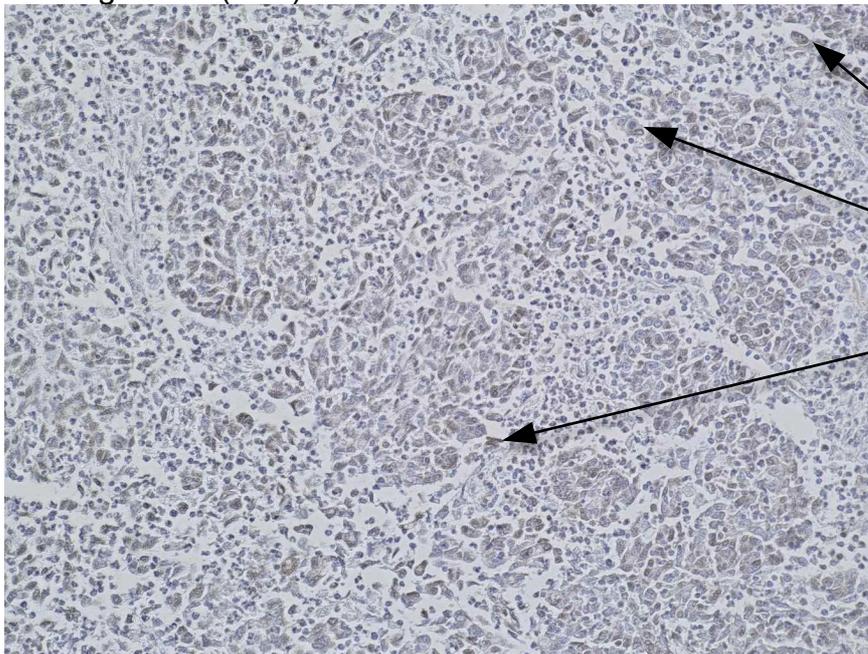
Krypten

Schleimhaut

Zellkern (braun)

Abbildung 26 - 4215/01 Normalmukosa, gefärbt (x20)

Tumorgewebe (x20)



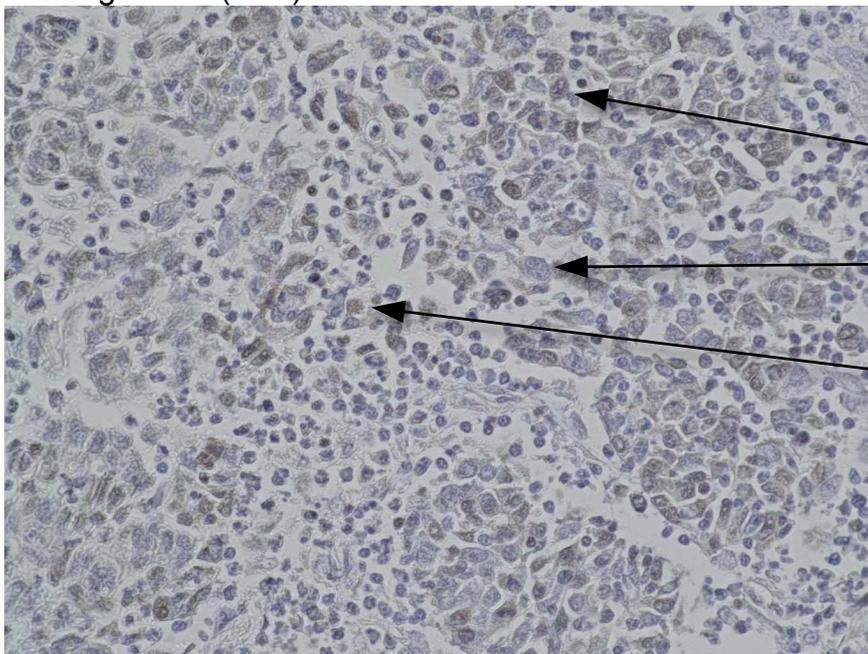
Tumorzellen

Zellkern (blau)

Zellkern (braun)

Abbildung 27 - 4215/01 Tumorgewebe, gefärbt (x20)

Tumorgewebe (x40)



Tumorzellen

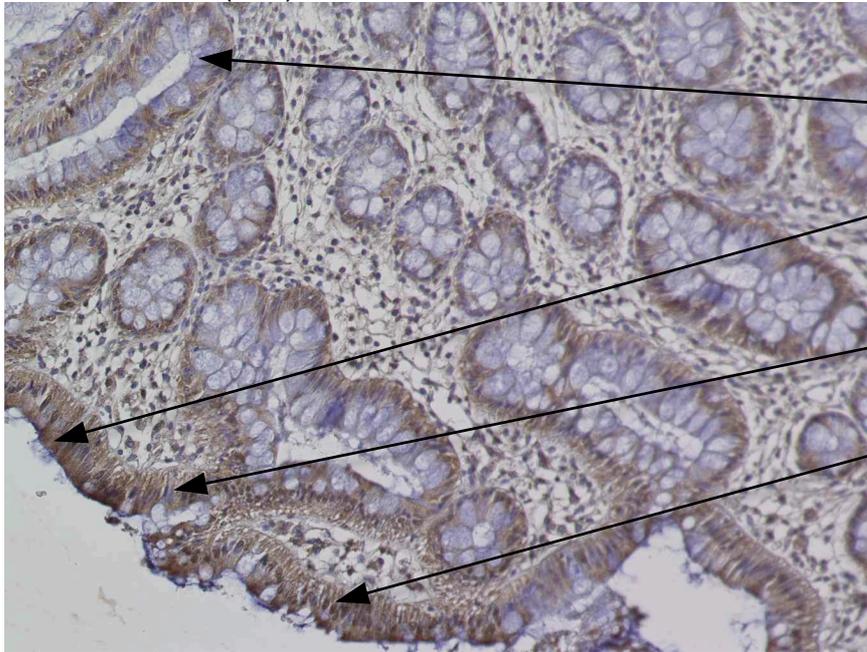
Zellkern (blau)

