

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Klaus Wilms

Selenoprotein P in der kolorektalen Karzinogenese

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Ursula Eußner
aus Würzburg

Würzburg, November 2002

Referent: Prof. Dr. med. F. Jakob

Korreferent: Prof. Dr. med. M. Scheurlen

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Mai 2003

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kolorektale Karzinogenese	1
1.1.1	Tumorsuppressor-Pathway	2
1.1.2	Mutator-Pathway	3
1.2	ROS und Karzinogenese	6
1.3	Selen und Selenoproteine.....	8
1.3.1	Selen	8
1.3.2	Selenoproteine	9
1.3.2.1	Selen-Einbau in Proteine	10
1.3.2.2	Glutathion-Peroxidasen	11
1.3.2.3	Thioredoxin-Reduktasen.....	12
1.3.2.4	Dejodasen	13
1.4	Selenoprotein P.....	14
1.4.1	Protein.....	14
1.4.2	Genetische Struktur des SePP	15
1.4.3	Regulation des SePP	16
1.4.4	Funktion des SePP.....	17
1.5	Selen und Kolonkarzinogenese.....	19
1.6	Selenoproteine und Kolonkarzinogenese.....	20
1.7	Fragestellung	22
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Untersuchte Materialien.....	23
2.1.1	Kolonkarzinomgewebe und korrespond. gesunde Kolonschleimhaut	23

2.1.1.1	Proben zur DNA-Analytik	23
2.1.1.2	Proben zur RNA-Analytik.....	24
2.1.2	Blutproben	24
2.1.3	Tumorzelllinien: Humane Kolon-Karzinomzelllinien.....	25
2.1.3.1	Colo 205 (ATCC: CCL 222).....	25
2.1.3.2	Caco 2 (ATCC: HTB 37)	25
2.1.3.3	HCT 15 (ATCC: CCL 225)	26
2.1.3.4	HCT 116 (ATCC: CCL 247)	26
2.1.3.5	LoVo (ATCC: CCL 229)	26
2.2	Zellkultur	27
2.3	Verwendete Materialien, Chemikalien und Geräte.....	28
2.3.1	Allgemeines	28
2.3.2	Lösungen und Puffer	29
2.3.3	Geräte	30
2.4	DNA-Extraktion.....	31
2.4.1	DNA-Extraktion aus Gewebeproben.....	31
2.4.1.1	Mikrodissektion und DNA-Extraktion aus Paraffingewebe.....	31
2.4.1.2	DNA-Extraktion aus Kryogewebe	32
2.4.1.3	Protokolle zur Aufreinigung der DNA	33
2.4.1.3.1	Entparaffinisierung und DNA-Extraktion der Gewebeproben.....	33
2.4.1.3.2	Phenol-Chloroform-Aufreinigung der DNA nach Extraktion aus den Geweben	33
2.4.1.3.3	Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung	34
2.4.2	DNA-Extraktion aus Blutzellen.....	34
2.4.3	DNA-Extraktion aus Zellkulturen	34

2.5	RNA-Extraktion.....	35
2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	36
2.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction / PCR)	36
2.7.1	Allgemeines zur PCR.....	36
2.7.2	Kontrolle der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese	37
2.7.3	PCR-Produkt-Aufreinigung	38
2.7.4	Etablierung der Primer und PCR-Bedingungen zur Amplifikation der Exons.....	38
2.7.5	Sequenzierung	41
2.7.5.1	Sequenz-PCR	41
2.7.5.2	Aufreinigung des Sequenz-PCR-Produktes.....	42
2.7.5.3	Automatische Sequenzierung	42
2.7.5.4	Auswertung der Sequenzierung.....	42
2.8	PCR-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse.....	43
2.9	Mikrosatelliten-Analyse	45
2.10	Northern-Blot.....	47
2.11	Blot-Hybridisierung.....	48
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Charakterisierung der Gewebeproben	49
3.1.1	Daten der zur RNA-Analyse verwendeten Proben	49
3.1.2	Daten der zur DNA-Analyse verwendeten Proben.....	50
3.2	RNA-Analytik mittels Northern-Blot.....	53
3.2.1	SePP-mRNA-Expression in den untersuchten fünf Kolonkarzinom-Zelllinien.....	53
3.2.2	SePP-mRNA-Expression in den untersuchten Tumorgewebeproben	53
3.3	Ergebnisse der Sequenzierung der SePP-Exons	55

3.3.1	Sequenzanalysen an Kolonkarzinomgeweben.....	55
3.3.2	Sequenzanalysen an Kolonkarzinom-Zelllinien	55
3.3.3	In Kolonkarzinomen treten keine Mutationen des SePP-Genes auf.....	55
3.3.4	Sequenzabweichung in Exon 2 des SePP	56
3.3.5	Identifikation des Polymorphismus Ala215Thr in Exon 5 des SePP	57
3.3.5.1	Charakterisierung des Polymorphismus Ala215Thr.....	57
3.3.5.2	Häufigkeit des Ala215Thr Polymorphismus der untersuchten Gewebeproben	58
3.3.5.3	Auftreten des Polymorphismus Ala215Thr in den untersuchten Zelllinien	59
3.3.5.4	Häufigkeit des Polymorphismus Ala215Thr in Blutproben von gesunden Probanden und Kolonkarzinompatienten.....	59
3.4	LOH-Analysen des SePP-Locus mittels Mikrosatellitenmarker D5S634 und D5S660.....	60
4	Diskussion	61
5	Zusammenfassung	69
6	Literatur	71

1 Einleitung

1.1 Kolorektale Karzinogenese

In den westlichen, industrialisierten Ländern nimmt das kolorektale Karzinom in den Krebsstatistiken beider Geschlechter einen der vorderen Plätze ein. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Institutes erkrankten im Jahre 1998 etwa 27.000 Männer (~15% der Krebsneuerkrankungen) und etwa 30.000 Frauen (~16%) in Deutschland neu an Dickdarm- und Mastdarmkrebs (Internet: www.rki.de). Damit stellt das kolorektale Karzinom bei Männern hinter dem Bronchial- und Prostatakarzinom die dritthäufigste und bei Frauen nach dem Mammakarzinom die zweithäufigste Krebserkrankung dar. Darüberhinaus ist Darmkrebs sowohl im weiblichen als auch im männlichen Geschlecht die zweithäufigste Krebstodesursache.

Die überwiegende Zahl der kolorektalen Karzinome entwickelt sich ausgehend von gesunder Kolonschleimhaut über benigne Vorstufen (Adenome) entlang der sog. Adenom-Karzinom-Sequenz [Fearon 1990]. Beteiligt an diesem Stufenprozess der kolorektalen Karzinogenese sind verschiedene Umweltfaktoren sowie angeborene oder erworbene molekulargenetische Veränderungen, die in komplexe Wechselwirkungen zueinander treten. So zeigten verschiedene epidemiologische Studien, dass neben Übergewicht und Bewegungsmangel bestimmte Ernährungsgewohnheiten, wie fett- und fleischreiche (v.a. „rotes“ Fleisch), aber ballaststoffarme Kost, eine Krebsentstehung begünstigen [Slattery 2001/ Gerhardsson de Verdier 1991].

Auch ein langjähriger Verlauf chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn wird mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert [Mellekjær 1995].

Insbesondere die Aufklärung der genetischen Alterationen hereditärer Kolonkarzinom-Syndrome wie der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) und des Hereditären Non-Polyposis Kolorektalen Karzinoms (HNPCC) haben wesentlich zum Verständnis der molekulargenetischen Grundlagen der Kolonkarzinogenese entlang dieser Adenom-Karzinom-Sequenz beigetragen. Kolorektale Karzinome entwickeln sich hauptsächlich auf zwei verschiedenen molekulargenetischen Entwicklungspfaden, dem sog. Tumorsuppressor-Pathway und dem sog. Mutator-Pathway. Die charakteristischen Merkmale dieser Entwicklungspfade sollen im Folgenden zusammenfassend skizziert werden.

1.1.1 Tumorsuppressor-Pathway

Zirka 80% aller kolorektalen Karzinome entwickeln sich auf dem Boden genetischer Alterationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen. Klassische Veränderungen dieses Entstehungsweges umfassen Mutationen und LOH (Loss of Heterozygosity) in den Tumorsuppressorgenen APC (Adenomatous Poliposis Coli-Gen, Chromosom 5q21), p53 (Chromosom 17p12-13) und evtl. DCC (Deleted in Colorectal Cancer-Gen, Chromosom 18q21). Inaktivierung oder Verlust dieser Gene führt zu un- oder fehlregulierter Zellproliferation und Zelldifferenzierung und damit zu veränderter Zelladhäsion und Zellmigration.

Zu den in die kolorektale Karzinogenese involvierten Onkogenen werden neben K-ras auch SRC und MYC gerechnet. Onkogene können aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit zu wachstumsregulierenden Proteinen in die Steuerung des Zellzyklus eingreifen und so zu Proliferationssteigerung oder Verlängerung der Überlebenszeit führen bzw. eine weitere Progression dieses Zellklones vom Adenom zum invasivem Karzinom bis zur Metastasierung ermöglichen [Fearon 1990/ Bishop 1994].

Weitere genomische Alterationen wie Verlust multipler Chromosomenabschnitte oder Veränderung der DNA-Methylierung werden angeführt. Nur einzelne

Veränderungen können bestimmten Stadien der Tumorgenese zugeordnet werden, so erfolgt der Verlust von APC frühzeitig, daher wird dieses Gen auch als sog. „gatekeeper“ bezeichnet. Der Verlust von Allelen auf den Chromosomen 17p und 18p ereignet sich meist erst im fortgeschrittenen Stadium der Tumorgenese. Der Häufung der genetischen Alterationen wird von den Autoren [Fearon 1990/ Bishop 1994] mehr Bedeutung beigemessen als deren zeitliche Abfolge.

Neben sporadisch entstehenden Formen des kolorektalen Karzinoms treten weitaus seltener hereditäre Tumore auf. Diese zeichnen sich durch Keimbahnmutationen in Onkogenen und/oder Tumorsuppressorgenen aus. Durch somatische Mutation des entsprechenden zweiten Allels (z.B. Deletion, Insertion) oder auch Verlust eines Genabschnittes – „Loss of Heterozygosity“ – kommt es zur Initiierung der Tumorentstehung [cf. Knudson (1971): „two hit“-Theorie].

Ein klassisches Beispiel einer hereditären Form der kolorektalen Karzinogenese des Tumorsupressorweges stellt die Familiäre Adenomatöse Poliposis (FAP) dar, die etwa 1% der kolorektalen Karzinome zugrunde liegt. Sie gilt als obligate Präkanzerose, bei der schon in jungen Jahren multiple Adenome (>100) im gesamten Gastrointestinaltrakt mit sehr hohem Entartungsrisiko entstehen. Charakteristisch für die FAP ist die Mutation des APC-Tumorsuppressorgenes auf Chromosom 5q21, die autosomal dominant an die Nachkommen weitergegeben wird.

1.1.2 Mutator-Pathway

Ca. 15-20% aller kolorektalen Karzinome entwickeln sich entlang des sog. Mutator-Pathways, der auf Mutationen in Genen der DNA-Mismatch-Reparatur (MMR) basiert. Hauptfunktion dieses Reparatur-Systems, das aus zahlreichen MMR-Genen besteht, ist die Korrektur von im Rahmen der Zellteilung häufig auftretenden Replikationsfehlern (Basenfehlpaarung, sog. „Mismatch“). Diese treten v.a. in DNA-Abschnitten mit sich wiederholenden (repetitiven) Basensequenzen (sog. Mikrosatelliten) auf. Hierbei kann es sich um einfache Mononukleotid- (z.B. Poly-

A_(n)) oder Dinukleotid-Wiederholungen (z.B. Poly-CT_(n)), aber auch komplex höhergradige Repeatstrukturen handeln. Die Anzahl (n) und Art der Basenwiederholung innerhalb eines solchen DNA-Abschnitts sind genetisch determiniert und zwischen verschiedenen Individuen variabel (polymorph), jedoch innerhalb eines Individuums in jeder Zelle gleich (sوماتisch stabil). Das Vorliegen eines MMR-Defektes führt im Tumorgewebe zum Auftreten einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI), d.h. die DNA der Tumorzellen und die normalen Gewebes weisen Unterschiede in einzelnen Mikrosatelliten auf. Neben Replikationsfehlern tragen auch DNA-Schädigungen (z.B. durch Radikale) zum Auftreten einer MSI bei defekter Mismatch-Reparatur bei [Perucho 1996/Jackson 1998/ Loeb 2000/ Alexander 2001].

Die Bedeutung genetischer Alterationen des MMR-Systems für die kolorektale Karzinogenese wurde erstmals durch die Identifikation von Keimbahnmutationen in MMR-Genen bei Patienten mit dem erblich bedingten Hereditären Non-Polyposis kolorektalen Karzinom (HNPCC) beschrieben. Mittlerweile wurden bei HNPCC-Patienten Alterationen in den Genen hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6 nachgewiesen. Der überwiegende Teil der bisher identifizierten Keimbahnmutationen wurde in den Genen hMLH1 (ca. 60%) und hMSH2 (ca. 35%) identifiziert [Al-Taie 2001].

Der MMR-Defekt sporadischer MSI-positiver Tumore hingegen beruht in den meisten Fällen auf einer Methylierung des Promoters von hMLH1 [Gryfe 2000/ Herman 1998/ Aaltonen 2000/ Offit 2000/ Miyakura 2001/ Samowitz 2001].

Interessanterweise treten MSI-positive Tumore in jüngerem Lebensalter auf, sind bevorzugt proximal der Flexura splenica coli lokalisiert und sind histopathologisch häufiger gering differenziert oder muzinös [Guidoboni 2001/ Alexander 2001]. Neuere Studien deuten zudem auf eine bessere Prognose und ein verändertes Chemotherapieansprechen MSI-positiver Kolonkarzinome im Vergleich zu MSI-negativen Kolonkarzinomen hin [Guidoboni 2001/ Gryfe 2000/ Watson 1998/ Wright

2000]. Allerdings gibt es hierzu auch widersprüchliche Daten [Feeley 1999/ Lukish 1998].

Eine Zusammenschau der beiden Modellvorstellungen zur Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms mit den hauptsächlich beteiligten Genen gibt nachfolgende Abbildung.

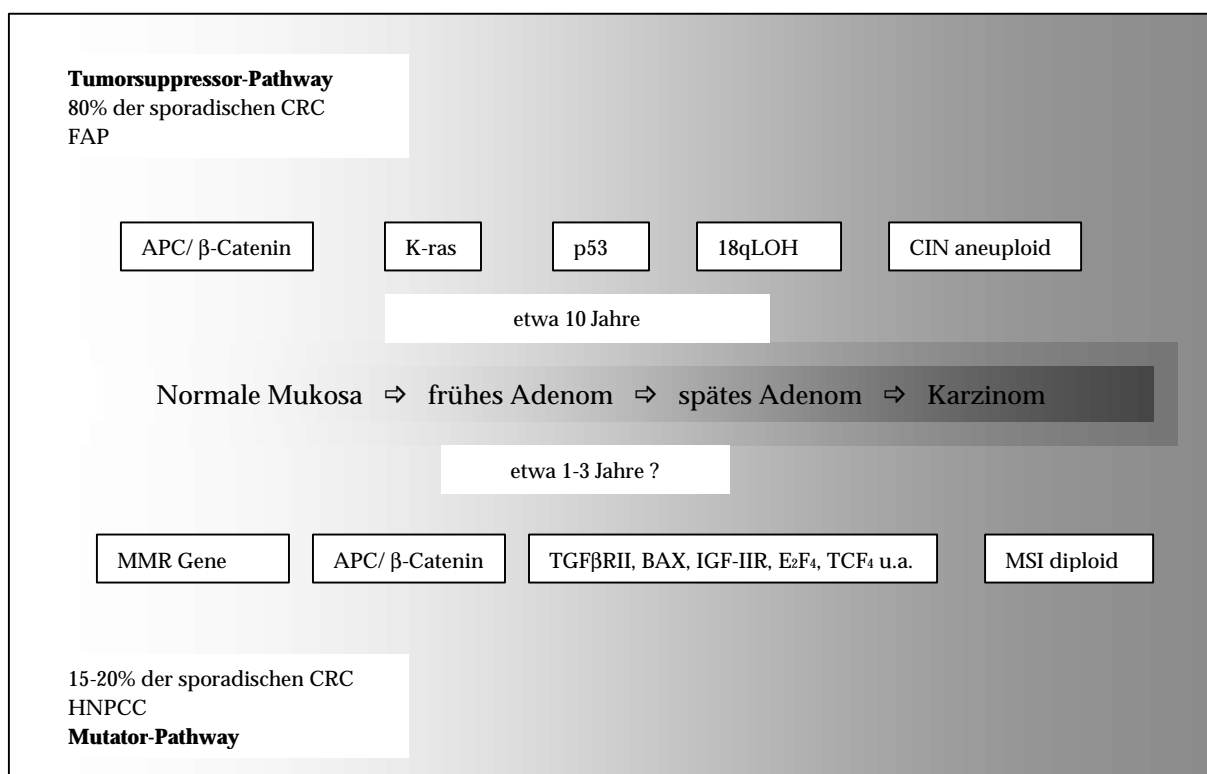


Abbildung 1: Pathomechanismen der kolorektalen Karzinogenese

1.2 ROS und Karzinogenese

Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species: ROS) treten in allen O₂-verstoffwechselnden Organismen auf. Sie entstehen sowohl exogen z.B. durch UV-, Röntgen oder γ -Strahlung, Chemikalien u.a.m. als auch endogen in den biologischen Systemen des oxidativen Zellstoffwechsels bei der oxidativen Phosphorylierung oder Aktivität oxidativer Enzyme wie z.B. der Xanthinoxidase oder Monoaminoxidase.

Freien Radikalen werden wichtige Funktionen in der zellulären Signaltransduktion, Induktion von Wachstum und Apoptose sowie als Effektormechanismen immunkompetenter Zellen [Fehrenbach 2001/ Salganik 2001] zugeschrieben. Doch entscheidend ist, in welcher Menge und an welchem Ort ROS auftreten. In angemessener Dosis erfüllen sie physiologische Aufgaben und werden durch angepasste antioxidative Schutzsysteme der Zelle antagonisiert. Gerät dieses Verhältnis zwischen Radikalentstehung und Neutralisierung der Radikale aus dem Gleichgewicht, überwiegen deren schädigende Effekte, es herrscht „oxidativer Stress“.

Von besonderer Bedeutung sind ROS für die Mutagenese und Karzinogenese [Loeb 2000/ Jackson 1998]. Es wird vermutet, dass pro Zelle und Tag bis zu 20.000 Hits im menschlichen Organismus nur allein durch endogene ROS stattfinden [Beckman 1997]. Zu diesen gehören u.a. Singulett-Sauerstoff, Hydrogen-Peroxid (H₂O₂), Superoxid-Radikal (O^{•2-}), organische Oxy- (RO[•]), sowie Peroxy- (ROO[•]) Radikale. Weitere hochreaktive Verbindungen stellen Stickstoffmonoxid (NO) sowie durch Reaktion mit Sauerstoffradikalen daraus entstehendes Peroxynitrit (ONOO⁻) dar [Winnefeld 1997].

Angriffspunkte dieser potentiell toxischen, mutagenen und kanzerogenen Radikale sind alle biologischen Makromoleküle, neben Membranlipiden und Proteinen vor allem auch die DNA an verschiedenen Stellen. Durch Schädigung an der Desoxyribose können Strangbrüche oder auch Quervernetzungen (sog. Cross-links)

induziert werden. An den Basen der DNA können Radikale verschiedene Veränderungen, von Dimerisierung von Thymin über Exzision einzelner Basen oder chemischer Veränderungen der Basen verursachen, was im Weiteren zum Abbruch der Replikation oder über Fehlpaarung zu Mutationen führen kann [Peskin 1997] und somit zur Induktion von Tumorgenese.

Doch die Zelle ist den ROS nicht schutzlos ausgeliefert. Es wurden verschiedene Mechanismen identifiziert, die die Entstehung von ROS verringern, sie enzymatisch oder nicht-enzymatisch „entgiften“ (abbauen) oder, wenn schon Schäden an der DNA entstanden sind, diese reparieren können [Arteel 2001]. Nicht-enzymatisch wirken z.B. Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E), α -Liponsäure sowie verschiedene Carotinoide. Zu den antioxidativ wirkenden Enzymen gehören neben der Superoxiddismutase ($2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) und der Katalase ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) auch verschiedene Formen der Selenoproteine, insbesondere die Isoenzyme der Glutathion-Peroxidase (GPx), Thioredoxin-Reduktase (TRxR) und - worauf bisherige Untersuchungen hinweisen - auch Selenoprotein P (SePP).

1.3 Selen und Selenoproteine

1.3.1 Selen

Das Spurenelement Selen wurde erstmals 1817 von J. Berzelius in Stockholm isoliert.

Es ist ein weit verbreitetes, aber regional in verschiedener Konzentration in den Böden vorkommendes Element, das meist in Verbindungen mit anderen Mineralien wie Schwefel, Silber u.a. vorliegt.

Als essentielles Spurenelement für Mensch und Tier kann Selen sowohl als organische wie auch als anorganische Verbindung im Gastrointestinaltrakt gut resorbiert werden. Die Selenaufnahme variiert in Europa zwischen 28 bis 110µg pro Tag [www.DGE.de/ Ogasawara 2001/ Rayman 2000]. Als Selenquellen dienen neben Seefisch auch Fleisch, Getreide und Gemüse. Allerdings ist deren Selengehalt stark vom Bodenselengehalt des jeweiligen Anbaugebietes abhängig [Rayman 2000]. Die Aufnahme von Selen erfolgt v.a. in Form von Natrium-Selenit und Natrium-Selenat oder organischen Verbindungen wie Selenomethionin und Selenocystein. Im menschlichen Organismus stellt nach bisherigen Vorstellungen Hydrogen-Selenid (H_2Se) den zentralen Knotenpunkt des Selenstoffwechsels dar. Durch Reduktion von aufgenommenem Selenit oder Selenat bzw. Lyse aus organischen Selenverbindungen entsteht über instabile Zwischenstufen wie Selenodiglutathion ($GSSeSG$) H_2Se . Dieses kann enzymatisch zu Selenophosphat aktiviert werden und dann entweder wiederum in Proteine eingebaut werden (s.u.), als monomethylierte Form biologisch aktiv oder als Dimethyl-Selen im Urin bzw. als Trimethyl-Selen über die Expiration ausgeschieden werden [Ganther 1999/ Ogasawara 2001]. Aber über weite Bereiche des Selenmetabolismus herrscht noch Unklarheit [Ogasawara 2001].

