

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

Expression von MTUS1 in Kolorektalen Karzinomen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Philipp Wilke

aus Nürnberg

Würzburg, Oktober 2015

Referent: PD Dr. Ralph Melcher

Koreferent: Prof. Dr. Ingo Klein

Koreferent: Prof. Dr. Christoph Otto

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Kolloquium: 22.06.2018

1. Gliederung

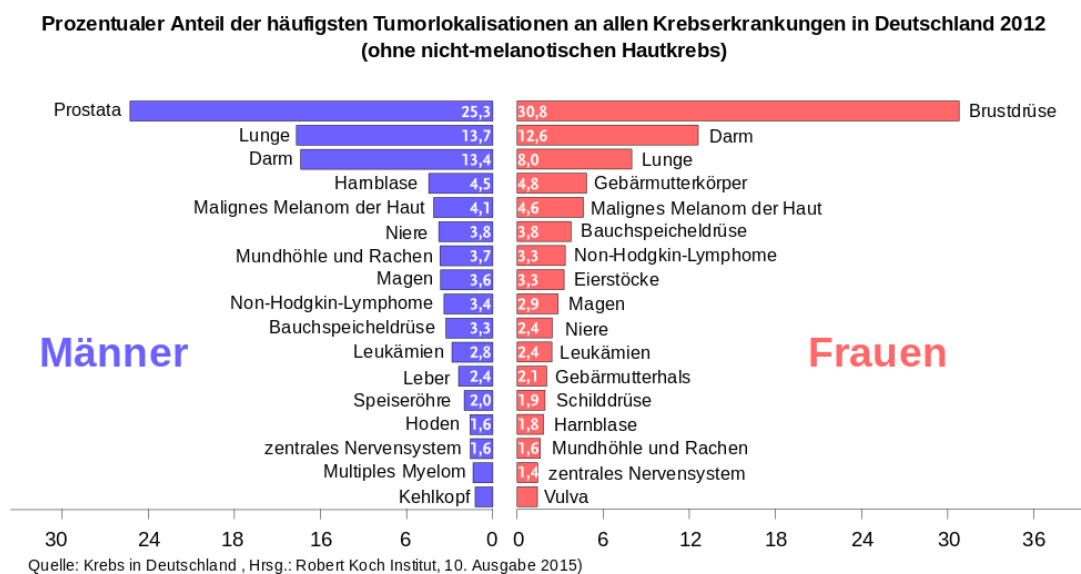
1. Einleitung.....	3
1.1 Tumorentstehung	3
1.2 Das Kolonkarzinom	5
1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	5
1.2.2 Genetik des Kolonkarzinoms.....	6
1.3 MTUS1	9
1.3.1 Das MTUS1 Gen.....	9
1.3.2 Die Rolle von MTUS1 in der Zellproliferation.....	10
1.3.3 MTUS1 als Tumorsuppressorgen.....	11
2. Problemstellung.....	13
3. Material und Methoden.....	14
3.1 Material	14
3.2 Geräte und Zubehör	16
3.3 Tumorgewebe	17
3.4 Methoden	18
3.4.1 Herstellung von Dünnschnitten.....	19
3.4.2 Entparaffinieren	19
3.4.3 Vorbehandlung	20
3.4.4 Proteinblock.....	20
3.4.5 Primärantikörper.....	21
3.4.6 Sekundärantikörper	21
3.4.7 Entwicklung und Färbung.....	22
3.4.8 Aufsteigende Alkoholreihe.....	23
3.4.9 Eindecken.....	23
4. Ergebnisse	24
4.1 LOH-Analyse.....	24
4.1 Immunhistochemische Färbung	25
4.2 Beispiele.....	29
5. Diskussion	30
5.1 MTUS1 wird nicht nach Mechanismen der Knudson-Hypothese inakiviert.....	30
5.2 Alternative Inaktivierungsmechanismen für MTUS1.....	31