Zellkern (braun)

Abbildung 28 - 4215/01 Tumorgewebe, gefärbt (x40)

Probe 26839/04

Normalmukosa(x20)



Krypten

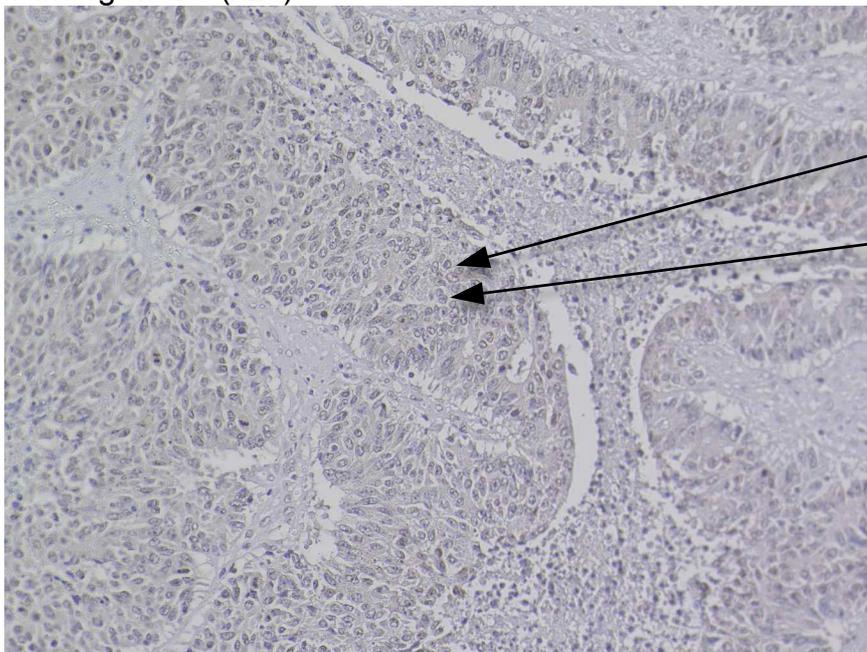
Schleimhaut

Zellkern (blau)

Zellkern (braun)

Abbildung 29 - 26389/04 Normalmukosa, gefärbt (x20)

Tumorgewebe (x20)

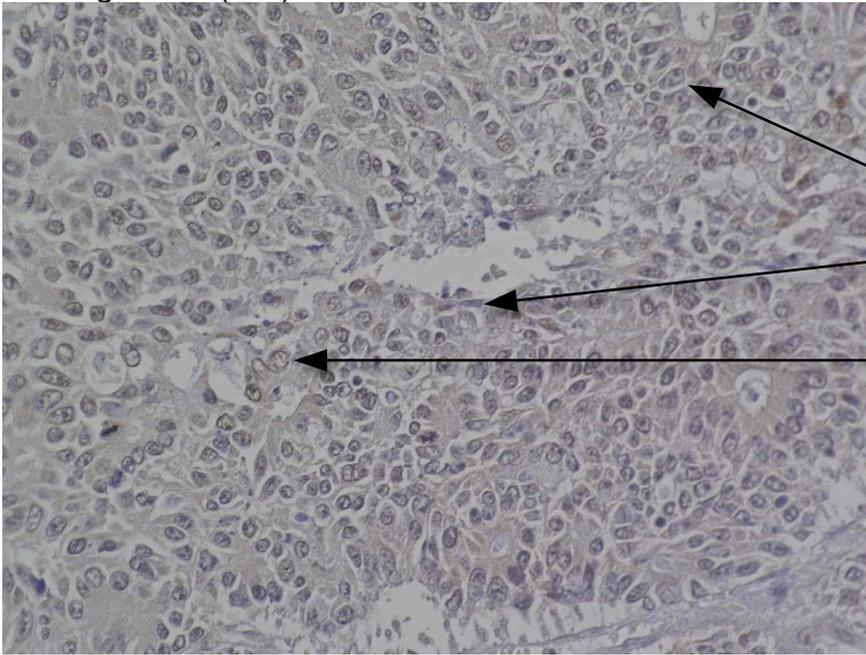


Tumorzellen

Zellkern (blau)

Abbildung 30 - 26389/05 Tumorgewebe, gefärbt (x20)

Tumorgewebe (x40)



Tumorzellen

Zellkern (blau)

Zellkern (braun)

Abbildung 31 - 26389/05 Tumorgewebe, gefärbt (x20)

4.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Von den 19 untersuchten Tumoren weisen sieben eine schwächere, elf eine der Normalmukosa in der Intensität als äquivalent beurteilte Färbung auf. Ein Tumor zeigt eine intensivere Färbung als die komplementäre Positivkontrolle (Normalmukosa).