Einige Krankheitsbilder sind assoziiert mit Selenmangel, wie die Keshan-Erkrankung, eine in China endemische Kardiomyopathie, oder die Osteoarthropathie Kashin-Beck [Jakob 1997/ Ogasawara 2001]. Ebenso sind allgemeine Symptome

infolge Selenmangels, wie Müdigkeit, Haar- und Nagelveränderungen, sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen bekannt. Als zu empfehlende Aufnahme pro Tag werden für Erwachsene 60–75µg Selen, als Tageshöchstdosis 300µg Selen angegeben [Ogasawara 2001] [DGE: 30-70µg/d].

Daneben treten aber schon bei Selenaufnahme von 900-1000µg pro Tag (~ 3-4fache der angegebenen Tageshöchstdosis) toxische Wirkungen auf, wie Dermatitis, Haar- und Nagelveränderungen, Neurotoxizität [Ogasawara 2001]. Ebenso liegen zumindest im Tiermodell Hinweise auf Kanzerogenität und Teratogenität bei exzessiver Selenaufnahme vor [nach: European Commission: Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of Selenium 2000].

Im menschlichen Organismus wird Selen Beteiligung an verschiedenen biologischen Systemen zugeschrieben, die nur zum Teil den einzelnen chemischen Formen des Selen zugeordnet werden können. Einen der wichtigsten Effekte scheint Selen als essentieller Strukturbestandteil von zahlreichen Selenoproteinen auszuüben.

1.3.2 Selenoproteine

Als so genannte Selenoproteine im engeren Sinne werden Proteine bezeichnet, die Selen kovalent gebunden in Form der Aminosäure Selenocystein enthalten. Gemeinsam ist diesen Proteinen die Lokalisation des Selenocysteins im aktiven Zentrum des Proteins.

Man vermutet im menschlichen Organismus mehr als 35 selenocysteinhaltige Proteine. Als solche konnten bisher u.a. die Isoformen der Glutathion-Peroxidase (C-, GI-, P-, PH-GPx), Thioredoxin-Reduktasen, Jodothyronin-Dejodasen, Selenoprotein P (SePP) und Selenoprotein W, ein Muskelprotein, und andere identifiziert und z.T. funktionell charakterisiert werden.

1.3.2.1 Selen-Einbau in Proteine

Kovalent gebunden kann Selen in Form der Aminosäuren Selenomethionin kompetitiv zu Methionin oder über einen spezifischen und komplexen Mechanismus als Selenocystein in Proteine eingebaut werden. Codiert wird diese 21. Aminosäure Selenocystein durch das Codon UGA der mRNA, welches ebenso als ein Stoppsignal der Translation agieren kann. Die Vorgänge, die anstelle eines Translationsabbruchs einen Einbau des Selenocysteins ermöglichen, konnten an Prokaryonten aufgeklärt werden. In Prokaryonten wird nach Beladung einer spezifischen tRNA^{Sec} (SelC) mit Serin dieses enzymatisch zu Selenocystein durch eine Selenocystein-Synthase, dem Produkt des SelA-Genes, unter Verbrauch von Selenophosphat als Selendonor modifiziert. Selenophosphat entsteht infolge ATP-abhängiger Aktivierung des Selens durch eine Selenophosphat-Synthase, dem Genprodukt des SelD. Unter Vermittlung eines spezifischen Elongationsfaktors, SelB, [Köhrle 1997] und einer speziellen Sekundärstruktur der mRNA wird der Einbau des Selenocysteines ermöglicht. Diese Sekundärstruktur wird auch als SelenoCysteine Insertion Sequence (kurz SECIS) Motiv bezeichnet und dient, da ihre Struktur in allen bisher bekannten Selenoproteinen hochkonservierte Abschnitte enthält, im Rahmen der experimentellen Forschung zur Detektion weiterer Selenoproteine [Lescure 1999/Grundner-Culemann 1999]. Entsprechende Parallelen in Eukaryonten sind nur zum Teil bekannt [Burk 1999].

So unterscheidet sich bei Eukaryonten nicht zuletzt die Lokalisation des SECIS-Motivs in der mRNA. Während sich dieses bei Prokaryonten innerhalb des codierenden Abschnittes in direkter Nähe zum UGA-Codon befindet, liegt es bei Eukaryonten im 3'-untranslatierten Bereich (3'utr) der mRNA. Des Weiteren konnten beim Menschen Homologe für SelC und SelD, sowie eine zweite Selenophosphat-Synthase (SPS2) nachgewiesen werden. Dieses Enzym enthält selbst Selenocystein und könnte so als zentraler Regulator der Selenoproteinsynthese in Abhängigkeit vom Selenstatus dienen [Guimaraes 1996/ Köhrle 1997].

1.3.2.2 Glutathion-Peroxidasen

Glutathion-Peroxidasen (GPx) katalysieren unter Gebrauch von Glutathion (GSH) als Cosubstrat den Abbau von Wasserstoffperoxid und anderen Hydroperoxiden. Nach der klassischen zellulären Glutathion-Peroxidase (C-GPx), die 1973 als erstes Selenoprotein identifiziert wurde, konnten weitere Isoenzyme der GPx charakterisiert werden, die von verschiedenen Genen codiert werden.

Die klassische zytosolische (C-GPx) wie auch die sezernierte, plasmatische (P-GPx) und die überwiegend im Gastrointestinaltrakt und Leber exprimierte, ebenso zytoplasmatische Isoform (GI-GPx) bestehen jeweils aus vier identischen Untereinheiten. Diese besitzen pro Untereinheit einen Selenocysteinrest im aktiven Zentrum und gleichen sich in ihrer Substratspezifität für H_2O_2 und andere niedermolekulare Hydroperoxide.

Die C-GPx wird als antioxidatives Enzym in zahlreichen Gewebe exprimiert und kann als ein Marker der Selenversorgung herangezogen werden, da die Stabilität der C-GPx-mRNA und die messbare Enzymaktivität bei Selenmangel stark verringert sind [Brigelius-Flohe 1999/ Sachdev Weiss 2001/ Moriarty 1998].

In gleicher Weise reagiert P-GPx auf Selenmangel. Diese wird u.a. in der Niere und im Ziliarkörper exprimiert und sezerniert. Die extrazelluläre antioxidative Effizienz der P-GPx wird allerdings durch geringes Vorkommen an reduzierenden Thiol-Substraten im Plasma eingeschränkt [Brigelius-Flohe 1999].

Die Expression der GI-GPx wurde in Leber- und Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes aufgezeigt [Chu 1995/ Chu 1993]. In Mäusen (und ebenso korrelierend im menschlichen Genom) konnte das für die GI-GPx codierende Gen in der Nähe eines Kolonkarzinom-Suszeptibilitäts-Bereichs (Ccs 1) nahe bei Fos und TGF β 3 lokalisiert werden [Jacoby 1994]. Der GI-GPx werden v.a. Protektion gegen Hydroperoxide aus der Nahrung und durch Metabolisierung von Xenobiotika entstandene Radikale zugeschrieben [Brigelius-Flohe 1999]. Die Bedeutung der GI-

GPx zeigt sich auch in der Rangfolge der GPx-Expression unter Selenmangelbedingungen. Während die Expression der GI-GPx weitestgehend stabil ist, sinkt die Expression der C- und P-GPx ab. Eine Steuerung unter Selenmangel erfolgt v.a. über die Stabilität der mRNA [Brigelius-Flohe 1999]. Die Hierarchie der GPx-Isoenzyme unter Selenmangel zeigt eine Präferenz der GI-GPx gegenüber PH-GPx vor C- und P-GPx.

Als ein viertes Isoenzym der GPx konnte die Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PH-GPx) mit stärkster Aktivität in Keimepithelien der Testes identifiziert werden. Dieses monomere Enzym reagiert v.a. mit Phospholipidhydroperoxiden, Cholesterolhydroperoxid u.a. Lipidperoxiden und dient somit als z.T. membrangebundene GPx der Protektion von Biomembranen vor Peroxidation [Ursini 1999]. Ebenso scheint es als unlösliches, enzymatisch inaktives Protein in reifen Spermatozoen als Strukturbestandteil der mitochondrialen Kapsel zu dienen [Ursini 1999/ Brigelius-Flohe 1999].

1.3.2.3 Thioredoxin-Reduktasen

Erst 1995 [Tamura 1996] wurden die verschiedenen Formen der Thioredoxin-Reduktasen (TRxR) als Selenoproteine identifiziert. Sie weisen als NADPH-abhängige homodimere Oxidoreduktasen mit einem Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) pro Untereinheit als prosthetische Gruppe eine weite Substratspezifität auf. Neben der Reduktion des oxidierten Thioredoxin dienen sie der Regeneration anderer antioxidativer Systeme wie Ascorbat, α -Tocopherol oder auch der aktiven Zentren der GPx. Ebenso reduzieren TRxR direkt Hydrogenperoxide und nehmen Einfluss auf den zellulären Redox-Status und damit auf weite Bereiche in der Regulation des Zellzyklus, z.B. über redox-sensitive Transkriptionsfaktoren wie NuclearFactor- κ B oder ActivatorProtein1 [Nordberg 2001].

1.3.2.4 Dejodasen

Aktivierung von Schilddrüsenhormonen durch enzymatische Dejodierung des Prohormon L-Thyroxin (T_4) zu 3,5,3'-Trijodo-L-Thyronin (T_3) stellt die biologische Funktion der homodimeren TypI- und TypII-5-Jodothyronin-Dejodasen dar. Das Isoenzym TypIII-5-Dejodase dient dagegen der Inaktivierung von T_4 und T_3 durch sequentielle Dejodierung am Tyrosylring. Während TypI- und TypIII-Dejodasen inzwischen sicher als Selenoproteine identifiziert wurden, bestehen bzgl. der TypII-Dejodase noch immer Zweifel [Köhrle 1999/ Köhrle 2000]. Ihre biologische Bedeutung kommt auch in ihrer präferentiellen Versorgung mit Selen unter relativem Selenmangel zu Ausdruck.

Einige weitere der humanen Selenoproteine konnten identifiziert und teilweise in ihrer Funktion und Regulation charakterisiert werden, aber von zahlreichen liegen noch keine genauen Erkenntnisse vor.

Als Gegenstand dieser Arbeit soll im Weiteren auf das Selenoprotein P (SePP) etwas ausführlicher eingegangen werden.

1.4 Selenoprotein P

1.4.1 Protein

SePP ist ein extrazelluläres Glykoprotein. Es unterscheidet sich von den übrigen bislang bekannten Selenoproteinen durch seinen hohen Gehalt an Selen. Während die in 1.3.2 erläuterten Selenoproteine pro Untereinheit ein Molekül Selen in Form der 21. Aminosäure Selenocystein enthalten, wurde für SePP ein Gehalt von 7,5 +/- 1 Selenocysteinen pro SePP-Molekül aufgezeigt, wobei anhand isolierter cDNA zehn für Selenocystein codierende TGA-Triplets nachgewiesen wurden. Humanes SePP enthält mehr als die Hälfte des gesamten Plasmaselens [Burk 1994/ Hill 1997/ Mostert 1999/ Mostert 2000/ Tujebajeva 2000].

Bislang konnten verschiedene Isoformen des SePP - mit Hauptanteil v.a. Proteine der Molekülmasse von 55 und 61kDa - aus Plasma isoliert und charakterisiert werden [Burk 1999]. Die unterschiedlichen Proteine scheinen u.a. durch vorzeitigen Abbruch der Translation am zweiten oder siebten bis zehnten UGA-Codon der mRNA entstanden zu sein und repräsentieren möglicherweise verschiedene Grade einer N-Glykosylierung.

Als nachweislich sezerniertes Protein besitzt SePP eine Prädominanz an basischen Aminosäuren (17,2%, im Vergleich zu 10,4% saure Aminosäuren) und enthält zwei Abschnitte, die reich an Histidin bzw. einer Abfolge von Lysin und Histidin sind. Diese ermöglichen eine vom lokalen pH-Wert beeinflusste Bindung des SePP an die extrazelluläre Matrix bzw. an Zellmembranen und sind zwischen den einzelnen Spezies hochkonservierte Bereiche, so dass eine funktionelle Bedeutung wie etwa Bindung und damit Detoxifikation von Schwermetallionen daraus abgeleitet wird [Mostert 2000/ Suzuki 1998/ Sasakura 1998]. Immunhistochemisch konnte SePP an Kapillarendothelien in Leber und Gehirn, ebenso auch im Bereich der Glomerula, aber nicht der Nieren-Tubuli lokalisiert werden [Tujebajeva 2000 (10)].

1.4.2 Genetische Struktur des SePP

Der codierende Genomabschnitt für SePP konnte auf Chromosom 5q31 lokalisiert werden und die codierende Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäureabfolge charakterisiert werden [Hill 1993].

Das Gen des SePP setzt sich aus fünf Exons zusammen, von denen das erste zwar transkribiert, aber nicht translatiert wird. Das Startcodon für die Translation wurde erst hinter dem ersten Exon lokalisiert.

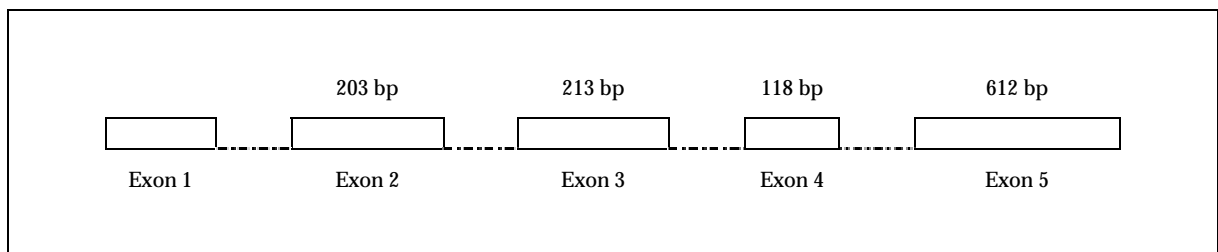


Abbildung 2: Genstruktur des SePP

Außer aus humanem Lebergewebe konnte mRNA für SePP auch aus Gehirn, Niere, Herz, Kolonepithel und weiteren Geweben gewonnen werden. Davon abgeleitete cDNA enthält zehn TGA-Codons, diese entsprechen den UGA-Codons der mRNA und kodieren für den Einbau eines Selenocysteins oder den Abbruch der Translation. Neun dieser TGA-Codons sind im C-terminalen Drittel, vier unter den letzten 15 Basentriplets lokalisiert. Das erste TGA-Codon liegt im zweiten Exon und entspricht der 40. Aminosäure im reifen Protein.

Ebenso konnte aus Ratten- und Mausgewebe, sowie aus Rindern und kürzlich sogar aus Zebrafischen cDNA charakterisiert werden, die sich allerdings in der Zahl der TGA-Codons unterscheiden (Ratte/Maus zehn, Rind zwölf, Zebrafisch 17 TGA-Codons) [Tujebajeva 2000/ Kryukov 2000]. Identisch in allen Geweben weist ein N-

terminal gelegenes Sekretionssignal, das die ersten 19 Aminosäuren umfasst, SePP als ein sezerniertes, extrazelluläres Protein aus [Burk 1994].

Im Anschluss an die codierende Sequenz, im Bereich der sogenannten 3'-untranslatierten Region (3'utr) nimmt die mRNA eine bestimmte räumliche Anordnung ein. Sie bildet zwei sogenannte „stem loops“ („Haarnadelstrukturen“) aus, die bei der Translation in Wechselwirkung mit den UGA-Codons und Ribosomen den Einbau des Selenocysteins ermöglichen (s.o.). Die Ausbildung zweier SECIS-Motive wurde nur bei SePP gefunden. Als funktionelle Bedeutung wird eine höhere Effizienz des Selenocystein-Einbaus angenommen [Burk 1994].

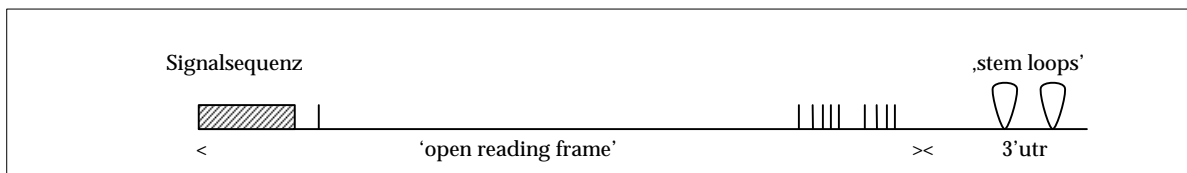


Abbildung 3: mRNA des SePP (| Symbol für UGA bzw. TGA-Codon)

1.4.3 Regulation des SePP

Klonierung des SePP-Promotors und dessen funktionelle Analyse zeigten eine Aktivitätsinhibition durch die inflammatorischen Zytokine Interferon γ (IFN γ), Tumor Nekrosis Factor α (TNF α) und Interleukin 1 β (IL1 β) im Sinne einer negativen „Akut-Phase-Reaktion“ [Dreher 1997]. Dies wurde mittels Luziferase-Reportergen-Konstrukt in der humanen Hepatokarzinomzelllinie HepG2 und in der Kolonkarzinomzelllinien Caco2 nachgewiesen.

Ebenso inhibierend auf die Expression von SePP-mRNA und SePP-Protein wirkt das anti-inflammatorische Zytokin Transforming Growth Factor β (TGF β) [Mostert 1999/ Mostert 2000/ Mostert 2001].

Auch die Selenversorgung nimmt Einfluss auf die Expression des SePP. So konnte epidemiologisch aufgezeigt werden, dass der Plasmagehalt an SePP gut mit dem Selenstatus korreliert und somit als Marker der Selenversorgung dienen kann [Hill 1996].

Jedoch herrscht unter Selenmangel eine gewisse Rangfolge zwischen den verschiedenen Selenoproteinen [Mostert 2000]. So steigt unter Selen-Supplementation die Plasmakonzentration des SePP präferentiell im Vergleich zu C-GPx und P-GPx.

Beim Übergang in Selen-Mangelbedingungen fällt der Plasmaspiegel des SePP in ähnlichem Maße wie die Aktivität der GPx (bei Aktivitätsmessungen können die einzelnen Isoformen der GPx bislang nicht differenziert werden). Allerdings ist die mRNA des SePP weniger verringert als die mRNA der C-GPx. Diese Regulation scheint nicht auf Ebene der Transkription, sondern durch die Stabilität der mRNA zu erfolgen.

Daneben beeinflussen vermutlich zusätzlich zell- und speziesspezifische Regulatoren die SePP-Expression unter Selenmangel [Mostert 2000].

1.4.4 Funktion des SePP

Bedingt durch seine Membranaffinität scheint SePP an Oberflächen von Endothelien seine biologische Funktion auszuüben. Verschiedene Experimente deuten auf eine antioxidative Wirkung des SePP hin. So konnte eine Verminderung der Leberzellnekrose und Lipidperoxidation durch Diquat beobachtet werden, wenn selendefizienten Ratten vor der Diquatgabe Selen verabreicht wurde [Burk 1995/ Atkinson 2001]. Denn eine Schutzwirkung der Selengabe zeigte sich bei schnellem Anstieg des SePP-Enzymgehalts noch bevor ein Aktivitätsanstieg der Glutathionperoxidase eintrat, des ebenso als plasmatisch bekannten Selenoproteins, dem bislang die Prävention gegen oxidativen Stress zugeschrieben wurde [Burk 1994].

Daneben wird eine Barrierenfunktion gegen Schwermetalle diskutiert. Durch äquimolare Komplexbildung mit Quecksilber, Silber oder Cadmium soll SePP eine Aufnahme in die Zelle verhindern [Suzuki 1998/ Sasakura 1998].

Einen Hinweis auf eine funktionelle Bedeutung an Endothelien gibt auch, dass bei Selenmangel gebundenes SePP nicht verringert nachgewiesen wurde, wogegen das freie Plasma-SePP auf 8% gesunken war [Hill 1997].

Ebenso konnte nach Separation des SePP aus humanem Plasma in Kontrollplasma in vitro ein Schutz gegen Peroxynitrit-induzierte Oxidation und Nitration aufgezeigt werden, der auf enzymatische Aktivität des SePP zurückgeführt wurde [Arteel 1998].

In ähnlicher Weise konnte in vitro gezeigt werden, dass SePP im Plasma die Reduktion von Phospholipid-Hydroperoxid, aber nicht von Hydrogenperoxiden katalysiert und somit möglicherweise im Extrazellularraum die Funktion der cytoplasmatischen PH-GPx übernimmt wenngleich auch mit einer 100-fach geringerer Enzymaktivität [Saito 1999].

Ursprünglich wurde auch eine Speicher- oder Transportfunktion für Selen angenommen. Der Nachweis der Expression und Sekretion von SePP sowohl in Leberzellen als auch in verschiedensten Geweben sowie die kovalente Bindung des Selens mit Lokalisation der Selenocysteine im aktiven Zentrum des gefalteten Proteins sprechen gegen eine hauptsächliche Transportfunktion von SePP [Burk 1994].

1.5 Selen und Kolonkarzinogenese

Tierexperimentelle, epidemiologische und klinische Daten konnten eine inverse Korrelation zwischen Selenversorgung bzw. Selenstatus und Genese u.a. gastrointestinaler Tumore aufzeigen.