6. Zusammenfassung.....	33
7. Abstract	34
8. Literatur	35
9. Anhang.....	46

1. Einleitung

1.1 Tumorentstehung

In den westlichen Industrienationen stellen maligne Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-erkrankungen dar (Statistisches Bundesamt 2016). Trotz immenser Fortschritte in den therapeutischen Bereichen (Chirurgie, Chemotherapie, Strahlentherapie, Hormontherapie, Immunologischer Therapie) liegt die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate für Krebserkrankungen in Deutschland für Frauen bei 67% und für Männer bei 62%. Ursächlich ergeben sich die Unterschiede zum einen durch die Art der Tumore, und zum anderen durch deren Häufigkeitsverteilung (Robert-Koch Institut 2015).



Die primären Eigenschaften einer malignen Krebserkrankung sind unkontrollierte Proliferation und invasives metastasierendes Wachstum des betroffenen Gewebes.

Die Entwicklung von Tumoren im Menschen ist ein komplexer Vorgang, der sich gewöhnlich über mehrere Dekaden erstreckt. Während dieses Prozesses erwirbt das Genom der Krebszellen mutierte Allele von Protoonkogenen,

Tumorsuppressorgenen und anderen Genen, die direkt oder indirekt die Zellproliferation beeinflussen (Weinberg et al., 2002). Aufgrund der Komplexität der Karzinogenese ist es nicht möglich, einzelne Genmutationen als Verursacher der Erkrankung zu benennen. Da es in Säugetierzellen mehrere „Sicherheitsprogramme“ zum Schutz vor für die Zelle letale Mutationen gibt, ist jede einzelne Mutation als ein Schritt zur Ausbildung eines invasiven Karzinoms anzusehen. (Vogelstein und Kinzler, 2004).

Genetische Veränderungen können sowohl in Keimzellen, als auch in somatischen Zellen entstehen. Kanzerogene Mutationen in Keimzellen führen zu einer vererbaren Prädisposition und damit zu einem erhöhten generellen Risiko für die Entstehung von Neoplasien.

Genetische Veränderungen, die eine Veränderung der Genexpression hervorrufen können auf verschiedenen Ebenen des Genoms entstehen. So können Chromosomenaberrationen, -translokationen, -deletionen oder -transversionen die Chromatinstruktur, und Mutationen auf DNA Ebene einzelne Gene betreffen, die dann deren Expressionsverhalten verändert.

Eine Rolle in der Karzinogenese spielt der Verlust der Heterozygotität („loss of heterozygosity“ - LOH). Dieser steht für den Verlust eines Allels auf einem der beiden Chromosomen. Prädisponiert sind Tumore mit Regionen chromosomaler Instabilität. Hier kommt es zu partiellen, oder totalen Deletionen von chromosomalen Abschnitten. Hierdurch kann es zu einem „first hit“ kommen, im Rahmen dessen ein Allel eines Tumorsuppressorgens ausgeschaltet wird. Dies ist der erste Schritt der, von Knudson 1971 definierten „Two-Hit-Hypothese“, bei der eines der Allele eines Gens ausgeschaltet wird. Wird das zweite Allel durch eine Deletion, Mutation, oder epigenetische Veränderungen ausgeschaltet, kommt es zum vollständigen Funktionsverlust des Gens.

Dieses Prinzip liegt der Identifizierung potentieller Kandidaten für Tumorsuppressorgene zugrunde. Hierbei wird zur LOH-Analyse ein Mikrosatellitenmarker (DNA-Repeats von 2-4 bp) untersucht, der im oder im nahen Umfeld des zu untersuchenden Gens liegt. Bei einem LOH des Markers kann ein mögliches Tumorsuppressorgen identifiziert werden. Wird bei mehreren Patienten mit gleicher Tumorentität signifikant häufiger ein solcher LOH festgestellt, lässt sich hieraus auf ein, für die Tumorgenese relevantes

Gen schließen. Erstmals bewiesen wurde dieses Prinzip beim Retinoblastom-Gen (Cavenee et al., 1983).