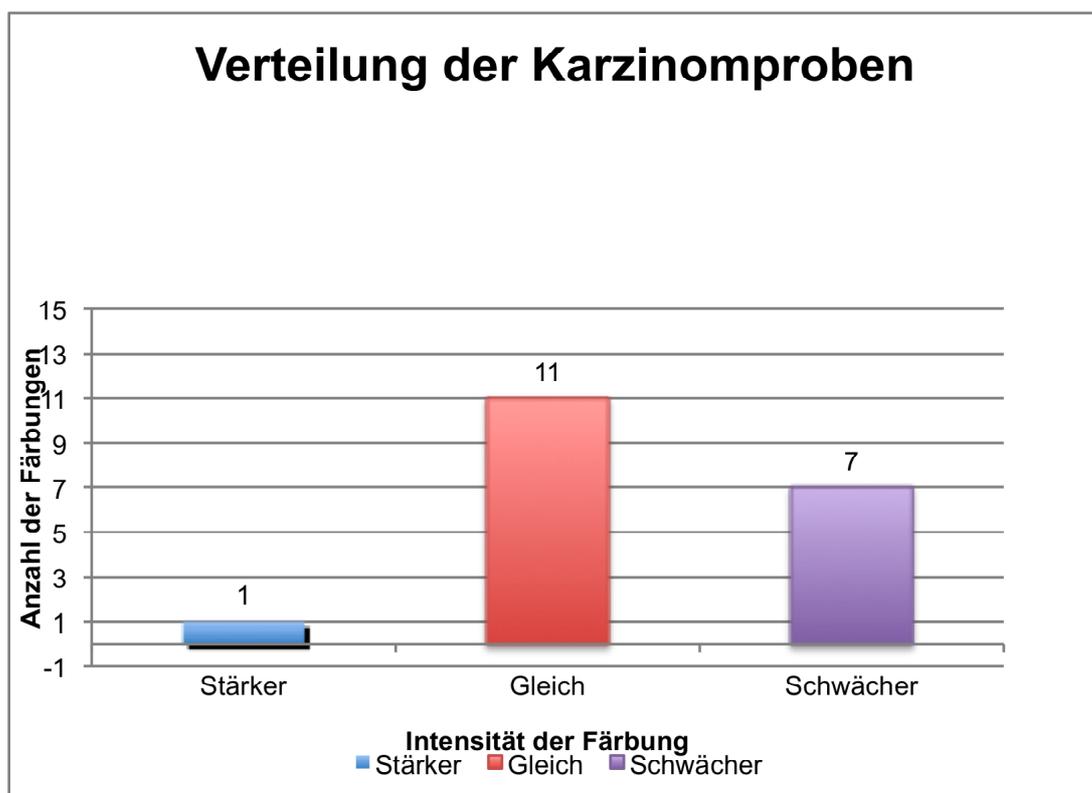


Abbildung 32 – Verteilung der Karzinomproben

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sind 19 mikrosatelliteninstabile kolorektale Karzinome auf die Expression von E2F3 mittels Immunohistochemie untersucht worden.

Dabei wurde die Färbung der Tumorprobe mit der jeweiligen autologen Normalmukosa verglichen. Tumorgewebe und Normalmukosa waren bei 14 der Proben auf separaten Objektträgern fixiert und wurden parallel behandelt. Bei fünf der Tumore (siehe Tabelle 1, Seite 19) befindet sich die Normalmukosa auf dem Objektträger des Tumorgewebes, es liegt keine separate Positivprobe vor. Es wurden jeweils zwei Proben pro Tumor gefärbt.

Ein großer Teil der Karzinome (n=11; 57,9%) zeigt eine der jeweiligen Kontrollprobe gleich intensiv gewertete Färbung („Gleich“ Abbildungen 14 - 22). Hier ist von einer dem Normalgewebe entsprechenden Expression von E2F3 auszugehen. Ein bedeutender Teil der Karzinomproben (n=7; 36,8%) zeigt eine Anfärbung, die sich im Vergleich mit den zugehörigen Positivkontrollen „schwächer“ darstellt. Hier ist von einer verminderten, aber immer noch nachweisbaren Expression von E2F3 im Vergleich zum Kontrollgewebe auszugehen. Nur in einem Karzinom (5,3%) findet sich immunohistochemisch eine Anfärbung, die im Vergleich zu Normalschleimhaut mit „stärker“ bewertet werden kann (Abbildungen 11 – 13). Diese intensivere Färbung der Tumorprobe lässt auf eine erhöhte Expression im Vergleich zur Normalmukosa schließen. Um objektive Aussagen über quantitative Verhältnisse geben zu können, müssten die Proben quantitativ auf E2F3 mRNA bzw. E2F3 Proteingehalt untersucht werden.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass in der überwiegenden Zahl der untersuchten MSI-kolorektalen Karzinome keine per Immunhistochemie nachweisbare Überexpression von E2F3 vorliegt. Nur eine der untersuchten Tumorgewebeproben weist eine erhöhte Farbtintensität auf.