So konnten verschiedene Studien an selendefizienten F344 Ratten [Reddy 1996/ Feng 1999/ Finley 2000/ Davis 1999/ Davis 2000] nachweisen, dass Supplementation des Futters mit verschiedenen Selenverbindungen die Ausbildung von dysplastischem Kolonepithel – sog. Aberranten Krypten Foci, ACF – nach Exposition gegenüber bekannten Kolonkanzerogenen wie AOM (Azoxymethan), DMABP (2,3-Dimethyl-4-Aminobiphenyl) oder DMH (Dimethylhydrazin) signifikant verringert.

Ebenso konnten epidemiologische Beobachtungen aus verschiedenen Ländern einen Zusammenhang zwischen niedriger Selenversorgung und Krebsmorbidity sowie Krebsmortalität herstellen. So wurden in verschiedenen Fall-Kontroll-Studien u.a. aus Polen [Scieszka 1997], Italien [Caroli 1994] und Kanada [Ghadirian 2000] in Patienten mit Kolonkarzinomen signifikant niedrigere Plasma-Selen-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen gemessen. Dieses Ergebnis wurde von Clark et al. [Clark 1993] und Russo et al. [Russo 1997], die an größeren Kollektiven einen Zusammenhang zwischen Selenstatus und Inzidenz und Anzahl von Kolonadenomen untersuchten, bestätigt.

Großes Interesse an kanzeroprotektiven Eigenschaften des Selens weckte das Ergebnis einer prospektiven, doppelt-blinden, placebo-kontrollierten klinischen Interventionsstudie, die mit primärem Studienziel „Hautkrebsinzidenz“ unter oraler Supplementation von täglich 200µg Selen über 4,5 (+/-2,8) Jahre in der Nachbeobachtung über 6,4 (+/-2) Jahre eine signifikante Verringerung der Gesamtkrebsmortalität um 50% und der Inzidenz von Krebserkrankungen um 37% aufzeigte [Clark 1996]. Insbesondere fand man eine Reduktion der Inzidenz von

Lungen- (-46%), Prostata- (-63%) und Kolonkrebs (-58%), allerdings erst als später definierten „sekundären Endpunkt“, so dass weitere Studien notwendig sind.

1.6 Selenoproteine und Kolonkarzinogenese

Das Epithel des Gastrointestinaltraktes steht permanent unter dem Einfluss von ROS und Radikalen. Hierzu zählen exogen entstandene Radikale, die mit der Nahrung aufgenommen werden oder durch Metabolisierung oder Stoffwechselfvorgänge der kommensalen bakteriellen Besiedlung des Darmes freigesetzt werden. Ebenso entstehen im hochproliferativen und stark stoffwechselaktiven Darmepithel im Rahmen des zellulären oxidativen Stoffwechsels zahlreiche Radikale endogen. Es ist allgemein akzeptiert, dass ROS einen wesentlichen Pathomechanismus der Kolonkarzinogenese darstellen.

Über welchen Mechanismus Selen tumorprotektiv wirkt, ist bislang unbekannt. Aufgrund des Vorkommens von Selen in Form von Selenocystein als Bestandteil in katalytisch aktiven Zentren zahlreicher antioxidativ wirkender Enzyme, könnten Selenoproteine als antioxidative Schutzmechanismen zur Krebsprävention beitragen.

So zeigt z.B. eine Untersuchung, die 12500 schwedische Männer umfasste, eine direkte Korrelation zwischen geringer SePP-Aktivität im Plasma und Krebsmorbidity – ebenso wieder unter Verwendung der gesunden Bevölkerung als Kontrollgruppe – insbesondere bei Krebserkrankungen des respiratorischen Systems und des Verdauungstraktes [Persson-Moschos 2000].

Kürzlich konnte im Gastrointestinaltrakt die Expression der Selenoproteine GI-GPx, P-GPx, TRxR und SePP nachgewiesen werden. Die antioxidative Schutzfunktion ist für die ersten drei genannten anerkannt, für SePP zumindest vermutet und könnte somit eine kausale Verknüpfung zwischen Selenversorgung und gastrointestinaler Tumorgenese ermöglichen [Mörk 1998]. Untersucht wurden Biopsien aus unauffälliger Schleimhaut entlang des Gastrointestinaltraktes. Hier zeigte sich eine

deutliche Expression der GI-GPx im Ösophagus, Magen und Kolon, während im Duodenum und terminalen Ileum keine nachgewiesen wurde. Für SePP wurde außer in Magenbiopsien eine starke Expression in den übrigen Darmabschnitten gefunden [Mörk 1998].

In einer weiteren Studie wurde die Expression von Selenoproteinen in Kolonadenom-Biopsien versus korrespondierender Normalschleimhaut untersucht. Im direkten Vergleich zwischen Adenom und benachbarter unauffälliger Mukosa wurden für TrxR und P-GPx keine Unterschiede der Expression gemessen werden. Jedoch konnten Unterschiede in der mRNA-Expression von GI-GPx und SePP aufgezeigt werden. Während die Expression der GI-GPx in Adenomgewebe, ebenso wie die Enzymaktivität der GI-GPx, um 50 bis 400% gesteigert war, fand sich für SePP ein fast vollständiger Expressionsverlust (erniedrigte mRNA-Level: -70 bis -90%) im Vergleich zu angrenzendem Normalgewebe [Mörk 2000].

1.7 Fragestellung

Bislang fehlen Erklärungen für die verminderte Expression und Enzymaktivität des SePP bei Krebspatienten. Neben einer negativen Regulation der Expression durch inflammatorische Zytokine im Rahmen des Tumorgeschehens könnten genomische Alterationen (z.B. LOH, Mutationen) im SePP-Gen zum Expressionsverlust und dem Ausfall dieses antioxidativen Defensesystems führen. Das Gen für SePP wurde auf Chromosom 5q31 lokalisiert nahe bei dem APC-Genlocus, einem in der Initialphase der Kolonkarzinogenese und somit evtl. schon in Adenomen alterierten Gen. Daten zur SePP-Expression in Kolonkarzinomen liegen bislang jedoch nicht vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Expression von SePP in Gewebeproben von Kolonkarzinomen sowie das Auftreten genetischer Alterationen, insbesondere Mutationen und LOH in DNA-Proben aus Kolonkarzinomgewebe, aus peripheren Leukozyten von gesunden Probanden sowie Kolonkarzinompatienten und an fünf etablierten Kolonkarzinom-Zelllinien untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchte Materialien

2.1.1 Kolonkarzinomgewebe und korrespond. gesunde Kolonschleimhaut

2.1.1.1 Proben zur DNA-Analytik

Untersucht wurden Operationsresektate von Kolonkarzinomgeweben aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg. Insgesamt wurden zur DNA-Analytik 74 Gewebe bearbeitet, jeweils Karzinomgewebe und korrespondierende unauffällige Kolonschleimhaut. 61 dieser Gewebe lagen als Paraffin-eingebettete Blöcke vor, die übrigen 13 Gewebe wurden als Kryogewebeproben zur Verfügung gestellt.

Manifestationsalter		65,4 Jahre (22–90)
Geschlechtsverteilung		28 weiblich / 45 männlich
Lokalisation	Coecum	11
	Colon ascendens	17
	Colon transversum	3
	Colon descendens	10
	Sigma	19
	Rektum (sigmoid. Übergang)	14 (2 von 14)
Histologie/Grading	G 1	1
	G 2	61
	G 3	9 (davon 1: G2-3)
	muzinös	3

Tabelle 1: Klinische Daten der Karzinomgewebe zur DNA-Analytik

2.1.1.2 Proben zur RNA-Analytik

Ebenso korrespondierend wurde RNA von zwölf Kryogewebeproben, elf Kolonkarzinomen und einem Kolonadenom, mittels Northern-Blot-Analyse bzgl. der Expression des SePP bearbeitet. Eine Übersicht über die klinischen Daten liefert Tabelle 2.

Manifestationsalter		71,3 Jahre (56-86)
Geschlechtsverteilung		8 weiblich / 4 männlich
Lokalisation	Coecum	3
	Colon ascendens	3
	Colon descendens	1
	Rektum	5
Histologie/Grading	G 2	8
	G 3	3
	Adenom	1

Tabelle 2: Übersicht über klinische Daten der Kryogewebeproben zur mRNA-Analytik

2.1.2 Blutproben

Weiterhin wurden auch 410 Blutproben untersucht. Davon stammten insgesamt 227 Proben von gesunden Probanden, weitere 193 Blutproben von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom.

2.1.3 Tumorzelllinien: Humane Kolon-Karzinomzelllinien

Zusätzlich wurden humane Kolon-Karzinom-Zelllinien untersucht. Diese wurden von ATCC (American Type Culture Collection) kommerziell erworben. Dabei handelt es sich um Zelllinien, die typische Veränderungen der beiden Modelle der kolorektalen Karzinogenese (vergl. Einleitung) besitzen. Die Zelllinien Colo 205 und Caco 2 repräsentieren den Tumorsuppressorpathway mit chromosomaler Instabilität. Während die Zelllinien HCT 15 und HCT 116 infolge des Ausfalls von Mismatch-Reparaturgenen als Modell des Mutator-Pathways dienen, zeigt die Zelllinie LoVo Eigenschaften beider Entstehungswege.

Chromosomale Instabilität	Mikrosatelliten-Instabilität
Colo 205	HCT 15
Caco 2	HCT 116
LoVo	

Tabelle 3: Tumorzelllinien

2.1.3.1 Colo 205 (ATCC: CCL 222)

Die Zellen wurden aus metastatischem Aszites bei kolorektalem Adenokarzinom eines 70jährigen kaukasischen Mannes isoliert. Sie wachsen locker anheftend oder in Suspension und weisen einen hypertriploiden Chromosomensatz auf.

2.1.3.2 Caco 2 (ATCC: HTB 37)

Diese Zelllinie wurde aus dem primären Kolon-Adenokarzinom eines 72-jährigen Kaukasiers etabliert. Die Zellen zeigen adhärentes Wachstum bei charakteristischer enterozytischer Differenzierung. Sie besitzen einen hypertetraploiden Chromosomensatz bei einer mittleren Chromosomenzahl von 96.

2.1.3.3 HCT 15 (ATCC: CCL 225)

Diese Zellen eines Kolon-Adenokarzinoms zeigen adhärentes Wachstum. Mutationen beider Allele des hMSH6, eines Bestandteils des „mismatch repair“ Systems, ebenso wie eine Mutation im Polymerase δ -Gen im Bereich der „3'-5'proof-reading-exonuclease-domain“ wurden beschrieben [Lettieri 1999]. Bezüglich des Karyotyps ist diese Zelllinie weitestgehend diploid.

2.1.3.4 HCT 116 (ATCC: CCL 247)

Diese Kolonkarzinom-Zelllinie zeigt ebenso epithelialen Charakter und adhärentes Wachstum. Mikrosatelliten-Instabilität ist auf einen Defekt des hMLH1 zurückzuführen.

Der Karyotyp ist weitestgehend diploid. Eine Mutation in Codon 13 des ras-Protoonkogens wird von ATCC beschrieben.

2.1.3.5 LoVo (ATCC: CCL 229)

Aus einer supraklavikular lokalisierten Metastase eines kolorektalen Adenokarzinoms eines 56jährigen kaukasischen Mannes wurde diese Zelllinie etabliert. Sie weist bei hyperdiploidem Karyotyp sowohl chromosomale Instabilität als auch Mikrosatelliten-Instabilität durch Defekt des hMSH2 auf. Das Zellwachstum ist adhärent.

2.2 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂-Anteil bei 37°C geführt. In den 25cm²-Gewebekulturflaschen betrug das Volumen des Kulturmediums 5ml. Alle fünf Zelllinien wurden in Kulturmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Zusatz des Antibiotikums Penstrep kultiviert.

Die Zellen wurden i.d.R. zweimal wöchentlich in einem Verhältnis 1:4 bis 1:6 gesplittet. Dazu wurden sie nach Absaugen des Mediums zweifach mit PBS gewaschen. Durch Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung wurden die adhärenen Zellen vom Flaschenboden gelöst, in ein 50ml-Falcon-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (<1000rpm, 6-7 min) pelletiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt.

Diese Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Airflow-Arbeitsbank.

2.3 Verwendete Materialien, Chemikalien und Geräte

2.3.1 Allgemeines

Aqua ad injectabilia (Ampuva)	Pharmacia
Ethanol 100%	J.T. Baker
Isopropanol	Roth
Xylol	Roth
Chloroform	MERCK
Phenol-Chloroform-Isoamyl (25:24:1)	Roth
MOPS	Sigma
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Sigma
Ethidium-Bromid	Sigma
Agarose ultra PURE™	GIBCO BRL life technologies™
100bp DNA-Ladder	GIBCO BRL life technologies™
RNA-Ladder (0,24-9,5 kb)	GIBCO BRL life technologies™
dNTPs 2,5mM	TaKaRa
MgCl ₂ 25mM	Amersham Life Science
10xPCR reaction buffer	Amersham Life Science
Primer	Amersham Pharmacia Biotech, MWG-Biotech AG
Taq DNA Polymerase	Amersham Life Science
Ampli Taq Gold	Perkin Elmer
Advantage®-GC 2 Polymerase	CLONTECH
TaKaRa Ex Taq™	TaKaRa Biomedicals
Herculase™ Enhanced DNA Polymerase	STATAGENE
Restriktionsenzym MwoI	New England BioLabs
Proteinase K	Promega
Trypsin/EDTA	Seromed, Biochrom
Template Suppression reagent (TSR)	PE Applied Biosystems
Gene Scan™-500 TAMRA™ Size Standard	PE Applied Biosystems
FCS (FBS, fetal calf/bovine serum)	GIBCO BRL life technologies™
HBSS	GIBCO BRL life technologies™
AutoSeq™ G-50 Säulen	Amersham Pharmacia Biotech
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
High Pure PCR-Template Preparation Kit	Roche

TRIzol Reagenz	GIBCO BRL life technologies™
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit	PE Applied Biosystems
Rediprime II-random prime labelling system	Amersham Pharmacia Biotech
Filterpapier Whatman	Hartenstein
Hybond-N Membran	Amersham Pharmacia Biotech
α [32P]dCTP	Hartmann Analytic
Autoradiographiekassette X-OMAT-Film	Kodak
SeP-Sonde	von KFG zur Verfügung gestellt
Kunststoffwaren	Eppendorf, Falcon, Greiner, Sarstedt, Noras

2.3.2 Lösungen und Puffer

TAE	0,04M Tris-Acetat, 1mM EDTA (pH8,0)
TBE	0,09M Tris-Borat, 2mM EDTA (pH8,0)
TE	10mM Tris/HCl, 1mM EDTA (pH8,0)
Natrium-Acetat	3M Natrium-Acetat
SSC (Northern)	3M NaCl, 0,3M Na-Citrat
Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xyleno-Cyanol (FF), 50% Glycerol, 1mM 0,5M-EDTA (pH8), ad 10ml Ampuva
Verdaupuffer (Higuchi)	50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH8,3), 2,5mM MgCl ₂ , 0,1mg/ml Gelatine, 0,45% Nonidet P40, 0,45% Tween 20
PBS (pH7,4) (Northern)	NaCl 4g, KCl 0,1g, Na ₂ HPO ₄ 0,575g, KH ₂ PO ₄ 0,1g ad 500ml Ampuva
Prähybridisierungspuffer (Northern)	5xSSC, 50% mittels Mixed Bed Resin (Sigma) deion. Formamid, 1xDenhardt's Reagenz [pro l: 0,2g Ficoll, 0,2g Polyvinylpyrrolidon, 0,2g BSA Frkt.V)], 20mM NaH ₂ PO ₄ (pH 6,3), 1% SDS, 100µg/ml Hitze-denaturierte Lachs-Sperma-DNA

2.3.3 Geräte

BIO Photometer	Eppendorf
Zentrifugen (Megafuge 1.0, 28RS u.a.)	Heraeus Sepatech GmbH
Heizblock	Techne
Vortexer	Hartenstein
Waage	Kern
GeneAmp PCR-System 2400 (Thermocycler)	Perkin Elmer
Gelkammer LKB GPS 200/400; GNA 100 (TBE)	Pharmacia
Gelkammer POWER PAC 300 (TAE)	BIO RAD
Elektrophoresis Documentation and Analysis System 120	Kodak Digital Science™ 1D
RNA-Geldokumentation	PC-Programm Bio-Capt, KFG
UV-Stratalinker 1800	Statagene, KFG
Hybridisierungsöfen	Biometra OV 5, KFG
Phosphor-Imager	KFG
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Collection 1.0.2	Perkin Elmer
Zellkultur-Brutschrank	Heraeus Sepatech GmbH
Laminar-Airflow-Arbeitsbank (Hood)	Heraeus Sepatech GmbH

2.4 DNA-Extraktion

2.4.1 DNA-Extraktion aus Gewebeproben

2.4.1.1 Mikrodissektion und DNA-Extraktion aus Paraffingewebe

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten war vorgesehen, das maligne Zellmaterial mittels „Laser MicroBeam Microdissection und Laser Pressure Catapulting“ von benignem Normalgewebe zu trennen. Aufgrund der Größe der Tumorzellverbände in den untersuchten Geweben war jedoch in Rücksprache mit den beteiligten Pathologen eine Mikrodissektion mittels Lasertechnologie nicht erforderlich. Zur Mikrodissektion wurden von jedem Gewebeblock acht bis zu fünfzehn Paraffinschnitte von einer Dicke von fünf bis acht μm angefertigt. Ein Referenzschnitt eines jeden Gewebeblockes wurde nach Hämalaun-Eosin-Färbung angefärbt. In Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut Würzburg erfolgte an diesem Schnitt eine Markierung des Tumoranteils mittels Folienstift. Anhand dieses Referenzschnittes wurden dann die übrigen ungefärbten Paraffinschnitte mittels steriler Skalpelle manuell disseziert, wobei malignes und benignes Zellmaterial in verschiedene Probengefäße getrennt wurde.

Zur DNA-Extraktion wurden die Gewebepartikel zunächst entparaffinisiert und anschließend mit Proteinase K verdaut (siehe Protokoll: 2.4.1.3.1).

Um die Reinheit der gewonnenen DNA und damit auch die Effizienz einer spezifischen PCR zu verbessern, wurden noch einige verschiedene Aufreinigungsschritte angefügt.

Nach dem Verdau und nach Abzentrifugation des Gewebedebris erfolgte eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung mit anschließender Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung (siehe 2.4.1.3.2/3). Der DNA-Gehalt der Proben nach Resuspension des Pellets in 60 μl Ampuva wurde mittels photometrischer Messung bestimmt.

	Gewebegröße	DNA-Gehalt
Karzinomgewebe	1,0 cm ² (0,3 – 2,0 cm ²)	162 µg/ml (14 – 725 µg/ml)
Normalgewebe	0,9 cm ² (0,3 – 2,0 cm ²)	74 µg/ml (10 – 318 µg/ml)

Tabelle 4: Durchschnittliche DNA-Konzentrationen

2.4.1.2 DNA-Extraktion aus Kryogewebe

Bei den Kryogeweben wurden solche Proben ausgewählt, deren Karzinomgewebe möglichst nur aus malignen Zellen bestand, so dass auf eine Dissektion verzichtet werden konnte. Die DNA-Isolierung erfolgte mittels „High Pure PCR-Template Preparation Kit“ von ROCHE nach Anleitung des Herstellers.

Diese DNA-Isolierung aus 25-50mg Gewebe folgt dem Prinzip, dass nach der Lyse die zellulären Nukleinsäuren an die Glasfasermembranen der „Filter tubes“ binden und durch Wasch- und Zentrifugationsschritte gereinigt werden. Nach dem Umsetzen des „Filter tube“ auf ein steriles 1,5ml Reaktionsgefäß wurde durch Zugabe eines „Elution Buffers“ die DNA von den Filtern gelöst.

2.4.1.3 Protokolle zur Aufreinigung der DNA

2.4.1.3.1 Entparaffinisierung und DNA-Extraktion der Gewebeproben

- Zugabe von 800-1000µl Xylol zu disseziertem Gewebe, Zentrifugation (10000 rpm, 5 min), Überstand verwerfen
- Zugabe von 800-1000µl Xylol, Zentrifugation (10000 rpm, 5 min), Überstand verwerfen
- Zugabe von 800-1000µl 96%-Ethanol, Zentrifugation (10000 rpm, 5 min), Überstand verwerfen
- Trocknen im Heizblock (55°C, 10 min)
- Zugabe von 100-300µl Higuchi Verdaupuffer (s. 2.3.2),
10 Vol% einer ProteinaseK (20µg/µl)-Stammlösung,
Inkubation über Nacht bei 56°C
- Hitzeinaktivierung der ProteinaseK (95°C, 7 min)
- Zentrifugation (4000 rpm, 2 min)
- Überführen des Überstandes in neues Cup

2.4.1.3.2 Phenol-Chloroform-Aufreinigung der DNA nach Extraktion aus den Geweben

- Zugabe von TE-Puffer zu 100µl des gewonnenen Überstand (Volumen etwa 300µl) des Gewebeverdaus (s. 2.4.1.3.1) bis zu einem Gesamtvolumen von 200µl,
Zugabe von 200µl Phenol-Chloroform (Roth),
Zentrifugation (12000g, 1 min)
- Überführen der Oberphase in ein neues Cup
- Zugabe von 200µl Chloroform,
Zentrifugation (12000g, 1 min)
- Überführen der Oberphase in ein neues Cup
- Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung im Anschluss

2.4.1.3.3 Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung

- Xx µl DNA-Lösung
Zugabe von 0,1 Volumen Na-Acetat 3M,
2,5 Volumen 100%-Ethanol,
Inkubation für 30 min
- Zentrifugation (20°C, 12000 rpm, 15 min), Überstand verwerfen
- Zugabe von 250µl 70%-Ethanol,
Zentrifugation (20°C, 12000 rpm, 15 min), Überstand entfernen, Trocknen
- Resuspension des Pellets in 60µl Ampuva
- Photometrische Bestimmung des DNA-Gehalts (siehe 2.6)

2.4.2 DNA-Extraktion aus Blutzellen

Diese erfolgte unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits nach Angaben des Herstellers.