Über 90% der Tumore zeigen eine vergleichbare, bzw. eine schwächere Färbung als die autologen Normalmukosen. Es lässt sich feststellen, dass die Färbungsintensität in MSI-Tumoren im Vergleich zur autologen Normalmukosa, eher ab- als zunimmt. Tendenziell ist also auch von einer Abnahme der E2F3 Expression in MSI-CRC auszugehen.

In früheren Arbeiten ist E2F3 in verschiedenen nicht-gastrointestinalen Tumorentitäten als klassisches Onkogen mit starkem proliferativen Potential identifiziert worden. E2F3 war in diesen Untersuchungen jeweils im Sinne einer Überexpression dereguliert (Miles et al., 2012). Verschiedene Arbeiten haben bereits einige spezifische Tumorentitäten ermittelt, die alle mit einer erhöhten E2F3 Expression assoziiert sind. Dazu zählen u.a. Wilms-Tumoren (Kort et al., 2008), Blasenkrebs (Feber et al., 2004; Oeggerli et al., 2004), Ovarialkarzinome (Smith et al., 2012; Reimer et al., 2011), maligne Melanome (Noguchi et al., 2012) sowie Lungenplattenepithelkarzinome (Cooper et al., 2006).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit decken sich in der Tendenz mit den vereinzelt im Vorfeld durchgeführten Arbeiten zur Beteiligung von E2F3 an kolorektalen bzw. gastrointestinalen Tumoren. Zwar hatte eine frühere Arbeit allgemeine Hinweise auf eine Beteiligung des kurzen Arms von Chromosom 6 an kolorektalen Karzinomen geliefert (Honchel et al., 1996), eine Arbeit aus dem Jahre 1999, in der verschiedene gastrointestinale Tumoren u.a. auf ihre E2F3 Expression auf mRNA Ebene untersucht wurden, kam jedoch zu dem Ergebnis, dass in kolorektalen Karzinomen die Expressionsspiegel von E2F3 mRNA in 20% der Fälle unter denen des verglichenen Normalgewebes lagen (Suzuki et al., 1999). Wichtig anzumerken ist allerdings, dass in dieser Arbeit noch nicht zwischen MSI- / MSS- / CSI-Tumoren unterschieden wurde und die Ergebnisse daher nur in begrenztem Umfang übertragbar sind.

Aussagekräftiger hingegen sind zwei Arbeiten aus dem Jahr 2012, in denen für MSI-CRC spezifische Ergebnisse erarbeitet wurden, welche sich ebenfalls weitgehend mit den Ergebnissen dieser Arbeit decken: Mittels Next Generation

Sequencing wurden im Cancer Genome Project 276 (The Cancer Genome Atlas Network, 2012), bzw. 74 Tumore (Seshagiri et al., 2012) auf somatische Alterationen untersucht. In diesen Tumoren wurden Mutationen von 75 (The Cancer Genome Atlas Network, 2012) bzw. 54 (Seshagiri, et al., 2012) der insgesamt 106 Gene in der Region 6pter – p22.2 identifiziert.

Von den insgesamt 350 untersuchten Tumoren wurden 53 Tumore als MSI eingestuft. Im Verlauf konnten dann in den Arbeiten jeweils 15 (The Cancer Genome Atlas Network, 2012) bzw. 10 (Seshagiri et al., 2012) der betroffenen mutierten Gene aus der Region 6pter – p22.2 in mehr als 3 der MSI-Tumoren nachgewiesen werden. E2F3 befand sich in keiner der Arbeiten unter den an MSI-Tumoren beteiligten Genen. Dies untermauert die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse - E2F3 scheint für MSI-CRC kein relevantes Onkogen darzustellen.

Im Cancer Genome Project wurde die größte Schnittmenge mutierter Gene aus der Region 6pter-p22.2 in MSI-Tumoren bei DSP (Desmoplakin) mit n=13, JARID2 (Jomunji, AT rich interactive domain 2) mit n=10 und bei ATXN1 (Ataxin1) mit n=10 ermittelt. Als nächster Schritt sind nun weitere Untersuchungen dieser drei Gene, DSP, JARID2 und ATXN1 angebracht, um die Beteiligung dieser drei Gene an MSI-CRC zu analysieren, z.B. durch Messungen der mRNA Spiegel der Genprodukte, um die Expression der jeweiligen Genprodukte im Tumorgewebe zu objektivieren sowie beispielsweise das Durchführen einer Exon-Sequenzanalyse der betroffenen Abschnitte, um die Alterationen im Genom der MSI-CRC zu quantifizieren. Sinnvoller Weise sollte mit dem Gen begonnen werden, welches in beiden Arbeiten die höchste Schnittmenge der mutierten Gene aus der Region aufwies: Dieses Gen ist DSP (n=13).