Hierbei handelt es sich um einen ProteinaseK-Verdau mit anschließender Säulenaufreinigung der DNA.

2.4.3 DNA-Extraktion aus Zellkulturen

Für die DNA-Extraktion aus den Zelllinien wurde – wie auch zur RNA-Extraktion (siehe 2.5) – TRIzol-Reagenz nach Chomczynski verwendet.

- Trypsinierung der adhärenen Zelllinien und Zugabe von 1ml Trizol-Reagenz,
- Zugabe von 200µl Chloroform,
Zentrifugation (4-8°C, 12000g, 15 min)
- Abnehmen der wässrigen Oberphase zur RNA-Extraktion (s.u. 2.5)
- Zugabe von 300µl 100%-Ethanol zur Inter- und Unterphase,
Inkubation (15-30°C, 3 min),
- Zentrifugation (4-8°C, 2000g, 5 min), Überstand entfernen

- › Zugabe von 1ml 0.1M Natriumcitrat-Lösung in 10%-Ethanol, Inkubation (15-30°C, 30 min)
- Zentrifugation (4-8°C, 2000g, 5 min), Überstand entfernen ‹
- Wiederholen von › bis ‹
- Zugabe von 2ml 75%-Ethanol, Inkubation (15-30°C, 15 min)
- Zentrifugation (4-8°C, 2000g, 5 min), Überstand verwerfen, Trocknen (10 min)
- Resuspension in 8mM NaOH
- Zur Entfernung unlöslichen Materials Zentrifugation (12000g, 10 min), Oberphase in ein neues Cup überführen

2.5 RNA-Extraktion

Sowohl von den o.g. Zelllinien als auch von Kryogewebebeobproben wurde RNA isoliert. Hierzu wurde der TRIzol-Kit nach den Angaben des Herstellers angewandt.

- Zelllinie: Trypsinierung der adhärenen Zelllinien, Zugabe von 1ml Trizol-Reagenz
- Kryogewebe: Homogenisierung der Kryogewebebeobproben mittels Potter, Zugabe von 1ml Trizol Reagenz
- Zugabe von 200µl Chloroform, Zentrifugation (4-8°C, 12000g, 15 min)
- Gewinnen der wässrigen Oberphase, Zugabe von 500µl Isopropanol, Inkubation (10 min)
- Zentrifugation (4-8°C, 12000g, 10min), Überstand verwerfen, Zugabe von 1ml 75%-Ethanol
- Zentrifugation (4°C, 7500g, 5 min), Überstand verwerfen, Trocknen
- Resuspension des Pellets in 20µl Ampuva

Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Zur Konzentrationsbestimmung wurde jeweils die optische Dichte der wässrigen Lösungen bei den Wellenlängen 260nm (OD260) und 280nm (OD280) photometrisch bestimmt.

Die Messungen erfolgten in Kunststoffküvetten mittels Eppendorf BIO Photometer. Eine OD260 von 1 entspricht einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA, 40µg/ml einzelsträngiger RNA, oder 20µg/ml einzelsträngige Oligonukleotide im Messvolumen der Küvette. Das Messvolumen sollte mindestens 50µl betragen.

2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction / PCR)

2.7.1 Allgemeines zur PCR

Die PCR ermöglicht eine selektive Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes. Sie erfolgt nach dem Vorbild der DNA-Replikation im Rahmen der Zellteilung.

Das Verfahren der PCR wurde erstmals 1985 von Mullis beschrieben.

Für den verwendeten Thermocycler gelten die in Tabelle 5 angeführten Bedingungen.

		Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung		94 °C	5 Minuten
Für 35-40 Zyklen	Denaturierung	94 °C	45 Sekunden
	Anlagerung der Primer	x ¹ °C	45 Sekunden
	Extension	72 °C	45 Sekunden
Abschlussextension		72 °C	10 Minuten

¹): spezifische Annealing-Temperatur der jeweiligen Primerkombination

Tabelle 5: Zyklischer Ablauf der PCR

Die Proben wurden nach folgendem Pipettierschema (siehe Tabelle 6) vorbereitet.

Reagenz	Menge
DNA-Template	100-200ng
10x PCR-Reaktionspuffer	5µl
Primer sense (5pmol/µl)	1µl
Primer antisense (5pmol/µl)	1µl
dNTPs 2,5mM	2µl
MgCl ₂ 25mM	1µl
Polymerase	1-5U
Aqua	ad 50µl

Tabelle 6: PCR-Ansatz pro Probe

Die Etablierung der PCR-Bedingungen für die einzelnen Primerkombinationen (cf. 2.7.4) erfolgte an aus Blutproben gewonnener DNA. Eine ausreichende Amplifikation aus den verschiedenen Gewebeproben erforderte Modifikationen. Diese beinhalteten neben verschiedenen DNA-Aufreinigungsverfahren (Säulenaufreinigung und/oder Fällung) Anheben oder Senken der Annealing-Temperatur, Steigerung der Zyklenanzahl, Variation des Verhältnisses DNA-Template – MgCl₂ und Verwendung verschiedener DNA-Polymerasen (cf. 2.3.1) in unterschiedlichen Konzentrationen.

2.7.2 Kontrolle der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuremoleküle können aufgrund ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde 0,5xTBE-Puffer mit 1% Agarose aufgekocht, nach etwas Abkühlen Ethidium-Bromid (5mg/ml) zugesetzt (bei 50ml Volumen 1µl) und in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Zum Auftragen wurden 5µl des spezifischen PCR-Produktes in 1,5µl Ladepuffer (cf. 2.3.2) gelöst und in die einzelnen Geltaschen pipettiert. Der Ladepuffer verhindert

das Ausschwemmen der DNA aus den Geltaschen, die zugesetzten Farbstoffe dienen zur Orientierung über die Lauflänge. Bei einer eingestellten Spannung von 100V betrug die Laufzeit 25 Minuten.

Die Größe der aufgetragenen PCR-Produkte kann anhand der als Längenstandard parallel mitlaufenden 100bp-DNA-Basenleiter bestimmt werden.

Der Zusatz des interkalierenden Farbstoffes Ethidium-Bromid bewirkt eine Sichtbarmachung des PCR-Produkt unter UV-Licht. Die Dokumentation der Gelbilder erfolgte mittels digitaler KODAK-Fotodokumentation.

2.7.3 PCR-Produkt-Aufreinigung

Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll der Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung (cf. 2.4.1.3.3). In Einzelfällen wurde eine Säulenaufreinigung mit AutoSeq™ G-50 (Amersham) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.7.4 Etablierung der Primer und PCR-Bedingungen zur Amplifikation der Exons

Zur Amplifikation der Exons 2 mit 5 des SePP-Gens wurden zunächst Primer verwendet, die in den jeweils angrenzenden Introns lokalisiert waren. Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 208 bp bis 370 bp. Im Verlauf der Arbeiten zeigte sich jedoch, dass sich aus den DNA-Proben der Paraffingewebe – wie auch schon häufig von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen – PCR-Produkte bis max. 250 bp amplifizieren ließen, so dass zur kompletten Sequenzierung der kodierenden Sequenz des SePP-Gens die Exons 2 mit 5 in überlappenden Fragmenten amplifiziert werden mussten. Die gesamte Liste der letztendlich verwendeten Primerpaare ist in Tabelle 7 dargestellt.

Die Primer wurden mit einem Anhang der Länge von 18 Basen, bezeichnet als M13 an sense-Primern bzw. M13 reverse an antisense-Primern jeweils am 5'-Ende modifiziert.

M13: 5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'

M13 reverse: 5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3'

Diese Basenabfolge lagert sich nicht an die spezifische Gen-Sequenz an und wurde dann bei der Sequenz-PCR eingesetzt mit dem Vorteil, für alle Exonabschnitte einen einheitlichen Sequenzierungsprimer benutzen zu können.

Für jede verwendete Primerkombination wurde in Etablierungsversuchen die optimale Temperatur zur sequenzspezifischen Anlagerung ermittelt (cf. Tabelle 7). Die sequenzunspezifischen Anhänge sind in der Tabelle 7 nicht aufgeführt.

Bezeichnung	Position	Spezifische Sequenz	A.-Temp.
SeP Ex2a	Intron 1: -44 bis -25	5'-TGA AGA AGA GTG ACA GGT TT-3'	60°C
SeP Ex2b	Intron 2: +29 bis +48	5'-AAT AGC CTT CCC CTT AAG GT-3'	
SeP Ex2.1b	Exon 2: 98 bis 118	5'-CTT GAT CTC TTA TGC TCC AGG-3'	58°C
SeP Ex2.2a	Exon 2: 69 bis 88	5'-CCA AAG CTC CTT ATG TAA GC-3'	58°C
SeP Ex3a	Intron 2: -79 bis -57	5'-AAT TAA GGA AGA GGG AGA AAA AC-3'	54°C
SeP Ex3b	Intron 3: +53 bis +76	5'-GTG TGA TGG GAA GTA AAT AAA TAG-3'	
SeP Ex3.1b	Exon 3: 131 bis 155	5'-GGT TTT CTT CTT GTT GAT AAA CAG G-3'	56°C
SeP Ex3.2a	Exon 3: 101 bis 125	5'-CAT CTT AAG AAT AAG GTT TCA GAG C-3'	54°C
SeP Ex4a	Intron 3: -62 bis -46	5'-ATT TGA GTA GGA TCG TA-3'	46°C
SeP Ex4b	Intron 4: +11 bis +28	5'-TCC CCA GAA AAA TAA TTC-3'	
SeP Ex5.1a	Intron 4: -22 bis -3	5'-GTG ATT TAT AAA TTT GTT CC-3'	55°C
SeP Ex5.1b	Exon 5: 299 bis 318	5'-TTG ATT TAT ACA TCT CTT TC-3'	
SeP Ex5.2a	Exon 5: 264 bis 283	5'-TGA AGA TTT ACA AGA TTT AC-3'	55°C
SeP Ex5.2b	Intron 5: +3 bis +22	5'-GAG TAT GTC CTA TTT TAA AT-3'	
SeP Ex 5.1c	Exon 5: 237 bis 256	5'-GCA TAT CTC GGT TCT CTG GG-3'	58°C
SeP Ex5b f	Exon 5: 211 bis 228	5'-CAC AAG GGT CAG CAT AGG-3'	60°C
SeP Ex5b r	Exon 5: 409 bis 425	5'-CAC TGT CAG GTG ATT GC-3'	
SeP Ex5.3a	Exon 5: 368 bis 387	5'-GCT GCC ATT GTC GAC ATC TG-3'	48°C

Tabelle 7: Primer für SePP-Exons 2 bis 5

Zur Verdeutlichung der Fragmentierung der codierenden Abschnitt und Lokalisation der Primer dient nachfolgendes Schema.

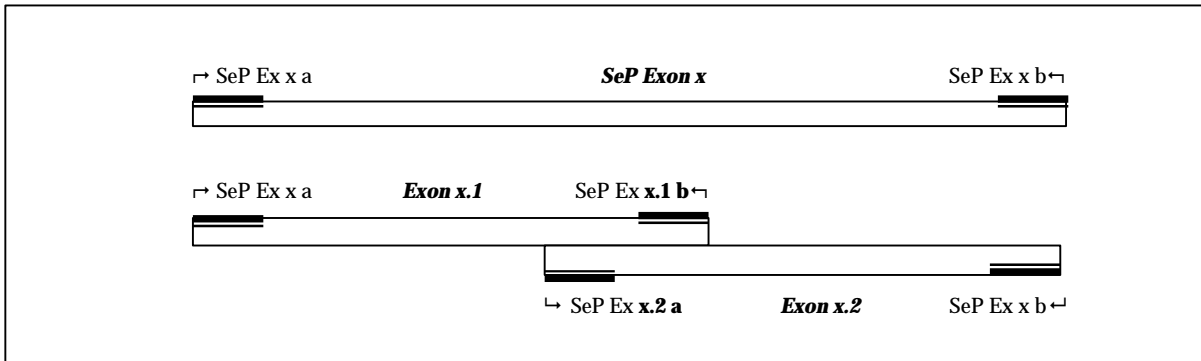


Abbildung 4: Schema zur Fragmentierung der Exons und Primerlokalisierung

	Primer		PCR-Produkt
	sense	antisense	
Exon 2	SeP Ex2a	SeP Ex2b	295 bp
Exon 3	SeP Ex3a	SeP Ex3b	368 bp
Exon 4	SeP Ex4a	SeP Ex4b	208 bp

2-geteilt	Primer		PCR-Produkt
	sense	antisense	
Exon 2.1	SeP Ex2a	SeP Ex2.1b	162 bp
Exon 2.2	SeP Ex2.2a	SeP Ex2b	183 bp
Exon 3.1	SeP Ex3a	SeP Ex3.1b	234 bp
Exon 3.2	SeP Ex3.2a	SeP Ex3b	189 bp
Exon 5.1	SeP Ex5.1a	SeP Ex5.1b	340 bp
Exon 5.2	SeP Ex5.2a	SeP Ex5.2b	370 bp

3-geteilt	Primer		PCR-Produkt
	sense	antisense	
Exon 5a	SeP Ex5.1a	SeP Ex5.1c	278bp
Exon 5b	SeP Ex5bf	SeP Ex5br	214 bp
Exon 5c	SeP Ex5.3a	SeP Ex5.2b	266 bp

Tabellen 8a bis c: Primerkombinationen – Zuordnung zu einzelnen SePP-Exon-Fragmenten

2.7.5 Sequenzierung

2.7.5.1 Sequenz-PCR

BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit wurde für die Sequenz-PCR verwendet. Nur noch Zugabe des spezifischen Sequenzierungsprimers (sense oder antisense Primer) und des PCR-Produktes nach Aufreinigung zur BigDye-Reagenz ist notwendig.

Das Prinzip der Sequenz-PCR beruht darauf, dass im Reaktionsmix neben 2'-Desoxynukleotiden (dNTPs) auch 2'3'-Dideoxynukleotide (ddNTPs) mit Farbmarkierung enthalten sind. Letztgenannte werden nach dem Zufallsprinzip kompetitiv gegenüber den dNTPs eingebaut und führen so zu einem kontrollierten Abbruch der Polymerisation.

Für die Sequenz-PCR wurde das Produkt der spezifischen PCR mittels Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung gereinigt (s. 2.4.1.3.3), das Pellet in 20µl Aqua gelöst und wie folgt (Tabelle 9) vorbereitet.

Reagenz	Menge
PCR-Produkt	5-10µl
BigDye™	4-6µl
Primer (5pmol/µl)	1µl
Aqua	ad 20µl

Tabelle 9: Probenansatz für Sequenz-PCR

Die Bedingungen der Sequenz-PCR zeigt Tabelle 10.

		Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung		94°C	5 min
30-40 Zyklen	Denaturierung	94°C	1 min
	Anlagerung	50°C	1 min
	Extension	60°C	3 min
Abschlussextension		60°C	10 min

Tabelle 10: Bedingungen für Sequenz-PCR

2.7.5.2 Aufreinigung des Sequenz-PCR-Produktes

Die Produkte der Sequenz-PCR wurden nach dem Protokoll der Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung (s. 2.4.1.3.3) von überschüssigen Sequenz-PCR-Reagentien gereinigt.

Zur Sequenzierung wurde das getrocknete Pellet direkt in 12-16µl Template Suppression Reagent (TSR) gelöst, denaturiert (94°C, 2-3 min) und bis zur weiteren Bearbeitung sofort auf Eis (>2 min) gekühlt.

2.7.5.3 Automatische Sequenzierung

Die Analyse erfolgte mit ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Version 1.0.2., Perkin Elmer, nach dem Prinzip, dass die einzelnen, in der Sequenz-PCR gewonnenen DNA-Fragmente nach ihrer unterschiedlichen Länge mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Durch die Farbmarkierung der Dideoxynukleotide kann die jeweils letzte Base der Fragmente durch Laserdetektion und Fluoreszenzanalyse und damit die Basenabfolge des untersuchten DNA-Abschnittes durch Auswertung der Rohdaten unter Verwendung der Software Sequencing Analysis® 3.0, Perkin Elmer, bestimmt werden.

2.7.5.4 Auswertung der Sequenzierung

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogramm DNasis for Windows: SeqManII mit der bekannten SePP-Sequenz verglichen.

ansatz ist in Tabelle 11 dargestellt. Die Restriktion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Reagenz	Menge
10xNEBuffer	5µl
Enzym MwoI	1µl
PCR-Produkt	20µl
H ₂ O	ad 50µl

Tabelle 11: Ansatz pro Probe

Die Auswertung der Restriktion erfolgte mittels einer Agarose-Gelelektrophorese. Das Ergebnis in Abhängigkeit vom Vorliegen des Polymorphismus oder der Normalsequenz ist in der Abbildung 5 dargestellt.

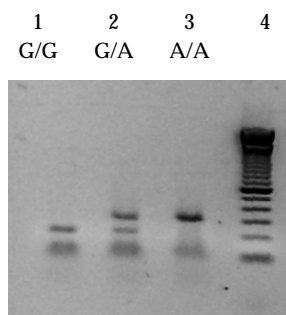


Abbildung 5: RFLP-Analyse:

Probe 1: homozygot G: beide Allele weist die MwoI-Schnittstelle auf,
Probe 2: heterozygot G/A: nur ein Allel weist die MwoI-Schnittstelle auf,
Probe 3: homozygot A: keine Schnittstelle,
Bahn 4: Längenstandard

Im Rahmen der Etablierung der MwoI-Restriktion wurde das Ergebnis der RFLP-Analyse durch Sequenzierung bestätigt.

Zur Frage der Häufigkeit des Polymorphismus erfolgte dann die RFLP-Analyse an 227 Blutproben von gesunden Probanden. Zum Nachweis einer möglichen Assoziation des Polymorphismus mit dem Auftreten kolorektaler Karzinome wurden zusätzlich 193 Blutproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom ebenfalls mit der RFLP-Analyse untersucht.

2.9 Mikrosatelliten-Analyse

Mittels Mikrosatelliteninstabilitätsanalyse können unterschiedliche genetische Alterationen untersucht werden. Liegt ein Mikrosatellitenmarker bei einer Person heterozygot vor, so wird dieser Marker bei dieser Person als informativ bezeichnet und kann zur Frage des Auftretens eines „Loss of Heterozygosity“ (LOH) verwendet werden. Die Analyse zeigt dann im Tumorgewebe in einem der beiden Allele einen Verlust von mindestens 60%. Zusätzlich kann durch eine Mikrosatellitenanalyse eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden. Hier zeigt sich im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe das Auftreten von zusätzlichen PCR-Produkten zu den im Normalgewebe vorhandenen Allelen.

Zur Frage eines LOH's des SePP-Genes erfolgte eine Analyse der Mikrosatelliten-Marker D5S634 und D5S660, die in der Nähe des SePP-Genes auf Chromosom 5q31 lokalisiert sind.

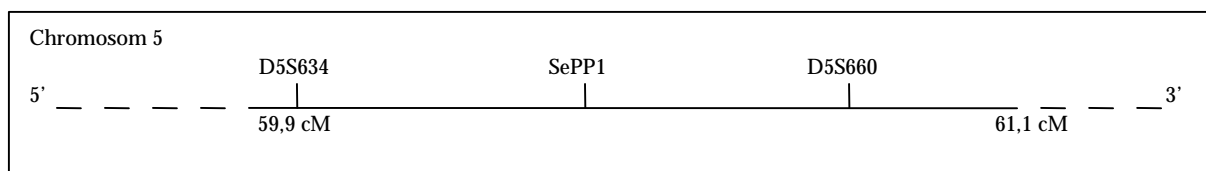


Abbildung 6: Lage der untersuchten Mikrosatelliten zu SePP nach www.ncbi.nih.gov/genemap99

Zunächst wurden die Mikrosatelliten mittels sequenzspezifischen Primern (cf. Tabelle 12) amplifiziert. Die sense-Primer waren am 5'-Ende mit einem Farbstoff (ABI-FAM) markiert.

Bezeichnung	Spezifische Sequenz	PCR-Produkt	A.-Temp.
D5S634 sense	5'-AGA GGC AGT GAT TAT AGG AGC-3'	161 bp	60°C
D5S634 antisense	5'-GAA CCT ATT GTT TAG TGG GCC-3'		
D5S660 sense	5'-TGA GAA CAG ACC AAT ATG GG-3'	147 bp	59°C
D5S660 antisense	5'-TAG GTA GCC TAT ATA TGT GGG G-3'		

Tabelle 12: Primer für Mikrosatellitenanalyse

Die Amplifikate wurden mittels Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung (s. 2.4.1.3.3) aufgereinigt. Das Pellet wurde in 12µl TSR resuspendiert und 0,5µl eines internen Größenstandards (ABI-TAMRA 350) zugemischt. Nach Denaturierung (94°C, 3min) und Abkühlen (4°C, 5min) erfolgte eine vollautomatische Analyse mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer und eine automatische Größenberechnung der Mikrosatelliten-Amplifikate mittels Gene Scan Analysis® 2.1.