DSP befindet sich auf der Position 6p24.3 und kodiert für Desmoplakin, das in den Plaques auf der Innenseite von Desmosomen für deren korrekte Funktion mitverantwortlich ist. Die DSP Expression ist in Tumoren in der Regel vermindert, die korrekte Zell-Zell Verbindung, die normalerweise über

Desmosomen gewährleistet ist, gestört. Dies scheint in verstärkter lokaler Tumorinvasion (Chun und Hanahan, 2010) und erhöhter Metastasenbildung zu resultieren (Papagerakis et al., 2009).

Eine verringerte DSP-Expression wurde bisher unter anderem in Brustkrebs und in oropharyngealen Karzinomen beobachtet (Davies et al., 1999), kürzlich wurde DSP auch eine Funktion als Tumorsuppressor bei Lungenkrebs (Yang et al., 2012) zugewiesen. Diese bisherigen Erkenntnisse über DSP in Verbindung mit der nun per Next Generation Sequencing objektivierten Tatsache, dass eine Alteration von DSP in beinahe einem Viertel (24,5%) der in den oben genannten Studien untersuchten MSI-CRC nachgewiesen werden konnte, machen weitere Untersuchungen nötig, um die Rolle von DSP in der Karzinogenese in MSI-CRC zu bestimmen.

Nach der Untersuchung von DSP sollten in weiterführenden Projekten auch genauere Untersuchungen bezüglich der Beteiligung von ATXN1 und JARID2 an MSI-CRC durchgeführt werden: Beide Gene waren jeweils im Human Cancer Genome Project in beinahe jedem fünften MSI-CRC als verändert aufgefallen (18,8%). JARID2 ist auf Position 6p22.3 lokalisiert und ist essentiell für die korrekte Entwicklung in embryonalen Stammzellen (Peng et al., 2009) und regelt die Genexpression über Histondemethylierung und, wahrscheinlich, Histonmodifikation (Shirato et al., 2009). Eine Deletion von JARID2 ist mit einer leukämischen Transformation in chronischen myeloepoetischen Krankheiten assoziiert (Puda et al., 2012). Defekte in ATXN1 (Position 6p22.3) wurden bisher vor allem mit neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, z.B. mit der spinocerebellären Ataxie Typ1 sowie Morbus Alzheimer (Zhang et al., 2010).

Die Arbeit des Cancer Genome Project zeigt, zu welcher Leistung Next Generation Sequencing in der Lage ist und aufgrund seiner Überlegenheit in der Screening-Diagnostik konventionelle Labormethoden zur Gendiagnostik optimal ergänzt.

6. Zusammenfassung

Das Gen E2F3 und seine Produkte sind essentiell für die Regulation des Zellzyklus. Eine E2F3-Überexpression wurde bereits in diversen anderen Tumorentitäten nachgewiesen, u.a. in Wilms-Tumoren (Kort et al., 2008), Blasenkrebs (Feber et al., 2004; Oeggerli et al., 2004), Ovarialkarzinomen (Smith et al., 2012; Reimer et al., 2011), malignen Melanomen (Noguchi et al., 2012), sowie Plattenepithelkarzinomen der Lunge (Cooper et al., 2006).

In dieser Arbeit wurden 19 mikrosatelliteninstabile kolorektale Karzinome mittels Immunhistochemie auf ihre E2F3 Expression im Vergleich zur autologen Normalschleimhaut untersucht. 57,9% der untersuchten Karzinome zeigen eine der Positivkontrolle (autologe Normalmukosa) entsprechende Intensität der Färbung. 36,8% der angefärbten Karzinome färbten sich schwächer an als die entsprechende Positivkontrolle. Nur 5,3% der Karzinome zeigte eine stärkere Anfärbung als die zugehörige Positivkontrolle. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass das Gen E2F3 für mikrosatelliteninstabile kolorektale Karzinome kein relevantes Onkogen darstellt.

Im Rahmen des Cancer Genome Project konnten verschiedene Gene aus der Region 6pter-p22.2 identifiziert werden, die in mikrosatelliteninstabilen kolorektalen Karzinomen mutiert vorkommen. Die größte Schnittmenge konnte bei den Genen DSP (Desmoplakin) mit n=13, JARID2 (Jomunji, AT rich interactive domain 2) mit n=10 und bei ATXN1 (Ataxin1) mit n=10 ermittelt werden. Diese Gene sollten nun auf ihre Beteiligung an kolorektalen Karzinomen hin analysiert werden, beispielsweise durch Messungen der mRNA Spiegel der Genprodukte, um die Expression der jeweiligen Genprodukte im Tumorgewebe zu objektivieren sowie beispielsweise über eine Exon-Sequenzanalyse der betroffenen Abschnitte, um die Alterationen im Genom mikrosatelliteninstabiler kolorektaler Karzinome zu quantifizieren.