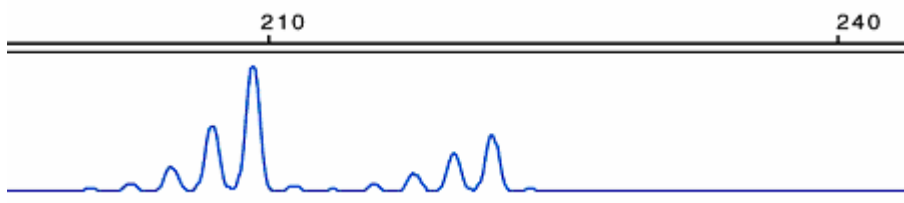


Abbildung 7: Mikrosatellitenmarker D5S634 heterozygot

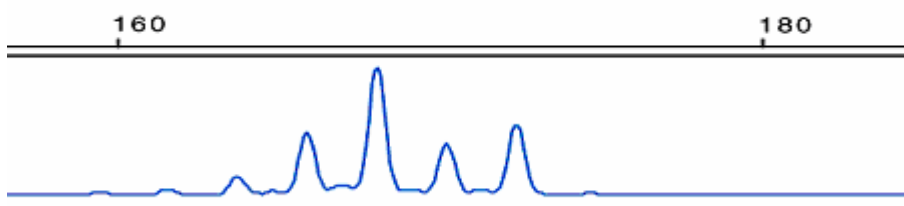


Abbildung 8: Mikrosatellitenmarker D5S660 heterozygot

2.10 Northern-Blot

Dieses Verfahren dient dem Nachweis von gewebsspezifischer RNA-Fraktionen aufgrund von Sequenzhomologien mittels spezifischer Sonden.

RNA wird unter denaturierenden Bedingungen, um inter- und intramolekulare Basenpaarungen zu lösen, elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt. Als denaturierendes Reagenz wurde Formaldehyd verwendet.

- Vorwässern der Gelkammer und -kamm in 0,5N NaOH (20 min), abspülen, trocknen
- Gel: nach Tabelle 13

Reagenz	Menge
Ampuva	132 ml
Agarose	1,8g
37%Formaldehyd	30ml
Ethidium Bromid (500µg/ml)	50µl

Tabelle 13: Gelrezept für Northern-Analyse

- Laufpuffer: 1xMOPS
- Bedingungen: Spannung: 20V, Laufzeit: über Nacht
- Probenvorbereitung: nach Tabelle 14

Reagenz	Menge
RNA	20µg
Formamid dejonisiert	7µl
37%Formaldehyd	2,8µl
10xMOPS	2,1µl
Ladepuffer	2µl
Ampuva	ad 30µl

Tabelle 14: Probenvorbereitung für Northern-Analytik

- Wässern des Gels nach der Gelelektrophorese in Ampuvabad (30 min)
- Gelphotographie
- Blotten: Transfer der RNA durch kapillar wandernden 10xSSC-Puffer auf Hybond-N Membran (Raumtemperatur, 24h)
- Trocknen der Membran, Fixierung der RNA mittels UV-Strahlung (Stratalinker®)
- Lagerung der Membran bis zur Hybridisierung in Frischhaltefolie verpackt bei -20°C

2.11 Blot-Hybridisierung

- Prähybridisierung der Hybond-N Membran (65°C , 30 min) zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen
- Zugabe der denaturierten radioaktiv markierten SeP-Sonde (106cpm/ml Hybridisierungspuffer RapidHyb Buffer)
- Hybridisierung (65°C , über Nacht)

Waschen der Membran zur Entfernung überschüssiger Radioaktivität mit SSC und 1%SDS (65°C), dabei stufenweise Absenkung des Salzgehaltes (2xSSC \rightarrow 1xSSC \rightarrow 0,5xSSC) und Temperaturerhöhung der Waschlösung um jeweils 2°C
- Auswertung mittels Phosphor-Imager oder Exposition auf Autoradiographie-kassette

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Gewebeproben

3.1.1 Daten der zur RNA-Analyse verwendeten Proben

Von zwölf Personen wurde korrespondierend pathologisch veränderte und normale Kolonschleimhaut bzgl. der mRNA-Expression des SePP mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Eine Übersicht der klinischen und histologischen Daten gibt Tabelle 15.

Nr.	p/k ¹	m/w ²	Lj. ³	Histologie	Staging	Grading	Lokalisation
K1	k	m	59	AdenoCa	pT2N0M0	G 2	Rectum
K2	k	w	71	AdenoCa, muzinös	pT3N0M0	G 3	Coecum
K3	k	m	62	AdenoCa	pT3N0M0	G 2	Colon asc.
K4	k	w	74	AdenoCa, muzinös	PT2N0M0	G 3	Coecum
K5	k	m	74	AdenoCa	pT4N0M0	G 3	Colon desc.
K6	k	m	65	AdenoCa	pT3N2M0	G 2	Rectum
K7	k	w	81	AdenoCa	pT3N0M0	G 2	Colon asc.
K8	k	w	81	AdenoCa, tw. muzinös	pT3N0M0	G 2	Rectum
K9	k	w	86	AdenoCa, tw. muzinös	pT2N0M0	G 2	Coecum
K10	k	w	79	AdenoCa	pT3N2M1	G 2	Colon asc.
K11	k	w	56	Adenom, tub.-villös	-	-	Rectum
K12	k	w	68	AdenoCa	pT2N2M0	G 2	Rectum

Tabelle 15: Klinische Daten der zur RNA-Analytik verwendeten Gewebeproben

p/k ¹: p= Paraffingewebe, k= Kryogewebe

m/w ²: Geschlecht: m= männlich, w= weiblich

Lj. ³: Lj.= Manifestationsalter

3.1.2 Daten der zur DNA-Analyse verwendeten Proben

Zur DNA-Analytik wurden insgesamt Gewebeproben von 74 Kolonkarzinompatienten verwendet. Davon lagen 61 als Paraffin- und 13 als Kryogewebeproben vor. Eine Übersicht über die klinischen und histologischen Daten der untersuchten Gewebeproben geben nachfolgende Tabellen 16 und 17.

Nr.	p/k ¹	m/w ²	Lj. ³	Histologie	Staging	Grading	Lokalisation
p 1	p	w	62	AdenoCa	pT2N0	G 2	Colon trans.
p 2	p	w	55	AdenoCa, ulzeriert	pT4N3	G 2	Sigma
p 3	p	m	74	AdenoCa	pT2N0	G 2	Colon asc.
p 4	p	m	34	AdenoCa	pT4N0	G 2	Colon trans.
p 5	p	w	66	AdenoCa	pT4N1	G 2	Sigma
p 6	p	m	56	AdenoCa	pT3N0M1	G 2	Colon desc.
p 7	p	m	66	AdenoCa	pT3N0	G 2	Colon asc.
p 8	p	w	60	AdenoCa	Rezidiv	G 3	Rectum
p 9	p	m	73	AdenoCa	pT2N0	G 2	Colon asc.
p 10	p	w	45	AdenoCa, ulzeriert	pT3N0	G 2	Colon desc.
p 11	p	m	65	AdenoCa, ulzeriert	pT3N1	G 2	Colon asc.
p 12	p	m	66	AdenoCa, muzinös	pT4N0	muzinös	Sigma
p 13	p	m	63	AdenoCa, ulzeriert	pT4N0	G 2	Rectosigm. Ü.
p 14	p	m	70	AdenoCa	pT4N2	G 2	Sigma
p 15	p	m	22	AdenoCa, muzinös	pT4N3	muzinös	Colon asc.
p 16	p	m	74	AdenoCa	pT3N1	G 2	Sigma
p 17	p	m	53	AdenoCa	pT3N0	G 2	Colon asc.
p 18	p	w	41	AdenoCa	pT3N3M1	G 2	Coecum
p 19	p	m	70	AdenoCa	pT1N0	G 2	Colon desc.
p 20	p	w	46	AdenoCa	pT3bN3M0	G 2	Coecum
p 21	p	m	71	AdenoCa	pT4N1M1	G 2	Coecum
p 22	p	m	64	AdenoCa	pT3N3	G 2	Sigma
p 23	p	w	75	AdenoCa, muzinös	pT3N2	G 3	Coecum
p 24	p	m	75	AdenoCa	pT2N1	G 2	Sigma
p 25	p	m	74	AdenoCa	pT2N0	G 2	Sigma
p 26	p	m	86	AdenoCa	pT4N1	G 3	Rectosigm. Ü.

Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt

Nr.	p/k ¹	m/w ²	Lj. ³	Histologie	Staging	Grading	Lokalisation
p 27	p	w	53	AdenoCa, ulzeriert	pT2N1	G 2	Sigma
p 28	p	w	88	AdenoCa, muzinös	pT3N0	G 3	Colon asc.
p 29	p	m	78	AdenoCa, ulzeriert	pT1N0	G 3	Sigma
p 30	p	w	90	AdenoCa	pT1N0	G 2	Coecum
p 31	p	m	65	AdenoCa, muzinös	pT3N0	G 2	Colon asc.
p 32	p	m	77	AdenoCa, ulzeriert	pT3N2	G 2	Sigma
p 33	p	m	58	AdenoCa, muzinös	pT2N0	G 2	Colon asc.
p 34	p	m	68	AdenoCa, ulzeriert	pT3N1	G 2	Rectum
p 35	p	m	79	AdenoCa	pT1Nx	G 2	Sigma
p 36	p	m	69	AdenoCa	pT3N1	G 2	Colon desc.
p 37	p	m	64	AdenoCa	pT3N1	G 2	Rectum
p 38	p	m	77	AdenoCa	pT3N0	G 2	Colon asc.
p 39	p	m	51	AdenoCa, muzinös	pT3N0	muzinös	Sigma
p 40	p	w	76	AdenoCa, tubulös	pT1N0	G 1	Colon asc.
p 41	p	w	79	AdenoCa	pT3N0	G 2	Colon asc.
p 42	p	m	73	AdenoCa, ulzeriert	pT4N2M1	G 2	Colon desc.
p 43	p	w	55	AdenoCa	pT1N0	G 2	Sigma
p 44	p	m	69	AdenoCa, ulzeriert	pT2N0	G 2	Rectum
p 45	p	m	57	AdenoCa, ulzeriert	pT4N2	G 2	Rectum
p 46	p	w	90	AdenoCa	pT1N0	G 2	Sigma
p 47	p	w	77	AdenoCa	pT3N0	G 2	Coecum
p 48	p	w	60	AdenoCa	pT3N0	G 2	Coecum
p 49	p	w	89	AdenoCa	pT3N0M1	G 2	Colon asc.
p 51	p	w	69	AdenoCa	pT3N0	G 2	Colon desc.
p 52	p	m	64	AdenoCa, ulzeriert	pT3N2	G 2	Coecum
p 53	p	w	68	AdenoCa	pT2N0	G 2	Sigma
p 54	p	m	85	AdenoCa	pT3N2	G 2	Sigma
p 55	p	w	74	AdenoCa, ulzeriert	pT3N1	G 2	Colon asc.
p 56	p	m	75	AdenoCa, ulzeriert	pT3N0	G 2-3	Rectum
p 57	p	m	68	AdenoCa, ulzeriert	pT3N1	G 2	Rectum
p 58	p	m	60	AdenoCa	pT2N1	G 2	Rectum
p 59	p	m	38	AdenoCa	pT4N1	G 3	Coecum
p 60	p	m	46	AdenoCa	pT4N0	G 2	Colon desc.
p 61	p	m	36	AdenoCa, tw. muzinös	pT4N0	G 2	Colon desc.
p 62	p	m	51	AdenoCa	pT2N0	G 2	Colon asc.

Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt

Nr.	p/k ¹	m/w ²	Lj. ³	Histologie	Staging	Grading	Lokalisation
K2	k	w	79	AdenoCa	pT3N2M1	G 2	Colon asc.
K4	k	w	73	AdenoCa, ulzeriert	pT3N0	G 2	Coecum
K6	k	w	59	AdenoCa, ulzeriert	pT3N0	G 2	Sigma
K8	k	m	59	AdenoCa	pT2N0	G 2	Sigma
K10	k	m	75	AdenoCa, ulzeriert	pT3N0	G 2	Rectum
K12	k	m	60	AdenoCa, ulzeriert	pT3N2	G 2	Rectum
K14	k	w	87	AdenoCa, ulzeriert	pT2N0	G 2	Coecum
K16	k	w	48	AdenoCa	pT3N0	G 3	Rectum
k1c	k	m	62	AdenoCa (tub.-vill.)	pT2N0	G 2	Rectum
k2c	k	w	74	AdenoCa	pT3N1	G 3	Colon desc.
k3c	k	m	65	AdenoCa, ulzeriert	pT4N1	G 2	Colon trans.
k4c	k	m	62	AdenoCa, ulzeriert	pT3N0	G 2	Colon asc.
k5c	k	w	52	AdenoCa, ulzeriert	pT3N2	G 2	Colon desc.

Tabelle 16: Klinische und histologische Angaben der zur DNA-Analytik verwendeten Gewebeproben
p/k ¹: p= Paraffingewebe, k= Kryogewebe
m/w ²: Geschlecht: m= männlich, w= weiblich
Lj. ³: Manifestationsalter

Einen zusammenfassenden Überblick über die klinischen Daten der untersuchten Gewebe gibt Tabelle 17.

Manifestationsalter	65,4 Jahre (22–90)	
Geschlechtsverteilung	28 weiblich / 45 männlich	
Lokalisation	Coecum	11
	Colon ascendens	17
	Colon transversum	3
	Colon descendens	10
	Sigma	19
	Rektum (sigmoid. Übergang)	14 (2 von 14)
Histologie/Grading	G 1	1
	G 2	61
	G 3	9 (davon 1: G2-3)
	muzinös	3

Tabelle 17: Übersicht der zur DNA-Analytik verwendeten Gewebeproben

3.2 RNA-Analytik mittels Northern-Blot

3.2.1 SePP-mRNA-Expression in den untersuchten fünf Kolonkarzinom-Zelllinien

Die Expression des SePP wurde mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Als Referenz wurde die konstitutionell exprimierte Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. In den Zelllinien HCT15 und CaCo konnte eine starke Expression des SePP aufgezeigt werden, HCT116 zeigte ein nur schwaches mRNA-Signal, während in den Zelllinien LoVo und Colo205 kein mRNA-Signal detektiert werden konnte.

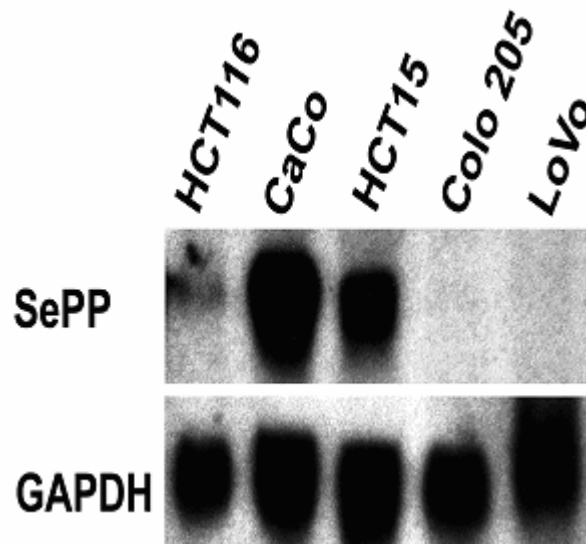


Abbildung 9: Northern-Blot der untersuchten Zelllinien: Expression von SePP-mRNA im Vergleich zur konstitutionell exprimierten GAPDH-mRNA

3.2.2 SePP-mRNA-Expression in den untersuchten Tumorgewebebeobachten

Im Vergleich zur jeweiligen SePP-mRNA-Expression im Normalgewebe war die Expression in allen Tumorgeweben, in den elf Karzinomen wie auch im Adenom, deutlich vermindert. Beispielhaft an 5 Proben zeigt dies das nachfolgende Gelbild (Abbildung 10).

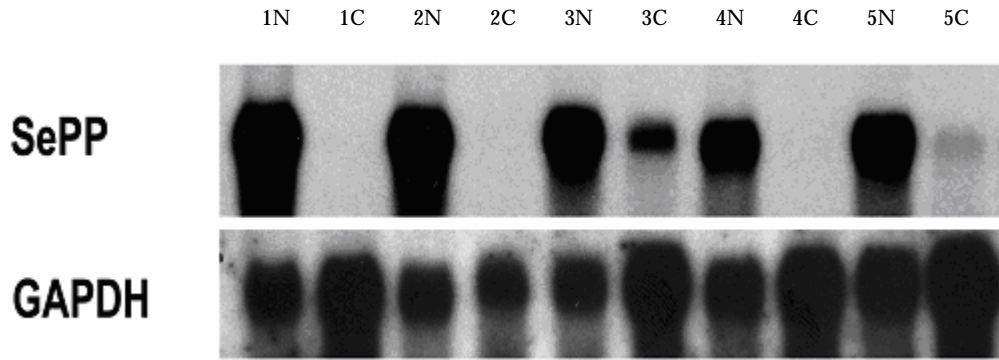


Abbildung 10: Northern-Blot repräsentativer Gewebeproben: Vergleich SePP-mRNA-Expression in Kolonkarzinomgewebe (C) vs. Normalgewebe (N)

In drei der elf Karzinomgewebe lies sich keine SePP-mRNA nachweisen.

Die densitometrische Auswertung der jeweiligen verminderten Expression im Tumorgewebe in Relation zur Expression im Normalgewebe zeigt Abbildung 11.

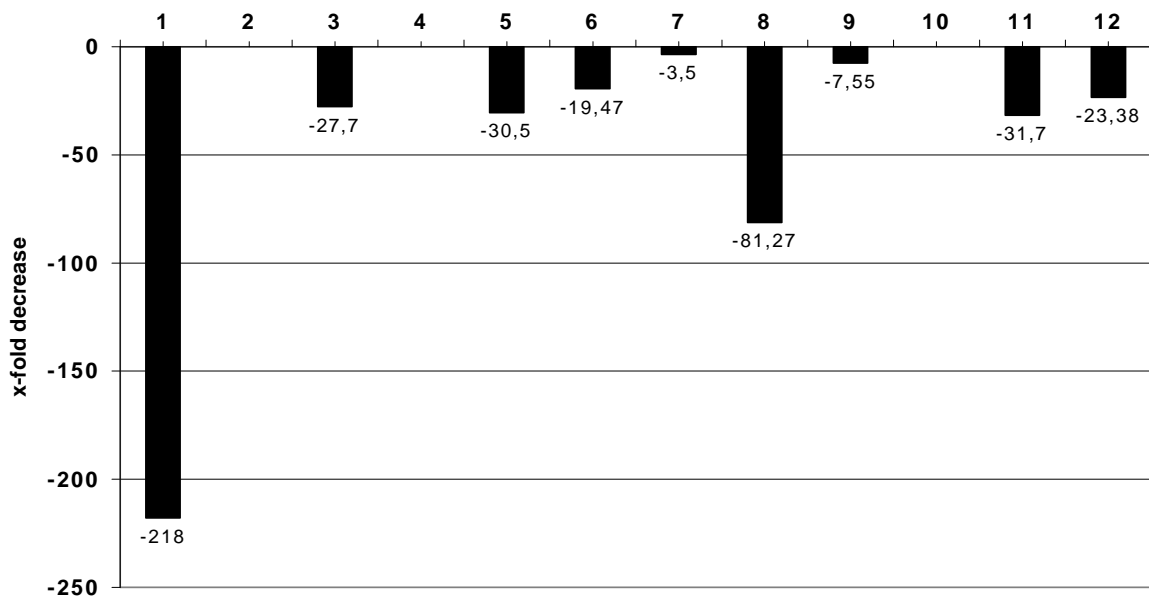


Abbildung 11: Densitometrische Auswertung der SePP-mRNA-Expression in Kolontumorgewebe in Relation zur jeweiligen normalen Kolonschleimhaut. Veranschaulicht wird die intraindividuale Abweichung durch die Säulen. In Karzinomgewebe 2, 4 und 10 war eine SePP-mRNA- Expression nicht nachweisbar. Die Gewebeprobe 11 ist Adenomgewebe, die übrigen Karzinomgewebe.

3.3 Ergebnisse der Sequenzierung der SePP-Exons

3.3.1 Sequenzanalysen an Kolonkarzinomgeweben

In 55 von 74 (61 Paraffin- und 13 Kryogewebebeobungen) Kolonkarzinomen konnten alle kodierenden Abschnitte des SePP-Genes amplifiziert und sequenziert werden. In den übrigen Tumoren war aufgrund von DNA-Degradation - besonders der Paraffingewebebeobungen - eine Sequenzierung aller Abschnitte des SePP-Genes technisch nicht möglich, jedoch konnten auch in diesen Tumoren einzelne Exons untersucht werden. Eine Übersicht über die Anzahl der verwertbar sequenzierten Abschnitte gibt die nachfolgende Tabelle 18.

Exon 2		Exon 3		Exon 4	Exon 5	
im ganzen	36	im ganzen	17		5 a	64
2.1	42	3.1	48		5 b	72
2.2	40	3.2	47		5 c	62
komplett	68	komplett	57	65	komplett	62
Komplette SePP – Sequenz bei 55 der untersuchten 74 Gewebebeobungen						

Tabelle 18: Anzahl der Kolonkarzinome, in denen die jeweiligen Genabschnitte erfolgreich sequenziert werden konnten

3.3.2 Sequenzanalysen an Kolonkarzinom-Zelllinien

Von allen untersuchten Zelllinien gelangen die Amplifikation aller Exonabschnitte des SePP-Genes sowie deren Sequenzierung problemlos.

3.3.3 In Kolonkarzinomen treten keine Mutationen des SePP-Genes auf.

Bei den durchgeführten Sequenzanalysen konnten keine Mutationen in den codierenden Abschnitten des SePP-Genes und angrenzenden Bereichen festgestellt werden.

Interessanterweise wurde die von uns beobachtete Basenabfolge des SePP kürzlich veröffentlicht (XM_011306.4/5/6; BC005244, BC015875 und BC030009 Similar to SeP, plasma, 1), jedoch ohne auf diese Variante hinzuweisen.

3.3.5 Identifikation des Polymorphismus Ala215Thr in Exon 5 des SePP

3.3.5.1 Charakterisierung des Polymorphismus Ala215Thr

Mittels Sequenzierung wurde ein bislang unbekannter Polymorphismus im Exon 5 in Codon 215 des SePP identifiziert.