7. Literaturverzeichnis

- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al. (1993). "Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer." *Science* 260(5109): 812-816.
- Andersen CL, Wiuf C, Kruhøffer M, Korsgaard M, Laurberg S, Ørntoft TF (2007). "Frequent occurrence of uniparental disomy in colorectal cancer." *Carcinogenesis* 28(1): 38-48.
- Attwooll C, Lazzerini Denchi E, Helin K (2004). "The E2F family: specific functions and overlapping interests." *The EMBO journal* 23(24): 4709-4716.
- Beaudet AL, Perciaccante RG, Cutting GR (1991). "Homozygous nonsense mutation causing cystic fibrosis with uniparental disomy." *American journal of human genetics* 48(6): 1213.
- Blais A, Dynlacht BD (2007). "E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control." *Current opinion in cell biology* 19(6): 658-662.
- Bundesamt, S. (2012). "Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2010." 1.
- Cartwright P, Müller H, Wagener C, Holm K, Helin K (1998). "E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription." *Oncogene* 17(5): 611-623.
- Chun MG, Hanahan D (2010). "Genetic deletion of the desmosomal component desmoplakin promotes tumor microinvasion in a mouse model of pancreatic neuroendocrine carcinogenesis." *PLoS genetics* 6(9).
- Cooper CS, Nicholson AG, Foster C, Dodson A, Edwards S, Fletcher A, Roe T, Clark J, Joshi A, Norman A, Feber A, Lin D, Gao Y, Shipley J, Cheng SJ. (2006). "Nuclear overexpression of the E2F3 transcription factor in human lung cancer." *Lung cancer* 54(2): 155-162.
- Danielian PS, Friesenhahn LB, Faust AM, West JC, Caron AM, Bronson RT, Lees JA (2008). "E2f3a and E2f3b make overlapping but different contributions to total E2f3 activity." *Oncogene* 27(51): 6561-6570.

- Davies EL, Gee JM, Cochrane RA, Jiang WG, Sharma AK, Nicholson RI, Mansel RE (1999). "The immunohistochemical expression of desmoplakin and its role in vivo in the progression and metastasis of breast cancer." *European journal of cancer* 35(6): 902-907.
- Di Stefano L, Jensen MR, Kristian H (2003). "E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes." *The EMBO journal* 22(23): 6289-6298.
- Dimova DK, Dyson NJ (2005). "The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces." *Oncogene* 24(17): 2810-2826.
- Engel E (1980). "A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy." *American journal of medical genetics* 6(2): 137-143.
- Fearon ER, Vogelstein B (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* 61(5): 759-767.
- Feber A, Clark J, Goodwin G, Dodson AR, Smith PH, Fletcher A, Edwards S, Flohr P, Falconer A, Roe T, Kovacs G, Dennis N, Fisher C, Wooster R, Huddart R, Foster CS, Cooper CS (2004). "Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer." *Oncogene* 23(8): 1627-1630.
- Foster CS, Falconer A, Dodson AR, Norman AR, Dennis N, Fletcher A, Southgate C, Dowe A, Dearnaley D, Jhavar S, Eeles R, Feber A, Cooper CS (2004). "Transcription factor E2F3 overexpressed in prostate cancer independently predicts clinical outcome." *Oncogene* 23(35): 5871-5879.
- Haberland J, Bertz J, Wolf U, Ziese T, Kurth BM (2010). "German cancer statistics 2004." *BMC cancer* 10: 52.
- He Y, Armanious MK, Thomas MJ, Cress WD (2000). "Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region." *Oncogene* 19(30): 3422-3433.
- Helin K, Wu CL, Fattaey AR, Lees JA, Dynlacht BD, Ngwu C, Harlow E (1993). "Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation." *Genes & development* 7(10): 1850-1861.

- Honchel R, McDonnell S, Schaid DJ, Thibodeau SN (1996). "Tumor necrosis factor-alpha allelic frequency and chromosome 6 allelic imbalance in patients with colorectal cancer." *Cancer research* 56(1): 145-149.
- Humbert PO, Verona R, Trimarchi JM, Rogers C, Dandapani S, Lees JA (2000). "E2f3 is critical for normal cellular proliferation." *Genes & development* 14(6): 690-703.
- Hurst CD, Tomlinson DC, Williams SV, Platt FM, Knowles MA (2008). "Inactivation of the Rb pathway and overexpression of both isoforms of E2F3 are obligate events in bladder tumours with 6p22 amplification." *Oncogene* 27(19): 2716-2727.
- King JC, Moskowitz IP, Burgon PG, Ahmad F, Stone JR, Seidman JG, Lees JA (2008). "E2F3 plays an essential role in cardiac development and function." *Cell cycle* 7(23): 3775-3780.
- Knudson AG Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68(4): 820-823.
- Konishi F, Morson BC (1982). "Pathology of colorectal adenomas: a colonoscopic survey." *Journal of clinical pathology* 35(8): 830-841.
- Kort EJ, Farber L, Tretiakova M, Petillo D, Furge KA, Yang XJ, Cornelius A, Teh BT (2008). "The E2F3-Oncomir-1 axis is activated in Wilms' tumor." *Cancer research* 68(11): 4034-4038.
- Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR (1986). "Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation." *Cell* 45(2): 219-228.
- Leone G, DeGregori J, Yan Z, Laszlo J, Ishida S, William RS, Nevins JR (1998). "E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase." *Genes & development* 12(14): 2120-2130.
- Leone G, Nuckolls F, Ishida S, Adams M, Sears R, Jakoi L, Miron A, Nevins JR (2000). "Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins." *Molecular and cellular biology* 20(10): 3626-3632.