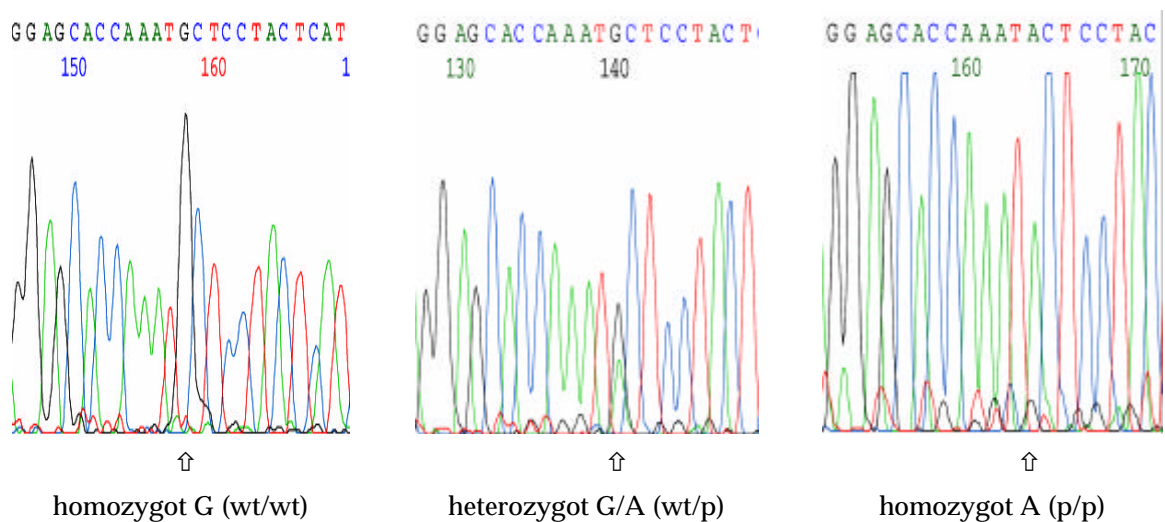


Abbildung 12: Sequenzierung des Polymorphismus Ala215Thr

Hierbei handelt es sich um einen Austausch von G gegen A in Codon 215 des SePP (GCT → ACT), der zu einem Aminosäureaustausch Alanin, einer Aminosäure der aliphatischen Gruppe, gegen Threonin, einer Aminosäure mit hydrophiler Seitenkette, im translatierten Protein führt.

3.3.5.3 Auftreten des Polymorphismus Ala215Thr in den untersuchten Zelllinien

Zusätzlich wurde das Auftreten dieses Polymorphismus in den Zelllinien HCT 15 und LoVo heterozygot nachgewiesen, während die übrigen untersuchten Zelllinien bzgl. dieses Locus die veröffentlichte Basenabfolge zeigten.

	homozygot G (wt/wt)	heterozygot A/G (wt/p)	homozygot A (p/p)
Colo 205	wt/wt		
CaCo 2	wt/wt		
HCT 116	wt/wt		
HCT 15		wt/p	
LoVo		wt/p	

Tabelle 20: Mittels Sequenzierung nachgewiesenes Auftreten des Polymorphismus Ala215Thr in untersuchten Zelllinien

3.3.5.4 Häufigkeit des Polymorphismus Ala215Thr in Blutproben von gesunden Probanden und Kolonkarzinompatienten

Mittels RFLP wurden insgesamt 227 Blutproben von gesunden Probanden und 193 Blutproben von Kolonkarzinompatienten auf das Vorliegen dieses Polymorphismus untersucht. Die ermittelte Verteilung ist in der Tabelle 21 angegeben. Es fand sich kein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung des Polymorphismus zwischen gesunden Probanden und Kolonkarzinompatienten

	Kolonkarzinompatienten (n=193)		Gesunde (= Kontrolle, n=227)	
homozygot G (wt/wt)	121	62,7%	143	63%
heterozygot A/G (wt/p)	64	33,2%	74	32,6%
homozygot A (p/p)	8	4,1%	10	4,4%

Tabelle 21: Ergebnis der RFLP-Analyse

3.4 LOH-Analysen des SePP-Locus mittels Mikrosatellitenmarker D5S634 und D5S660

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Gewebeproben bzgl. zweier Mikrosatelliten-Marker D5S634 und D5S660 untersucht, die in der Nähe des SePP-Genes auf Chromosom 5 lokalisiert sind (vergl. Abbildungen 7 und 8 in Kapitel 2.9).

Von den insgesamt 73 untersuchten Karzinomgeweben war in 48 der Proben mindestens einer der zwei Marker informativ. Ein LOH des SePP-Genes wurde in diesen Karzinomen nicht gefunden.

4 Diskussion

Epidemiologische Daten [Clark 1993/ Russo 1997/ Ghadirian 2000 u.a.], tierexperimentelle Untersuchungen [Davis 1999/ Davis 2000/Feng 1999/ Finley 2000 u.a.] und Interventionsstudien [Clark 1996 u.a.] deuten auf eine protektive Rolle des Spurenelementes Selen in Bezug auf die Entwicklung kolorektaler Karzinome hin.

Die Mechanismen einer möglichen tumorprotektiven Wirkung von Selen im Gastrointestinaltrakt sind derzeit jedoch nicht bekannt. Selen ist ein Strukturbestandteil von Selenoproteinen, einer Gruppe von Selenocystein-haltigen Proteinen, deren Funktion nur teilweise bekannt ist. Einige Selenoproteine spielen jedoch eine wichtige Rolle im antioxidativen Stoffwechsel und könnten so durch eine Schutzfunktion vor ROS-induzierten DNA-Schäden ein Verbindungsglied zwischen der Selenversorgung und der Tumorentstehung in der gastrointestinalen Mukosa darstellen.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die differentielle Expression von Selenoproteinen im Gastrointestinaltrakt gezeigt [Mörk 1998]. Für die gastrointestinale Glutathionperoxidase gelang ein Nachweis von mRNA in Ösophagus und Magenantrum, sowie Kolon- und Rektumschleimhaut, während in Magenkorpus, Duodenum und terminalem Ileum keine nennenswerte Expression gefunden wurde. Ebenso wurden für Selenoprotein P deutliche Northern-Signale in Kolon und Rektum, sowie Ösophagus und Duodenum detektiert, keine dagegen in Magenantrum, -korpus und terminalem Ileum. Im Vergleich dazu konnte in allen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes gleichmässig mRNA der plasmatischen Glutathionperoxidase nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde die Expression von Selenoproteinen in kolorektalen Adenomen im Vergleich zu korrespondierender gesunder Kolonschleimhaut untersucht. Hierbei zeigte sich in den Kolonadenomen eine Reduktion der Selenoprotein P Expression

um -70 bis -90%, während gleichzeitig eine 50 bis 400%ige Überexpression der gastrointestinalen Glutathionperoxidase jeweils im intraindividuellen Vergleich zu angrenzendem Normalgewebe beobachtet wurde.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Expression von Selenoprotein P in kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu korrespondierender gesunder Kolonschleimhaut. Im Falle von Expressionsveränderungen sollten potentielle zugrundeliegende Mechanismen näher charakterisiert werden.

So wurde im Rahmen dieser Arbeit die SePP-mRNA-Expression an elf kolorektalen Karzinomen sowie einem kolorektalen Adenom jeweils im Vergleich zu korrespondierender gesunder Kolonschleimhaut mittels Northern Hybridisierung untersucht. In Übereinstimmung mit den bereits bekannten Daten einer Reduktion der SePP-Expression in Kolonadenomen fand sich auch in unseren Untersuchungen eine deutlich verminderte SePP-Expression im Kolonadenom. Weiterhin wurde in allen untersuchten Kolonkarzinomen eine dramatische Abnahme der SePP-Expression bis hin zum kompletten Expressionsverlust in 3 Karzinomen bei intakter unveränderter GAPDH-Expression beobachtet. Somit konnten wir zeigen, dass die Entwicklung kolorektaler Karzinome mit dem Verlust einer SePP-Expression einhergeht. In Zusammenschau mit den Befunden in Kolonadenomen tritt dieser Expressionsverlust schon frühzeitig im noch nicht maligne transformierten Kolonepithel auf.

Die Ursache des Expressionsverlustes von SePP während der Kolonkarzinomentstehung ist unklar. Die chromosomale Lokalisation des SePP-Gens liegt auf Chromosom 5q31 in der Nähe des APC-Gens (Chromosom 5q21). Genetische Alterationen des APC-Gens gehören zu den Schrittmachermutationen der Kolonkarzinomgenese und lassen sich in einem Großteil der Kolonadenome und ebenso in sogenannten aberranten Krypten Foci, die als das früheste histopathologische Korrelat einer Neoplasie angesehen werden, nachweisen

[Jackson/Loeb 1998]. Daher haben wir das Auftreten von genetischen Alterationen im SePP-Gen als mögliche Ursache des Expressionsverlustes von SePP in Kolonkarzinomen untersucht. Insgesamt wurde die kodierende Sequenz des SePP-Gens in 55 Kolonkarzinomen komplett sequenziert. Dabei fanden sich keinerlei somatische Mutationen. Zusätzlich wurden das Auftreten eines Loss of heterozygosity (LOH's) in 73 Kolonkarzinomen mittels der Mikrosatelliten-Marker D5S634 und D5S660 untersucht. In insgesamt 48 der 73 untersuchten Proben war jeweils mindestens ein Marker informativ. In keiner der Proben konnte ein LOH nachgewiesen werden. Anhand dieser Ergebnisse scheint der in allen untersuchten Kolonkarzinomen auftretende Expressionsverlust von Selenoprotein P nicht durch genetische Alterationen innerhalb der kodierenden Sequenz bzw. LOH's des SePP-Gens verursacht zu sein.

Andere Mechanismen wie Promotoralterationen des SePP-Gens oder regulatorische Effekte sind zu diskutieren. In unserer Arbeitsgruppe wurde kürzlich das Auftreten von Polymorphismen und Instabilitäten innerhalb einer komplexen DNA-Repeat-Struktur des SePP-Promotors beschrieben. Reporter-gen-Studien zeigten eine Minderung der SePP-Promotoraktivität bei Vorliegen des Polymorphismus, während das Vorliegen einer SePP-Promotorinstabilität zu keiner Promotoraktivitätsänderung führte. Jedoch fand sich keine Assoziation des SePP-Promoter-Polymorphismus mit dem Auftreten eines Kolonkarzinoms [Al-Taie 2002].

Das Auftreten anderer Alterationen des Promotors wurde bislang nicht untersucht. Denkbar wären zum Beispiel epigenetische Veränderungen wie eine Methylierung in CpG-Inseln des SePP-Promotors als Ursache des beobachteten Expressionsverlustes von SePP während der Kolonkarzinogenese.

Desweiteren müssen neben genetischen Alterationen als Ursache des SePP-Expressionsverlustes insbesondere auch regulatorische Mechanismen in Erwägung gezogen werden. So ergaben funktionelle Untersuchungen mittels Luziferase-

Reportergen-Assay an Hepatokarzinomzellen HepG2 eine negative Regulierung der Promotoraktivität des SePP durch die inflammatorischen Zytokine Interferon γ (IFN γ), Interleukin 1 β (IL 1 β) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) in vitro. Im Bereich der Nukleotide -742 bis -732 konnte im SePP-Promotor ein Interferon γ -responsibles Element lokalisiert werden [Dreher 1997].

Ebenso fanden Mostert et al. eine Inhibition der SePP-Expression in HepG2-Zellen durch Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1) auf Ebene der Transkription [Mostert 2000]. Ein möglicher Signalweg des TGF β erfolgt über sogenannte Smad-Proteine. Diese werden nach Bindung des TGF β an einen transmembranären Rezeptor durch den entstehenden TGF β -Rezeptor-Komplex via Phosphorylierung aktiviert. Nach Translokation als Heterotrimere aus Smad 2, 3 und 4 in den Zellkern steuern sie über Bindung an spezielle Promotorabschnitte, sogenannte „Smad Binding Elements“ (SBE) die Transkription TGF β -regulierter Gene [Derynck 2001]. Während initial nur eine Aktivierung der Transkription durch Smad-Proteine angenommen wurde, konnte ebenso auch eine Beteiligung an TGF β -gesteuerter Inhibition der Transkription gezeigt werden. Kürzlich gelang die Identifikation zweier potentieller Smad Bindungs-Elemente im Promotor des SePP anhand ihrer charakteristischen Basenabfolge von CAGACA [Mostert 2001].

Einen Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen TGF β und niedrigen SePP-Gehalt in kolorektalen Karzinomen geben auch verschiedene Studien, die einen erhöhten TGF β -Spiegel zum einen lokal im Tumorgewebe, zum anderen auch im Serum von Karzinompatienten gegenüber gesunder Probanden fanden [Bellone 2001/ Shim 1999/ Tsushima 1996].

So untersuchte Bellone [Bellone 2001] von insgesamt 39 Kolonkarzinompatienten und 10 gesunden Personen immunhistochemisch Tumorpräparate bzw. Proben unauffälliger Darmschleimhaut bezüglich der Expression der TGF β -Isoformen. Signifikant stärker in Tumorpräparaten als im Normalgewebe waren TGF β 1 und

TGF β 2 exprimiert, während die Expression des TGF β 3 in Tumorzellen nur gering stärker nachgewiesen wurde. Entsprechend der gesteigerten Expression von TGF β 1- und TGF β 2-mRNA und Protein fanden sich auch im Patientenserum erhöhte Spiegel dieser beiden TGF β -Isoformen. Daneben konnte eine Korrelation der Höhe des TGF β -Spiegels mit dem Tumorstadium aufgezeigt werden.

Entsprechende Ergebnisse zeigten auch die Untersuchungen von Shim [Shim1999] an Serumproben von 121 Kolonkarzinompatienten und 31 Gesunden bezüglich des Serumspiegels von TGF β 1. Bei fortgeschrittener Invasion, Befall von Lymphknoten oder Metastasierung zeigten sich höhere Spiegel als in frühen Stadien oder Kontrollproben. Keinen Einfluss auf den TGF β 1-Level zeigten die Lokalisation des Tumors, das Geschlecht des Patienten oder dessen Alter bei Manifestation, eine geringen Einfluss nur hatten Differenzierungsgrad und Tumorgroße. Das Absinken der Plasmakonzentration des TGF β 1 nach kurativer Resektion bis auf das Niveau gesunder Kontrollproben wurde als indirekter Hinweis auf eine TGF β -Freisetzung durch die Tumorzellen angenommen.

TGF β ist physiologisch an der Steuerung von Wachstum und Zelldifferenzierung beteiligt. Es wirkt anti-inflammatorisch durch Modulation des Immunsystems und induziert in vitro Zellzyklus-Arrest. So wurde für Kolonadenomzellen eine autokrine und parakrine Wachstumskontrolle durch TGF β 1 gezeigt, dagegen aber ein inhibierender Effekt des TGF β 1 nur für einzelne Kolonkarzinomzelllinien in vitro, was einen Verlust der Wachstumsinhibition des TGF β 1 im Laufe der Tumorprogression nahe legt [Ref. in Shim 1999].

Möglicherweise verursacht ein hoher Spiegel an TGF β eine Inhibition der SePP-Expression und bedingt damit eine signifikante Minderung der Schutzmechanismen gegen oxidative Schädigung. Dies könnte neben direkten Effekten wie Förderung der Neoangiogenese und Veränderungen der extrazellulären Matrix eine Tumorprogression begünstigen.

Verschiedene Einflussfaktoren auf die Expression bzw. den Spiegel des SePP konnten aufgezeigt werden. Initial wurde eine Verminderung des SePP einem generalisierten Selenmangel zugeschrieben. Doch konnte gezeigt werden, dass unter den Selenoproteinen eine gewisse Rangfolge bei Selenmangelbedingungen herrscht. So wird SePP präferentiell vor den Isoformen der Glutathion-Peroxidasen mit Selen versorgt. Zwar ist unter Selenmangel auch der Gehalt an SePP verringert, doch dies ist nicht auf Inhibition der Transkription zurückzuführen, sondern auf die verminderte Stabilität der mRNA des SePP [Mostert 2000/ Hill 1997]. Somit kann Selenmangel nicht als Ursache diese Verminderung der SePP-mRNA angesehen werden.

Im Gegensatz zu dem in allen untersuchten Kolonkarzinomgeweben beobachteten Verlustes der SePP-mRNA-Expression fand sich in weiterführenden Untersuchungen der gleichen Kolonkarzinomgewebe eine konstante TrxR-mRNA-Expression und teils erhöhte, teils verminderte GI-GPx-mRNA-Expression (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde sprechen ebenfalls für spezifische Regulationsmechanismen der individuellen Selenoproteine und nicht für eine globale Störung der gesamten Selenoprotein-Synthese oder einen Malignom-assoziierten Selenmangel.

Bislang nicht untersucht wurden weitere Stellgrößen im Stoffwechsel des Selens und in der Synthese der Selenoproteine. So könnten auch Proteine, die an der Synthese und Beladung der spezifischen tRNA für Selenocystein, oder verschiedene für Selenoproteine spezifische Elongationsfaktoren verändert bzw. inaktiv sein. Auch die entsprechenden Gene dieser Proteine, SelA, SelB, SelC, SelD u.a., wurden noch nicht im Hinblick auf mögliche Mutationen oder anderen Alterationen geprüft.

Auch wenn keine Mutationen des SePP-Gens nachgewiesen werden konnten, die eine verminderte Expression des SePP erklären, so wurden zwei Variationen innerhalb der codierenden Gensequenz des SePP gefunden.

Im zweiten Exon des SePP wurde zwischen den Basen 189 und 193 eine im Vergleich zu der von Hill et al. veröffentlichten und als Referenz verwendeten Sequenz zwei Inversionen gefunden. So zeigten alle von uns untersuchten Proben die Basenabfolge ATA CTG CAG, die korrespondierende Sequenz, die von Hill et al. publiziert wurde, lautet jedoch ATC ATC GAG. Dies bedingt einen Austausch von Leuzin gegen Isoleuzin und Glutamat gegen Glutamin (Ile – Leu – Gln versus Ile – Ile – Glu [Hill 1993]). Über eine Auswirkung auf den Einbau des „vier- bzw. fünf-Aminosäuren N-terminal“ gelegene erste Selenocystein, als 40. Aminosäure des funktionellen SePPs, oder dessen Funktion kann nur spekuliert werden. Ein Vergleich der Aminosäurenabfolge des humanen SePP mit der des SePP aus Maus oder Ratte (Leu – Leu – Gln) lässt eine funktionelle Auswirkung eher nicht vermuten. Ebenso könnte es sich auch um einen „Lesefehler“ in der ursprünglichen Veröffentlichung [Hill 1993] handeln, da inzwischen weitere Genomsequenzen mit der gefundenen Basenabfolge veröffentlicht wurden (cf. Ergebnisse: 3.3.4).

Im Anfangsbereich des fünften Exons des SePP-Gens wurde eine weitere Variation gefunden. So konnte in einer von 54 der Gewebeproben in homozygoter Form ein Basentausch der 700. Base der cDNA von Guanin zu Adenin nachgewiesen werden. In weiteren 19 der 54 Proben wurde dieser Locus heterozygot Guanin/Adenin gefunden, 34 der 54 Proben zeigten die veröffentlichte Sequenz (Guanin) homozygot. Dieser Locus war in den einzelnen Proben jeweils in Normal- und Tumorgewebe identisch nachweisbar.

Dieser Basentausch liegt an erster Position der Codon 215 der cDNA im offenen Leseraster (ORF) des SePPs und führt so zu einer Veränderung der zu translatierenden Aminosäure. Anstelle der aliphatischen Aminosäure Alanin codiert das veränderte Codon für die hydrophile Aminosäure Threonin.

Über die Auswirkungen können nur einige Vermutungen angestellt werden, weiterführende Untersuchungen sind erforderlich. So könnte durch Veränderung

der räumlichen Struktur des entstehenden Proteins infolge von Ladungsveränderungen der Aminosäure-Seitenketten – Alanin besitzt eine apolare, Threonin dagegen eine polare – die Interaktion zwischen SECIS-Motiven, der spezifischen tRNA und der mRNA gestört werden und somit der Einbau des zweiten Selenocysteins an Codon 281 im ORF blockiert werden, so dass dort am zweiten UGA-Codon ein Abbruch der Translation erfolgt. Diese Variation könnte somit das Auftreten der kürzeren Isoform des SePP der Molekülmasse von 55kDa erklären.

Funktionelle Beeinträchtigungen aufgrund des Aminosäuren-Austausches sind vermutlich wenig wahrscheinlich. Denn ein Vergleich der Aminosäuresequenzen, die aus SePP-cDNA verschiedener Spezies abgeleitet wurde, zeigt, dass das SePP der Ratte [Burk 1994/ Mostert 2000] an Codon 215 Valin, eine ebenso wie bei humanem SePP aliphatische Aminosäure, SePP aus Mäusen [Mostert 2000] dagegen Glutamat, eine Aminosäure mit einer Carboxyl-Seitenkette, enthält. Die räumlich mehr Platz einnehmenden Aminosäuren scheinen weder die Inkorporation von Selenocystein zu behindern, noch einen signifikanten Einfluss auf die biologische Funktion des SePP auszuüben.

Ein direkter Zusammenhang zwischen Kolonkarzinomen und dem identifizierten Polymorphismus kann nicht hergestellt werden, da die Häufigkeitsverteilung unter Kolonkarzinompatienten weitestgehend der in gesunden Probanden gefundenen entspricht. Das Auftreten auch in gesunden Personen legt die Schlussfolgerung nahe, dass die gefundene Variation einen genetischen Polymorphismus von bislang unbestimmter Relevanz darstellt.

5 Zusammenfassung

DNA-Schädigungen durch Sauerstoff-Radikale werden als bedeutende pathogene Faktoren der kolorektalen Karzinogenese angesehen. Als ein antioxidativer Schutzmechanismus im Gastrointestinaltrakt wird u. a. das Selenoprotein P vermutet, dessen mRNA-Expression in Kolonadenomen im Vergleich zu angrenzender gesunder Darmmukosa stark vermindert nachgewiesen wurde.

Interessant ist zudem die Lokalisation des SePP-Gens auf Chromosom 5q31 in der Nähe des APC-Gens, eines schon in frühen Stadien der kolorektalen Karzinogenese alterierten Gens, auf Chromosom 5q21.