- MacLeod RAF, Nagel S (July 2005). "E2F3 (E2F transcription factor 3)." Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, from <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/E2F3ID40384ch6p22.html>.
- Magae J, Wu CL, Illenye S, Harlow E, Heintz NH (1996). "Nuclear localization of DP and E2F transcription factors by heterodimeric partners and retinoblastoma protein family members." *Journal of cell science* 109 (Pt 7): 1717-1726.
- Martinez LA, Goluszko E, Chen HZ, Leone G, Post S, Lozano G, Chen Z, Chauchereau A (2010). "E2F3 is a mediator of DNA damage-induced apoptosis." *Molecular and cellular biology* 30(2): 524-536.
- Melcher R (2008). "Molekular - und Zytogenetische Charakterisierung des kolorektalen Karzinoms." 4.
- Miles WO, Tschöp K, Herr A, Ji JY, Dyson NJ (2012). "Pumilio facilitates miRNA regulation of the E2F3 oncogene." *Genes & development* 26(4): 356-368.
- Morson B (1974). "President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel." *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 67(6 Pt 1): 451-457.
- Müller H, Moroni MC, Vigo E, Petersen BO, Bartek J, Helin K (1997). "Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization." *Molecular and cellular biology* 17(9): 5508-5520.
- Noguchi S, Mori T, Otsuka Y, Yamada N, Yasui Y, Iwasaki J, Kumazaki M, Maruo K, Akao Y (2012). "Anti-oncogenic microRNA-203 induces senescence by targeting E2F3 protein in human melanoma cells." *The Journal of biological chemistry* 287(15): 11769-11777.
- Oeggerli M, Schraml P, Ruiz C, Bloch M, Novotny H, Mirlacher M, Sauter G, Simon R (2006). "E2F3 is the main target gene of the 6p22 amplicon with high specificity for human bladder cancer." *Oncogene* 25(49): 6538-6543.
- Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P, Calvano-Forte D, Schafroth S, Simon R, Gasser T, Mihatsch MJ, Sauter G (2004). "E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor

- cell proliferation in urinary bladder cancer." *Oncogene* 23(33): 5616-5623.
- Olsson AY, Feber A, Edwards S, Te Poele R, Giddings I, Merson S, Cooper CS (2007). "Role of E2F3 expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer cells." *Oncogene* 26(7): 1028-1037.
- Papagerakis S, Shabana AH, Pollock BH, Papagerakis P, Depondt J, Berdal A (2009). "Altered desmoplakin expression at transcriptional and protein levels provides prognostic information in human oropharyngeal cancer." *Human pathology* 40(9): 1320-1329.
- Peng JC, Valouev A, Swigut T, Zhang J, Zhao Y, Sidow A, Wysocka J (2009). "Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells." *Cell* 139(7): 1290-1302.
- Puda A, Milosevic JD, Berg T, Klampfl T, Harutyunyan AS, Gisslinger B, Rumi E, Pietra D, Malcovati L, Elena C, Doubek M, Steurer M, Tosic N, Pavlovic S, Guglielmelli P, Pieri L, Vannucchi AM, Gisslinger H, Cazzola M, Kralovics R (2012). "Frequent deletions of JARID2 in leukemic transformation of chronic myeloid malignancies." *American journal of hematology* 87(3): 245-250.
- Reichel R, Kovetski I, Nevins JR (1987). "Developmental control of a promoter-specific factor that is also regulated by the E1A gene product." *Cell* 48(3): 501-506.
- Reimer D, Hubalek M, Kiefel H, Riedle S, Skvortsov S, Erdel M, Hofstetter G, Concin N, Fiegl H, Müller-Holzner E, Marth C, Altevogt P, Zeimet AG (2011). "Regulation of transcription factor E2F3a and its clinical relevance in ovarian cancer." *Oncogene* 30(38): 4038-4049.
- Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, Modrusan Z, Storm EE, Conboy CB, Chaudhuri S, Guan Y, Janakiraman V, Jaiswal BS, Guillory J, Ha C, Dijkgraaf GJ, Stinson J, Gnad F, Huntley MA, Degenhardt JD, Haverty PM, Bourgon R, Wang W, Koeppen H, Gentleman R, Starr TK, Zhang Z, Largaespada DA, Wu TD, de Sauvage FJ (2012). "Recurrent R-spondin fusions in colon cancer." *Nature* 488(7413): 660-664.

- Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (2001). "Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis." *Cancer Res.* 61(3): 818-822.
- Shirato H, Ogawa S, Nakajima K, Inagawa M, Kojima M, Tachibana M, Shinkai Y, Takeuchi T (2009). "A jumonji (Jarid2) protein complex represses cyclin D1 expression by methylation of histone H3-K9." *The Journal of biological chemistry* 284(2): 733-739.
- Smith NL, Welch P, Press JZ, Agnew KJ, Garcia R, Swisher EM (2012). "E2F3b over-expression in ovarian carcinomas and in BRCA1 haploinsufficient fallopian tube epithelium." *Genes, chromosomes & cancer* 51(11): 1054-1062.
- Stephens K, Weaver M, Leppig KA, Maruyama K, Emanuel PD, Le Beau MM, Shannon KM (2006). "Interstitial uniparental isodisomy at clustered breakpoint intervals is a frequent mechanism of NF1 inactivation in myeloid malignancies." *Blood* 108(5): 1684-1689.
- Suzuki T, Yasui W, Yokozaki H, Naka K, Ishikawa T, Tahara E (1999). "Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas." *International journal of cancer. Journal international du cancer* 81(4): 535-538.
- The Cancer Genome Atlas Network (2012). "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer." *Nature* 487(7407): 330-337.
- Tuna M, Knuutila S, Mills GB (2009). "Uniparental disomy in cancer." *Trends in molecular medicine* 15(3): 120-128.
- Zopf W, Hartmann E, Kudlich T, Al-Taie O, Luehrs H, Rosenwald A, Scheppach WM, Scheurlen M, Ralph M (2008). "S2061 Uniparental Disomy As Novel Mutational Mechanism in MSI- and CSI-Colorectal Cancer." *Gastroenterology* 134(4): A-307.
- Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, Nuckolls F, Giangrande P, Wright FA, Field SJ, Greenberg ME, Orkin S, Nevins JR, Robinson ML, Leone G (2001). "The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation." *Nature* 414(6862): 457-462.

- Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC (2010). "Uniparental disomy and human disease: an overview." *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* 154C(3): 329-334.
- Yang L, Chen Y, Cui T, Knosel T, Zhang Q, Albring KF, Huber O, Petersen I (2012). "Desmoplakin acts as a tumor suppressor by inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in human lung cancer." *Carcinogenesis* 33(10): 1863-1870.
- Zhang C, Browne A, Child D, Divito JR, Stevenson JA, Tanzi RE (2010). "Loss of function of ATXN1 increases amyloid beta-protein levels by potentiating beta-secretase processing of beta-amyloid precursor protein." *The Journal of biological chemistry* 285(12): 8515-8526.
- Zhang Y, Chellappan SP (1995). "Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerization partner of E2F." *Oncogene* 10(11): 2085-2093.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Adenom Karzinom Sequenz aus Harrison 18. Auflage	2
Abbildung 2 - Deletion in der Mitose.....	5
Abbildung 3 - Stückaustausch in der Mitose.....	6
Abbildung 4 - Segregationsfehler in der Mitose.....	6
Abbildung 5 - Pathogenetische Konsequenzen der UPD	7
Abbildung 6 - Schematische Darstellung des Gens E2F3.....	10
Abbildung 7 – Schematische Darstellung der E2F3 Proteinstruktur.....	10
Tabelle 1 - Übersicht der Gewebeproben	15
Tabelle 2 - Eigenschaften der Gewebeproben	16
Abbildung 8 - Normalmukosa, ohne Primär-AK (Negativkontrolle).....	22
Abbildung 9 - Normalmukosa, mit Primär-AK (Positivkontrolle)	23
Abbildung 10 - Normalmukosa, mit Primär-AK (Positivkontrolle)	23
Abbildung 11 - 22911/03 Normalmukosa, gefärbt (x20).....	25
Abbildung 12 - 22911/03 Tumorgewebe, gefärbt (x20)	26
Abbildung 13 - 22911/03 Tumorgewebe, gefärbt (x40)	26
Abbildung 14 - 1632/07 Normalmukosa, gefärbt (x20).....	27
Abbildung 15 - 1632/07 Tumorgewebe, gefärbt (x20)	27
Abbildung 16 - 1632/07 Tumorgewebe, gefärbt (x40)	28
Abbildung 17 - 6015/01 Normalmukosa, gefärbt (x20).....	28
Abbildung 18 - 6015/01 Tumorgewebe, gefärbt (x20)	29
Abbildung 19 - 6015/01 Tumorgewebe, gefärbt (x40)	29
Abbildung 20 - 13929/04 Normalmukosa, gefärbt (x20).....	30
Abbildung 21 - 13929/04 Tumorgewebe, gefärbt (x20)	30
Abbildung 22 - 13929/04 Tumorgewebe, gefärbt (x40)	31
Abbildung 23 - 2974/07 Normalmukosa gefärbt (x20).....	32
Abbildung 24 - 2974/07 Tumorgewebe, gefärbt (x20)	32
Abbildung 25 - 2974/07 Tumorgewebe, gefärbt (x20)	33
Abbildung 26 - 4215/01 Normalmukosa, gefärbt (x20).....	33
Abbildung 27 - 4215/01 Tumorgewebe, gefärbt (x20)	34
Abbildung 28 - 4215/01 Tumorgewebe, gefärbt (x40)	34
Abbildung 29 - 26389/04 Normalmukosa, gefärbt (x20).....	35

Abbildung 30 - 26389/05 Tumorgewebe, gefärbt (x20)	35
Abbildung 31 - 26389/05 Tumorgewebe, gefärbt (x20)	36
Abbildung 32 - Verteilung der Karzinomproben	37