Daten über SePP-Expression oder genetische Veränderungen des SePP-Gens in Kolonkarzinomen liegen bislang nicht vor.

Die mRNA-Expression wurde an elf Kolonkarzinomen und einem Kolonadenom mittels Northern-Blot jeweils im Vergleich zu unauffälliger Darmmukosa untersucht. Daneben wurde DNA aus 74 mikrodisezierten Kolonkarzinomgeweben mit korrespondierender Normalmukosa, DNA aus Blutproben von 193 Kolonkarzinompatienten sowie 227 gesunder Probanden mittels PCR, Sequenzierung und Restriktionsanalyse auf genetische Veränderungen untersucht.

Sowohl SePP-mRNA- als auch SePP-DNA-Untersuchungen erfolgten an fünf etablierten Kolonkarzinozelllinien.

Auch im Kolonkarzinom ist die Expression der SePP-mRNA vermindert, bzw. z.T. nicht mehr nachweisbar.

Auf DNA-Ebene fanden sich keine Alterationen des SePP-Gens, die einen Expressionsverlust erklären würden. Ein Polymorphismus mit konsekutivem Aminosäuren-Austausch wurde im Exon 5 des SePP detektiert. Es fand sich keine signifikante Assoziation zwischen diesem und dem Auftreten eines

Kolonkarzinomes, klinischen Parametern oder einer Mikrosatelliten-Instabilität. Ein LOH des SePP-Gens wurde nicht gefunden.

Der auch im Kolonkarzinom nachweisbare Verlust der SePP-Expression beruht nicht auf genetische Veränderungen im SePP-Gen.

Eine funktionelle Analyse des SePP-Promotors ergab eine negative Regulierung durch TGF β , welches in Kolonkarzinomen verstärkt nachgewiesen wurde und eine mögliche Erklärung für die verminderte Expression sein könnte neben anderen regulatorischen Einflüssen.

Generell könnte die verminderte SePP-Expression eine DNA-Schädigung durch ROS und damit die kolorektale Karzinogenese begünstigen.

6 Literatur

- [1] Aaltonen LA
Hereditary intestinal cancer
Cancer Biology (2000), 10, pp.289-298
- [2] Alexander J, Watanabe T, Wu T-T, Rashid A et al.
Histopathological Identification of Colon Cancer with Microsatellite Instability
American Journal of Pathology (2001), 158, pp.527-535,
- [3] Allan CB, Lacourciere GM, Stadtman TC
Responsiveness of Selenoproteins to dietary Selenium
Annu. Rev. Nutr. (1999), 19, pp.1-16
- [4] Al-Taie O, Mörk H, Seufert J, Treis H, Jakob F, Scheurlen M
HNPCC: Aktuelle Übersicht zur Ätiologie, Klinik Diagnostik und Therapie
Medizinische Klinik (2001), 96, pp.529-538
- [5] Al-Taie O, Seufert J, Mörk H, Treis H, Mentrup B, Thalheimer A, Starostik P, Abel J, Scheurlen M, Köhrle J, Jakob F
A complex DNA-repeat structure within the Selenoprotein P promotor contains a functionally relevant polymorphism and is genetically unstable under conditions of mismatch repair deficiency
Eur J Hum Genet (2002), 10, pp.499-504
- [6] Arbabi S, Rosengart MR, Garcia I, Jelacic S, Maier RV
Epithelial Cyclooxygenase-2 Expression: A Model for Pathogenesis of Colon Cancer
Journal of Surgical Research (2001), 97, pp.60-64
- [7] Arteel GE, Mostert V, Oubrahim H et al.
Protection by Selenoprotein P in Human Plasma against Peroxynitrite-Mediated Oxidation and Nitration
Biol. Chem. (1998), 379, pp.1201-1205
- [8] Arteel GE, Sies H
The biochemistry of selenium and the glutathione system
Environmental Toxicology and Pharmacology (2001), 10, pp.153-158
- [9] Arthur JR
The glutathione peroxidases
Cell Mol. Life Sci. (2000), 57 (13-14), pp. 1825-1835
- [10] Atkinson JB, Hill KE, Burk RF
Centrilobular endothelial cell injury by diquat in the selenium-deficient rat liver
Lab Invest (2001), 81 (3), pp. 193-200
- [11] Aw TY
Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine
American Journal of Clinical Nutrition (1999), 70 (4), pp.557-565
- [12] Beck NE, Tomlinson IPM, Homfray TFR, Frayling IM, Hodgson SV, Bodmer W
Frequency of germline hereditary non-polyposis colorectal cancer gene mutations in patients with multiple or early onset colorectal adenomas
Gut (1997), 41, pp.235-238

- [13] Beckman KB, Ames BN
Oxidative decay of DNA
J Biol Chem (1997), 272, pp.19633-19636
- [14] Beckman KB, Ames BN
Endogenous oxidative damage of mtDNA
Mutation Research (1999), 424, pp.51-58
- [15] Bellone G, Carbone A, Tibaudi D, Mauri F, Ferrero I et al.
Differential expression of transforming growth factors- β 1, - β 2 and - β 3 in human colon carcinoma
European Journal of Cancer (2001), 37, pp.224-233
- [16] Bendahl L, Sidenius U, Gammelgaard B
Determination of Selenoprotein P in human plasma by solid phase extraction and inductively coupled plasma mass spectrometry
Analytica Chimica Acta (2000), 411, pp.103-108
- [17] Beno I, Staruchova M, Volkovovo K, Batovsky M
Increased antioxidant enzyme activities in the colorectal adenoma and carcinoma
Neoplasma (1995), 42, p5
- [18] Bhattacharyya NI, Skandalis A, Ganesh A, Groden J, Meuth M
Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994), 91, pp.6319-6323, *Genetics*
- [19] Bishop DT, Hall NR
The Genetics of Colorectal Cancer
European Journal of Cancer (1994), 30 (13), pp.1946-1956
- [20] Bovo D, Rugge M, Shiao Y-H
Origin of spurious multiple bands in the amplification of microsatellite sequences
J Clin Pathol: Mol Pathol (1999), 52, pp.50-51
- [21] Braithwaite E, Wu X, Wang Z
Repair of DNA lesions: mechanism and relative repair efficiencies
Mutation Research (1999), 424, pp.207-219
- [22] Brigelius-Flohe R
Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases
Free Radic Biol Med (1999), 27 (9-10), pp.951-965
- [23] Burk RF, Hill KE
Selenoprotein P. A Selenium-Rich Extracellular Glycoprotein
Journal of Nutrition (1994), 124, pp.1891-1897
- [24] Burk RF, Hill KE, Awad JA, Morrow JD, Kato T, Cockell KA, Lyons PR
Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P
Hepatology (1995), 21 (2), pp.561-569
- [25] Burk RF, Hill KE
Orphan selenoproteins
BioEssays (1999), 21, pp.231-237
- [26] Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR
The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxy nitrite
Mutation Research (1999), 424, pp.37-49

- [27] Cadet J et al.
Hydroxyl radicals and DNA base damage
Mutation Research (1999), 424, pp.9-21
- [28] Cahill DP et al.
Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers (letters to nature)
Nature (1998), 392, pp.300-303
- [29] Calvo A, Xiao N, Kang J, Best CJM, Leiva I, Emmert-Buck MR, Jorcyk C, Green JE
Alterations in Gene Expression Profiles during Prostate Cancer Progression: Functional Correlations to Tumorigenicity and Down-Regulation of Selenoprotein-P in Mouse and Human Tumors
Cancer Research (2002), 62, pp.5325-5335
- [30] Caroli S, Coni E, Alimonti A, Petrucci F, Bolis GB, Cristallini E
A pilot study on colon cancer occurrence as related to serum selenium levels
Ann Ist Super Sanita (1994), 30 (2), pp.243-247
- [31] Chao A, Gilliland F, Willman C, Joste N, Chen I-M, Stone N et al.
Patient and Tumor Characteristics of Colon Cancers with Microsatellite Instability: A Population-based study
Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention (2000), 9, pp.539-544
- [32] Chomczynski P
A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples
BioTechniques (1993), 15, pp.532-535
- [33] Chu FF, Doroshov JH, Esworthy RS
Expression, Characterization, and Tissue Distribution of a New Cellular Selenium-dependent Glutathione Peroxidase, GSHPx-GI
Journal of Biological Chemistry (1993), 268 (4), pp.2571-2576
- [34] Chu FF, Esworthy RS
The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium
Arch. Biochem. Biophys. (1995), 323 (2), pp.288-294
- [35] Chu FF, de Silva HAR, Esworthy RS et al.
Polymorphism and Chromosomal Localization of the GI-Form of Human Glutathione Peroxidase (GPX2) on 14q24.1 by in Situ Hybridization
Genomics (1996), 32, pp.272-276
- [36] Chu FF, Esworthy RS, Ho YS, Bermeister M, Swiderek K, Elliott RW
Expression and chromosomal mapping of mouse Gpx2 gene encoding the gastrointestinal form of glutathione peroxidase, GPX-GI
Biomed. Environ. Sci. (1997), 10 (2-3), pp.156-162
- [37] Chung DC, Rustgi AK
DNA Mismatch Repair and Cancer
Gastroenterology (1995), 1089, pp.1685-1699
- [38] Clark LC, Hixson LJ et al.
Plasma Selenium Concentration Predicts the Prevalence of Colorectal Adenomatous Polyps
Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention (1993), 2, pp.41-46

- [39] Clark LC, Combs GF, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK et al.
Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients with Ca of the Skin
JAMA (1996), 276 (24), pp.1957-1963
- [40] Combs GF, Clark LC, Turnbull BW
Reduction of Cancer Mortality and Incidence by Selenium Supplementation
Medizinische Klinik (1997), 92, pp.42-45
- [41] Combs Jr.GF, Gray WP
Chemopreventive Agents: Selenium
Pharmacol. Ther. (1998), 79 (3), pp.179-192
- [42] Copeland PR, Fletcher JE, Carlson BA, Hatfield DL, Driscoll DM
A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs
EMBO Journal (2000), 19 (2), pp.306-314
- [43] Cress RD, Morris CR, Wolfe BM
Cancer of the Colon and Rectum in California: Trends in Incidence by Race/Ethnicity, Stage and Subsite
Preventive Medicine (2000), 31, pp.447-453
- [44] Davis CD, Feng Y, Hein DW, Finley JW
The chemical Form of Selenium influences 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl-DNA Adduct formation in rat colon
J. Nutr. (1999), 129, pp.63-69
- [45] Davis CD, Uthus EO, Finley JW
Dietary Selenium and Arsenic Affect DNA Methylation in Vitro in Caco2 Cells and in Vivo in Rat Liver and Colon
J.Nutr. (2000), 130, pp.2903-2909
- [46] Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A
TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression
Nature genetics (2001), 29, pp.117-129
- [47] Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E et al.
High Prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T Lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in Colorectal Carcinomas with Microsatellite Instability
American Journal of Pathology [AJP] (1999), 154 (6), pp.1805-1813
- [48] Dreher I, Jakobs TC, Köhrle J
Cloning and Characterization of the Human Selenoprotein P Promoter
Journal of Biological Chemistry (1997), 272 (46), pp.29364-29371
- [49] Dreher I, Schütze N, Baur A et al.
Selenoproteins Are Expressed in Fetal Human Osteoblast-like Cells
Biochemical and Biophysical Research Communications (1998), 245, pp.101-107
- [50] Duesberg P, Rausch C, Rasnick D, Hehlmann R
Genetic instability of cancer cell is proportional to their degree of aneuploidy
Proc. Natl. Acad. Sci. USA.(1998), 95, pp.13692-13697, Cell Biology
- [51] Eckert KA, Opresko PL
DNA polymerase mutagenic bypass and proofreading of endogenous DNA lesions
Mutation Research (1999), 424, pp.221-236

- [52] Eder E
Intraindividual variations of DNA adduct levels in humans
Mutation Research (1999), 424, pp.249-261
- [53] Engle SJ, Hoying JB, Boivin GP, Ormsby I, Gartside PS, Doetschmann T
Transforming Growth Factor β 1 Suppresses Nonmetastatic Colon Cancer at an Early Stage of Tumorigenesis
Cancer Research (1999), 59, pp.3379-3386
- [54] Fagegaltier D, Hubert N, Yamada ., Mizutani T, Carbon P, Krol A
Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation
EMBO Journal (2000), 19 (17), pp.4796-4805
- [55] Fearon ER, Vogelstein B
A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis
Cell (1990), 61, pp.759-767
- [56] Feeley KM, Fullard JF, Heneghan MA et al.
Microsatellite instability in sporadic colorectal carcinoma is not an indicator of prognosis
J. Pathol. (1999), 188, pp.14-17
- [57] Fehrenbach E, Northoff H
Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins
Exerc. Immunol. Rev. (2001), 7, pp.66-89
- [58] Feng Y, Finley JW, Davis CD et al
Dietary Selenium Reduces the Formation of Aberrant Crypts in Rats Administered 3,2'-Dimethyl-4-aminobiphenyl
Toxicology and Applied Pharmacology (1999), 157, pp.36-42
- [59] Feroci G, Fini A, Badiello R, Breccia A
Interaction between Selenium Derivates and Heavy Metal Ions: Cu²⁺ and Pb²⁺
Microchemical Journal (1997), 57, pp.379-388
- [60] Finley JW
The Retention and Distribution by healthy young men of stable Isotopes of Selenium consumed as Selenite, Selenate or Hydroponically-grown Broccoli are dependent on the Isotopic Form
J. Nutr. (1999), 129, pp.865-871
- [61] Finley JW, Davis CD, Feng Y
Selenium from High Selenium Broccoli Protects Rats from Colon Cancer
J.Nutr. (2000), 130, pp.2384-2389
- [62] Finley JW, Ip C, Lisk DJ, Davis CD et al
Cancer-Protective Properties of High Selenium Broccoli
J. Agric. Food. Chem. (2001), 49, pp.2679-2683
- [63] Fishel R, Wilson T
mutS homologs in mammalian cells
Current opinion in Genetics & Development (1997), 7, pp.105-113
- [64] Flohe L
Selen im Peroxidstoffwechsel
Medizinische Klinik (1997), 92, pp.5-7
- [65] Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R
Oxidative Stress, Human Genetic Variation, and Disease
Archives of Biochemistry and Biophysics (2001), 389 (1), pp.84-93

- [66] Ganther HE
Selenium metabolism, selenoproteins and mechanism of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase
Carcinogenesis (1999), 20 (9), pp.1657-1666
- [67] Gerhardsson de Verdier M, Hagman U, Peters RK, Steineck G, Overvik E
Meat, cooking and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm
Int J Cancer (1991), 49 (4), pp.520-525
- [68] Ghadirian P, Maisonneuve P, Perret C, Kennedy G, Boyle P, Krewski D, Lacroix A
A case-control study of toenail selenium and cancer of the breast, colon and prostate
Cancer Detect Prev (2000), 24 (4), pp.305-313
- [69] Gladyshev VN, Factor VM, Housseau F, Hatfield DL
Contrasting Patterns of Regulation of the Antioxidant Selenoproteins, Thioreductase, and Glutathione Peroxidase, in Cancer Cells
Biochemical and Biophysical Research Communications (1998), 251, pp.488-493
- [70] Gladyshev VN, Jeang K-T, Wootton JC, Hatfield DL
A New Human Selenium-containing Protein
Journal of Biological Chemistry (1998), 273 (15), pp.8910-8915
- [71] Ghosh R, Mitchell DL
Effect of oxidative DNA damage in promotor elements on transcription factor binding
Nucleic Acids Research (1999), 27 (15), pp.3213-3218
- [72] Goto Ch, Osaka T, Mizutani T
A model for Sec incorporation with the regions upstream of the UGA Sec codon to play a key role
BioFactors (2001), 14, pp.25-35
- [73] Grundner-Culemann E, Martin III GW, Harney JW, Berry MJ
Two distinct SECIS structures capable of directing selenocysteine incorporation in eukaryotes
RNA (1999), 5, pp.625-635
- [74] Grundner-Culemann E, Martin GW, Tujebajeva RM, Harney JW, Berry MJ
Interplay between termination and translation machinery in eukaryotic selenoprotein synthesis
J. Mol. Biol. (2001), 310, pp.699-707
- [75] Guimaraes MJ, Peterson D, Vicari A, Cocks BG, Copeland NG et al.
Identification of a novel selD homolog from Eukaryotes, Bacteria, and Archaea: Is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism?
Proc. Natl. Acad. Sci. (1996), 93, pp.15086-15091
- [76] Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK et al.
Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer
The New England Journal of Medicine (2000), 342 (2), pp.69-77
- [77] Guidoboni M, Gafa R, Viel A et al.
Microsatellite Instability and High Content of Activated Cytotoxic Lymphocytes Identify Colon Cancer Patients with a Favorable Prognosis
American Journal of Pathology (2001), 159, pp.297-304
- [78] Hatfield DL, Gladyshev VN
How Selenium Has Altered Our Understanding of the Genetic Code (Minireview)
Molecular and Cellular Biology (2002), 22 (11), pp.3565-3576

- [79] Heinen CD, Richardson D et al.
Microsatellite Instability in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines that have Full-Length Adenomatous Polyposis Coli Protein
Cancer Research (1995), 55, pp.4797-4799
- [80] Hemminki K, Koskinen M, Rajaniemi H, Zhao C
DNA Adducts, Mutations, and Cancer 2000
Regulatory Toxicology and Pharmacology (2000), 32, pp.264-275
- [81] Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR et al.
Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in CRC
Proc. Natl. Acad. Sci. (1998), 95, pp.6870-6875
- [82] Higuchi R
Rapid, efficient DNA extraction for PCR from cells or blood
Amplifications – A forum for PCR users (1989), Issue 2, Perkin-Elmer-Cetus Corp., 1-3
- [83] Hill KE, Lloyd RS, Burk RF
Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3'untranslated region of selenoprotein P mRNA
Proc. Natl. Acad. Sci. (1993), 90, pp.537-541
- [84] Hill KE, Dasouki M, Phillips III JA, Burk RF
Human Selenoprotein P Gene Maps to 5q31
Genomics (1996), 36, pp.550-551
- [85] Hill KE, Xia Y, Akesson B, Boeglin ME, Burk RF
Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented Chinese subjects
J Nutr (1996), 126 (1), pp.138-145
- [86] Hill KE, Burk RF
Selenoprotein P: Recent Studies in Rats and in Humans
Biomedical and Environmental Sciences (1997), 10, pp.198-208
- [87] Himeno S, Chittum HS, Burk RF
Isoforms of Selenoprotein P in Rat Plasma
Journal of Biological Chemistry (1996), 271, pp.15769-15775
- [88] Hondal RJ, Ma S, Caprioli RM, Hill KE, Burk RF
Heparin-binding Histidine and Lysine Residues of Rat Selenoprotein P
Journal of Biological Chemistry (2001), 276 (19), pp.15823-15831
- [89] Houlston RS, Tomlinson IPM
Polymorphisms and Colorectal Tumor Risk
Gastroenterology (2001), Vol.121, pp.282-301
- [90] Ip C
Lessons from Basic Research in Selenium and Cancer Prevention
J. Nutr. (1998), 128, pp.1845-1854
- [91] Iwahashi Y, Ito E, Yanagisawa Y, Akiyama Y, Yuasa Y, Onodera T, Maruyama K
Promotor analysis of the human mismatch repair gene hMSH2
Gene (1998), 213, pp.141-147
- [92] Jackson AL, Loeb LA
The Mutation Rate and Cancer
Genetics (1998), Vol.148, pp.1483-1490

- [93] Jackson AL, Chen R, Loeb LA
Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage
Genetics, October 1998, Vol.95, pp.12468-12473
- [94] Jacob C, Maret W, Vallee BL
Selenium redox biochemistry of zinc-sulfur coordination sites in proteins and enzymes
Proc. Natl. Acad. Sci. (1999), Vol.96, pp.1910-1914
- [95] Jacoby RF, Hohman C, Marshall DJ, Frich TJ et al.
Genetic analysis of colon cancer susceptibility in mice
Genomics (1994), 22, pp.381-387
- [96] Jakob F, Mörk H, Schütze N et al.
Selenoproteine im Knochen, Gastrointestinaltrakt und in der Schilddrüse des Menschen
Medizinische Klinik (1997), 92, pp.24-26
- [97] Jass JR, Do K-A, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, Searle J et al.
Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors
Gut (1998), 42, pp.673-679
- [98] Jiricny J
Replication errors: challenging the genome
The EMBO Journal (1998), 17 (22), pp.6427-6436
- [99] Kastl S, Günther K, Merkel S, Hohenberger W, Ballhausen WG
Erbliches Colonicarcinom ohne Polyposis (HNPCC) ohne Erfüllung der Amsterdam-Kriterien
Der Chirurg (2000), 71, pp.444-447
- [100] Knudson AGJ
Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1971), 68, pp.820-823
- [101] Ko JM-Y, Cheung M H-Y, Kwan M-W et al.
Genomic instability and alterations in APC, MCC and DCC in Hongkong Patients with CRC
Int. J. Cancer (1999) 84, pp.404-409
- [102] Köhrle J, Dreher I, Hesse K et al.
Neue Aspekte der Regulation und Funktion menschlicher Selenoproteine
GMS? Jahrestagung 1997, Dresden
- [103] Köhrle J
The trace element selenium and the thyroid gland
Biochimie (1999), 81, pp. 527-533
- [104] Köhrle J
The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action
Cell Mol Life Sci (2000), 57 (13-14), pp. 1853-1863
- [105] Kontogianna M, Gupta A, Ntanios F et al.
 ω -3 Fatty Acids Decrease Endothelial Adhesion of Human Colorectal Carcinoma Cells
Journal of Surgical Research (2000), 92, pp.201-205
- [106] Krämer K, Look MP, Chrissafidou A, Karsten S, Arends J
Selen und Tumorerkrankungen
Akt. Ernähr.-Med. 21 (1996) 103-113
- [107] Fernandez E, Negri E, LaVecchia C, Franceschi S
Diet Diversity and Colorectal Cancer
Preventive Medicine (2000), 31, pp.11-14

- [108] Kryukov GV, Kryukov VM, Gladyshev VN
New Mammalian Selenocysteine-containing Proteins Identified with an Algorithm That Searches for Selenocysteine Insertion Sequence Elements
Journal of Biological Chemistry (1999), 274 (48), pp.33888-33897
- [109] Kryukov GV, Gladyshev VN
Selenium metabolism in zebrafish: multiplicity of selenoprotein genes and expression of a protein containing 17 selenocysteine residues
Genes to Cells (2000), 5, pp.1049-1060
- [110] Kullmann F, Bocker T, Schölmerich J, Rüschoff J
Mikrosatelliteninstabilität – ein neuer Aspekt in der Genetik und Molekularbiologie von HNP- und sporadischen kolorektalen Tumoren
Z Gastroenterol (1996), 34, pp.813-822
- [111] De Laat WL, Jaspers NGJ, Hoeijmakers JHJ
Molecular mechanism of nucleotide excision repair
Genes and Development (1999), 13, pp.768-785
- [112] Lacourciere GM, Mihara H, Kurihara T, Esaki N, Stadtman TC
E.coli NifS-like Proteins Provide Selenium in the Pathway for the Biosynthesis of Selenophosphate
Journal of Biological Chemistry (2000), 275 (31), pp.23769-23773
- [113] Lagergren J, Ye W, Ekblom A
Intestinal Cancer After Cholecystectomy: Is Bile Involved in Carcinogenesis?
Gastroenterology (2001), 121, pp.542-547
- [114] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B
Genetic instabilities in human cancers (letters to nature)
Nature (1997), 386, pp.623-627
- [115] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B
Genetic instabilities in human cancers (review article)
Nature (1998), 396, pp.643-649
- [116] Lescure A, Gautheret D, Carbon P, Krol A
Novel Selenoproteins Identified in Silico and in Vivo by Using a Conserved RNA Structural Motif
Journal of Biological Chemistry (1999), 274, pp.38147-38154
- [117] Lettieri T et al.
Effect of hMSH6 cDNA expression on the phenotype of mismatch repair-deficient colon cancer cell line HCT15
Carcinogenesis (1999), 20 (3), pp.373-382
- [118] Liang G, Salem CE, Yu MC, Nguyen HD, Gonzales FA et al.
DNA Methylation Differences Associated with Tumor Tissues Identified by Genome Scanning Analysis
Genomics (1998), 53, pp.260-268
- [119] Liu T, Yan H, Kuismann S, Percesepe A et al.
The Role of hPMS1 and hPMS2 in Predisposing to Colorectal Cancer
Cancer Research (2001), 61, pp.7798-7802
- [120] Lloyd DR, Phillips DH
Oxidative DNA damage mediated by copperII, ironII and nickelIII Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-

- hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links
Mutation Research (1999), 424, pp.23-36
- [121] Loeb KR, Loeb LA
Significance of multiple mutations in cancer
Carcinogenesis (2000), 21 (3), pp.379-385
- [122] Loeb LA
Cancer Cells Exhibit a Mutator Phenotype
Advances in Cancer Research
- [123] Loeb LA
A Mutator Phenotype in Cancer
Cancer Research (2001), 61, pp.3230-3239
- [124] Low SC, Harney JW, Berry MJ
Cloning and Functional Characterization of Human Selenophosphate Synthetase, an Essential Component of Selenoprotein Synthesis
Journal of Biological Chemistry (1995), 270 (37), pp.21659-21664
- [125] Lu S-L, Akiyama Y, Nagasaki H, Saitoh K, Yuasa Y
Mutations of the transforming growth factor β type II receptor gene and genomic instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer
Biochemical and biophysical research communications (1995), 216 (2), pp.452-457
- [126] LukishJR, Muro K, de Nobile J et al.
Prognostic significance of DNA replication errors in young patients with colorectal cancer
Ann. Surg. (1998), 227, pp.51-56
- [127] Ma S, Hill KE, Caprioli RM, Burk RF
Mass Spectrometric Charakteritation of Full-length Rat Selenoprotein P and Three Isoforms shortened at the C Terminus
Journal of Biological Chemistry (2002), 277 (15), pp.12749-12754
- [128] Marnett LJ
Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde
Mutation Research (1999), 424, pp.83-95
- [129] Marnett LJ
Oxyradicals and DNA damage
Carcinogenesis (2000), 21 (3), pp.361-370
- [130] Martin-Romero FJ et al.
Selenium Metabolism in Drosophila
J. Biol. Chem. (2001), 276, pp.29798-29804
- [131] Mellemkjaer L, Olson JH, Frisch M, Johansen C, Gridley G, McLaughlin JK
Cancer in patients with ulcerative colitis
Int J Cancer (1995), 60 (3), pp.330-333
- [132] Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A et al.
Extensive Methylation of hMLH1 Promotor Region Predominates in proximal Colon Cancer With Microsatellite Instability
Gastroenterology (2001), 121, pp.1300-1309
- [133] Miyanishi K, Takayama T, Ohi M, Hayashi T et al.
Glutathione S-Transferase-p Overexpression is closely ass. with K-ras Mutation during human Colon Carcinogenesis
Gastroenterology (2001), 121, pp.865-874

- [134] Mörk H, Lex B, Scheurlen M, Dreher I, Schütze N, Köhrle J, Jakob F
Expression pattern of gastrointestinal selenoproteins – targets for selenium supplementation
Nutrition and Cancer (1998), 32, pp.64-70
- [135] Mörk H, Dreher I, Lex B, Köhrle J, Jakob F
Selenoproteine im menschlichen Gastrointestinaltrakt
- [136] Mörk H, Al-Taie OH, Bähr K, Zierer A, Beck C, Scheurlen M, Jakob F, Köhrle J
Inverse mRNA Expression of Selenocystein-Containing Proteins Gi-GPx and SeP in Colorectal Adenomas compared with Adjacent Normal Mucosa
Nutrition and Cancer (2000), 37 (1), pp.108-116
- [137] Moriarty PM, Reddy CC, Maquat LE
Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA
Mol. Cell Biol. (1998), 18 (5), pp.2932-2939
- [138] Mostert V
Selenoprotein P: Properties, Functions, and Regulation
Archives of Biochemistry and Biophysics (2000), 376 (2), pp.433-438
- [139] Mostert V, Dreher I, Köhrle J, Abel J
Transforming growth factor- β 1 inhibits expression of selenoprotein P in cultured human liver cells
Federation of European Biochemical Societies (1999), Letters 460, pp.23-26
- [140] Mostert V, Wolff S, Dreher I, Köhrle J, Abel J
Identification of an element within the promotor of human selenoprotein P responsive to transforming growth factor- β
Eur. J. Biochem. (2001), 268, pp.6176-6181
- [141] Mure K, Rossman TG
Reduction of spontaneous mutagenesis in mismatch repair-deficient and proficient cells by dietary antioxidants
Mutation Research (2001), 480-481, pp.85-95
- [142] Nair J, Barbin A, Velic I, Bartsch H
Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species
Mutation Research (1999), 424, pp.59-69
- [143] Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Aw TY
Induction of mild intracellular redox imbalance inhibits proliferation of CaCo-2 cells
FASEB J. (2001), 15, pp.2131-2139
- [144] Nordberg J, Arner ESJ
Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system
Free Radical Biology & Medicine (2001), 31 (11), pp.1287-1312
- [145] Offit K (Editorial)
Genetic Prognostic Markers for Colorectal Cancer
NEJM (2000), 342, pp.124-125
- [146] Ogasawara Y, Lacourciere G, Stadtman TC
Formation of a selenium-substituted rhodanese by reaction with selenite and glutathione: Possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system
Proc. Natl. Acad. Sci. (2001), 98 (17), pp.9494-9498

- [147] Olschwang S, Hamelin R, Laurent-Puig P, Thuille B, De Rycke Y, Li Y-J et al.
Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis
Proc. Natl. Acad. Sci. (1997), 94, pp.12122-12127
- [148] Otteneeder M, Lutz WK
Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts
Mutation Research (1999), 424, pp.237-247
- [149] Persson-Moschos MEK, Stavenow L, Akesson B, Lindgärde F
Selenoprotein P in Plasma in Relation to Cancer Morbidity in Middle-Aged Swedish Men
Nutrition and Cancer (2000), 36 (1), pp.19-26
- [150] Perucho M
Cancer of the microsatellite mutator phenotype
Biol Chem (1996), 377, pp.675-684
- [151] Peskin AV
Interaction of Reactive Oxygen Species with DNA. A Review
Biochemistry (1997), 62 (12), pp.1341-1347
- [152] Pinsky PF
A Multi-stage Model of Adenoma Development
J. theor. Biol. (2000), 207, pp.129-143
- [153] Rafferty TS, McKenzie RC, Hunter J, Howie AF, Arthur JR, Nicol F, Beckett GJ
Differential expression of selenoproteins by humanskin cells and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death
Biochem.J. (1998), 332, pp.231-236
- [154] Rayman MP
The Importance of selenium to human health
Lancet (2000), 356 (9225), pp.233-241
- [155] Reddy BS, Wynn TT, El-Bayoumy K et al.
Evaluation of Organoselenium Compounds for Potential Chemopreventive Properties in Colon Cancer
Anticancer Research (1996), 16, pp.1123-1128
- [156] Reddy BS
Possible Mechanisms by Which Pro- and Prebiotics Influence Colon Carcinogenesis and Tumor Growth
J. Nutr. (1999), 129, pp.1478S-1482S
- [157] Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A et al.
APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits"
Proc. Natl. Acad. Sci. (2000?), 97 (7), pp. ?
- [158] Russo MW, Murray SC, Wurzelmann JI, Woosley JT, Sandler RS
Plasma Selenium Levels and the Risk of Colorectal Adenomas
Nutrition and Cancer (1997), 28 (2), pp.125-129
- [159] Sachdev Weiss S, Sunde RA
Selenium regulation of transcript abundance and translational efficiency of glutathione peroxidase-1 and -4 in rat liver
Biochemical Journal (2001), 357 (3), pp.851-858

- [160] Saeterdal I, Bjorheim J, Lislud K, Gjertsen MK, Bukholm IK, Olsen OC et al.
Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer
Proc. Natl. Acad. Sci. (2001), 98, pp.13255-13260
- [161] Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, Watanabe Y, Suzuki M, Saito E, Takahashi K
Selenoprotein P in Human Plasma as an Extracellular Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase
Journal of Biological Chemistry (1999), 274 (5), pp.2866-2871
- [162] Salganik RI
The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanism in cancer patients and the human population
J. Am. Coll. Nutr. (2001), 20 (5), pp.464S-472S
- [163] Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, Robertson MA, Schaffer D, Nichols M et al.
The Colon Cancer Burden of Genetically Defined HNPCC
Gastroenterology (2001), 121, pp.830-838
- [164] Samowitz WS, Curtin K et al.
Microsatellite Instability in Sporadic Colon Cancer Is Associated with an Improved Prognosis at the Population Level
Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention (2001), 10, pp.917-923
- [165] Samowitz WS, Holden JA, Curtin K et al.
Inverse Relationship between Microsatellite Instability and K-ras and p53 Gene Alterations in Colon Cancer
American Journal of Pathology (2001), 158, pp.1517-1524
- [166] Sasakura C, Suzuki KT
Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P
J Inorg Biochem (1998), 71 (3-4), pp. 159-162
- [167] Scheinert P
PCR –Die Polymerasekettenreaktion
BioTec (1997), 3
- [168] Scheinert P
Primerdesign und Wahl stringenter Reaktionsbedingungen
BioTec (1997), 4
- [169] Scheinert P, Schalk HJ, Kroll C
Optimierung der PCR-Amplifikation komplexer Mischungen durch spezifitätssteigernde Additive und Temperaturgradienten-PCR
BioTec (1997), 5
- [170] Schrauzer GN
Anticarcinogenic effects of selenium
Cellular and Molecular Life Sciences (2000), 57, pp.1864-1873
- [171] Schweizer P, Moisio A-L, Kuismanen S, Truninger K, Vierumäki R et al.
Lack of MSH2 and MSH6 characterizes endometrial but not colon carcinomas in HNPCC
Cancer Research (2001), 61, pp.2813-2815
- [172] Scieszka M, Danch A, Machalski M, Drozd M
Plasma selenium concentration in patients with stomach and colon cancer in the Upper Silesia Neoplasma (1997), 44 (6), pp. 395-397

- [173] Shim KS, Kim KH, Han WS, Park EB
Elevated Serum Levels of Transforming Growth Factor- β 1 in Patients with Colorectal Carcinoma
Cancer (1999), 85 (3), pp.554-561
- [174] Sies H, Arteel GE
Interaction of Peroxynitrite with Selenoproteins and Glutathione Peroxidase mimics
Free Radical Biology & Medicine (2000), 28, pp.1451-1455
- [175] Slattery ML, Anderson K, Curtin K et al.
Lifestyle factors and Ki-ras mutations in colon cancer tumors
Mutation Research (2001), .483, pp.73-81
- [176] Stoler DL, Chen N, Basik M, Kahlenberg MS et al.
The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression
Proc. Natl. Acad. Sci. (1999), 96 (26), pp.15121-15126
- [177] Suzuki KT, Sasakura C, Yoneda S
Binding sites for the (Hg-Se) complex on selenoprotein P
Biochim Biophys Acta (1998), 1429 (1), pp.102-112
- [178] Tamura T, Stadtmann TC
A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996), 93, pp.1006-1011
- [179] Tannergard P, Liu T, Weger A, Nordenskjöld M, Lindblom A
Tumorigenesis in colorectal tumors from patients with HNPCC
Hum.Genet. (1997), 101, pp.51-55
- [180] Trainer DL, Kline T et al.
Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines
Int. J. Cancer (1988), 41 (2), pp.287-296
- [181] Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y et al.
High levels of transforming growth factor β 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression
Gastroenterology (1996), 110 (2), pp.375-382
- [182] Tujebajeva RM, Copeland PR, Xu X-M, Carlson BA, Harney JW et al.
Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion
EMBO Reports (2000), 1 (2), pp.158-163
- [183] Tujebajeva RM, Harney JW, Berry MJ
Selenoprotein P Expression, Purification, and Immunochemical Characterization
Journal of Biological Chemistry (2000), 275 (9), pp.6288-6294
- [184] Tujebajeva RM, Ransom DG, Harney JW, Berry MJ
Expression and characterization of nonmammalian selenoprotein P in the zebrafish 'Danio rerio'
Genes to Cells (2000), 5, pp. 897-903
- [185] Ueda Y, Matsumoto K, Endo K
Evidence of Hepatic Endogenous Hydrogen Peroxide in Bile of Selenium-Deficient Rats
Biochemical and Biophysical Research Communications (2000), 271, pp.699-702
- [186] Ursini F, Heim S, Kiess M et al.
Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation
Science (1999), 285, pp.1393-1396

-
- [187] Wang Q, Lasset C, Desseigne F, Saurin J-C, Maugard C et al.
Prevalence of germline mutations of hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2, and hMSH6 genes in 75 French kindreds with HNPCC
Hum.Genet. (1999), 105, pp.79-85
- [188] Wang T-G, Gotoh Y, Jennings MH, Rhoads CA, Aw TY
Lipid hydroperoxide- induced apoptosis in human colonic CaCo-2 cells is associated with early loss of cellular redox balance
FASEB J. (2000), 14, pp.1567-1576
- [189] Watson P, Lin KM et al.
Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members
Cancer (1998), 83, pp.259-266
- [190] Willett WC
Diet and Cancer
The Oncologist (2000), Vol.5, pp.393-404
- [191] Winnefeld K
Selen, Antioxidantienstatus und Radikale/ reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin
Medizinische Klinik (1997), 92, pp.8-10
- [192] Woodford-Richens KL, Rowan AJ, Gorman P, Halford S, Bicknell DC, Wasan HS et al.
SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001) early edition
- [193] Wright CM, Dent OF, Barker M et al.
Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer
Br. J. Surg. (2000), 87, pp.1197-1202
- [194] Wu AH, Shibata D, Yu MC, Lai M-Y, Ross RK
Dietary heterocyclic amines and microsatellite instability in colon adenocarcinomas
Carcinogenesis (2001), 22 (10), pp.1681-1684
- [195] Yang X, Hill KE, Maguire MJ, Burk RF
Synthesis and secretion of selenoprotein P by cultured rat astrocytes
Biochimica et Biophysica Acta (2000), 1474, pp.390-396
- [196] Yasui Y, Hasada K, Yang J-G, Koiwai O
Structure and organization of the gene encoding human selenoprotein
Gene (1996), 175, pp. 269-270
- [197] Zimmermann T, Albrecht S, Lauschke H, Ludwig K
Reaktive Sauerstoffspezies in der Pathogenese gastrointestinaler Tumoren (Verlaufsstudie)
Med. Klinik (1995), 90, pp.15-18

Danksagung

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. F. Jakob für die Überlassung des Themas, Durchsicht und Begutachtung des Manuskriptes

Herrn Prof. Dr. M. Scheurlen für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung

Herrn Prof. Mostert, Medizinisches Institut für Umwelthygiene der Universität Düsseldorf, für die Überlassung der Blutproben

Institut der Pathologie der Universität Würzburg für die Bereitstellung der Gewebeproben und insbesondere Herrn Dr. Thalheimer und Dr. Katzenberger, für die Beurteilung der Tumorpräparate

Frau Dr. K. Köhler, A. Fleder, P. Seeberger und Mitarbeitern der klinischen Forschergruppe für die technische Anleitung und Unterstützung

Frau N. Üçeyler für die Zusammenarbeit bei der Etablierung der Methoden und Materialaufbereitung

und ganz besonders

Herrn Dr. O. Al-Taie für Betreuung, Unterstützung, Beistand, konstruktive Kritik und vieles mehr.

Veröffentlichungen

Al-Taie, O., Treis, H., Mörk, H., Üçeyler, N., Eussner, U., Mentrup, B., Mostert, V., Thalheimer, A., Scheurlen, M., Köhrle, J., Jakob, F.

Selenoprotein P Promotor – genetische Instabilität und Polymorphismen im Rahmen der kolorektalen Karzinogenese

Z Gastroenterol., 2000; 38(8): 723 A260

Al-Taie, O., Mörk, H., Treis, H., Seufert, J., Eussner, U., Üçeyler, N., Thalheimer, A., Mostert, V., Scheurlen, M., Köhrle, J., Jakob, F.

Analysis of the Selenoprotein P promoter in colorectal carcinogenesis

Gastroenterology, 2000; 118 (Suppl), 1544 (Abstract)

Al-Taie, O., Üçeyler, N., Eussner, U., Mörk, H., Scheurlen, M., Thalheimer, A., Starostik, P., Mostert, V., Fleder, A., Kraus, M., Hau, M., Jakob, F., Köhrle, J.

Analyse der gastrointestinalen Glutathionperoxidase in Kolonkarzinomen und Kolonkarzinomzelllinien des Tumorsuppressor- und des Mutator-Pathways

Z Gastroenterol., 2001; 39: 709 (Abstract)

Al-Taie, O., Eussner, U., Üçeyler, N., Mörk, H., Scheurlen, M., Thalheimer, A., Starostik, P., Mostert, V., Fleder, A., Kraus, M., Hau, M., Jakob, F., Köhrle, J.

Analyse des Selenoprotein P Gens in Kolonkarzinomen und Kolonkarzinomzelllinien des Tumorsuppressor- und des Mutator-Pathways

Z Gastroenterol., 2001; 39: 709 (Abstract)

Al-Taie, O., Eussner, U., Üçeyler, N., Scheurlen, M., Abel, J., Thalheimer, A., Starostik, P., Köhrle, J., Jakob, F.

Alterations of Expression of SeP and GI-GPx during Colorectal Carcinogenesis Are Not Caused by Genetic Alterations

Postervorstellung: Internationale "Digestive Disease Week - 2002" der American Gastroenterological Association (AGA), San Franzisko

Al-Taie, O., Üçeyler, N., Eussner, U., Jakob, F., Scheurlen, M., Köhler, K., Katzenberger, T., Mörk, H., Mostert, V., Köhrle, J.

Studies on expression and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx, SePP and TrxR during colorectal carcinogenesis (Manuskript in Vorbereitung)

Lebenslauf

Name: Ursula Eußner

Geboren am 30. Dezember 1976 in Bad Kissingen (Bayern)

Schulbildung:

Sept. 1983 – Juli 1987: Volksschule Thundorf

Sept. 1987 – Juli 1996: Johann-Philipp-von-Schönborn-Gymnasium, Münnerstadt

Juli 1996: Abitur

Studium:

Seit Oktober 1996: Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

September 1998: Ärztliche Vorprüfung

September 1999: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

September 2001: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr: 1. Terial (Oktober 2001 bis Februar 2002): Anästhesie, Universität Würzburg
2. Terial (Februar bis Juni 2002): Chirurgie, Kant. Spital Wolhusen, Schweiz
3. Terial (Juni bis September 2002): Innere Medizin, Juliusspital Würzburg

Oktober 2002: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktika im Rahmen des Studiums:

Pflegepraktikum: St. Elisabeth-Krankenhaus, Bad Kissingen (Oktober 1996, Januar 1997)

Famulaturen: Innere Medizin, Med. Poliklinik, Würzburg (März und September 1999)
Gynäkologie und Geburtshilfe, Würzburg (Praxisfamulatur, März 2000)
Geriatrische Rehabilitationsklinik der AWO, Würzburg (August 2000)
Neurologische Klinik, Bad Neustadt (Februar / März 2001)

Sonstiges:

Kursus für Häusliche Pflege (Februar bis April 1996)

Ausbildung als Schwesternhelferin (Januar 1997)

Mitarbeit im Altenheim St. Thekla, Würzburg (Juli 1997 bis September 1998)

Mitarbeit in der Sozialstation Liborius Wagner, Stadtlauringen

Würzburg, den 22. November 2002