Ursächlich für die Akkumulation von Mutationen sind zum Beispiel mutagene Substanzen wie Benzol, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder Nitrosamine. Andere sind energiereiche Strahlung in Form von radioaktiven Strahlen oder ultraviolettem Licht. Ebenso chronische Entzündungen oder eine falsche Ernährung, die zu viel tierisches Fett und zu wenig Obst und Gemüse beinhaltet, können zur Mutagenese durch vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen führen. Die so erworbenen Mutationen beeinflussen die Zelldifferenzierung und Zellproliferation und können zur Ausbildung eines Karzinoms führen (Hermann et al, 2003; Lawrence et al, 2001).

1.2 Das Kolonkarzinom

1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das kolorektale Karzinom ist der vierthäufigste Tumor der industrialisierten Welt, und deren zweithäufigste Krebstodesursache. Die Inzidenz liegt in Deutschland bei 50 pro 100.000 Einwohner und Jahr, mit einer durchschnittlichen Todesrate von ca. 24.000 Menschen pro Jahr. Das häufigste Erkrankungsalter liegt zwischen 50 und 80 Jahren. Ohne familiäre Belastung liegt das „Life-time-risk“ bei 4-6%, wobei Männer stärker vertreten sind als Frauen (Müller et al, 2006/07; Rougier et al., 2003).

Verschiedene Risikofaktoren tragen zu der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms bei. Hereditäre genetische Erkrankung wie HNPCC ("hereditary non-polyposis Colorectal Cancer") und AFP ("Familäre adenomatöse Polypose") (s.1.2.2.) erhöhen die Wahrscheinlichkeit auf bis zu 100%. Weitere Risikofaktoren sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Adipositas, zu fetthaltige Kost (zu wenig Gemüse- und Vollkornprodukte), mangelnde körperliche Aktivität, regelmäßiger Alkoholkonsum, u.a. (Weinberg et al, 2008; Xie et al, 2008).

1.2.2 Genetik des Kolonkarzinoms

Wie bereits erwähnt, unterscheidet man drei spezifische Muster im Rahmen der Kolonkarzinomentstehung: sporadisch, (monogen) vererbt und familiär gehäuft. Den monogen vererbten Formen des Kolonkarzinoms liegen Mutationen eines bekannten Gens zugrunde. Sie machen weniger als 10% der Tumore aus. Ca. 25% der Dickdarmkarzinome entstehen vor einem manifesten familiären Erkrankungshintergrund, sind damit zu häufig um als zufällig zu gelten, allerdings liegt kein monogener Erbgang vor. Wahrscheinlich spielen Polymorphismen einzelner Gene eine Rolle und zusätzlich modulierende Umweltfaktoren im Sinne einer multifaktoriellen Vererbung (Calvert et al, 2002; Alexandria et al, 1998). Zwei Drittel der Tumore sind sporadischer Natur. Die Entstehung eines solchen Tumors läuft in einem mehrstufigen Prozess ab. Er beginnt mit einem Polypen der sich im Zuge der Transformation der Zellen über ein Adenom, zu einem Karzinom hin entwickelt (Fearon et al, 1990; Spies et al, 1999) (Abbildung 2). Im Laufe dieser Karzinogenese akkumulieren mindestens vier bis fünf genetische Mutationen die der betroffenen Kolonzelle einen Selektionsvorteil verschaffen. Obwohl, während dieses Prozesses sich die Mutation einzelner Gene, wie APC (Kastan et al, Bastek et al, 2004) in der Regel eher früh, und die anderer wie p53 (Kaelin et al, 1999; Greenblatt et al, 1994; Kastan et al, 2007) eher spät ereignen, ist die Akkumulation wichtiger als die Reihenfolge ihres Eintretens (Lee et al, 2006).

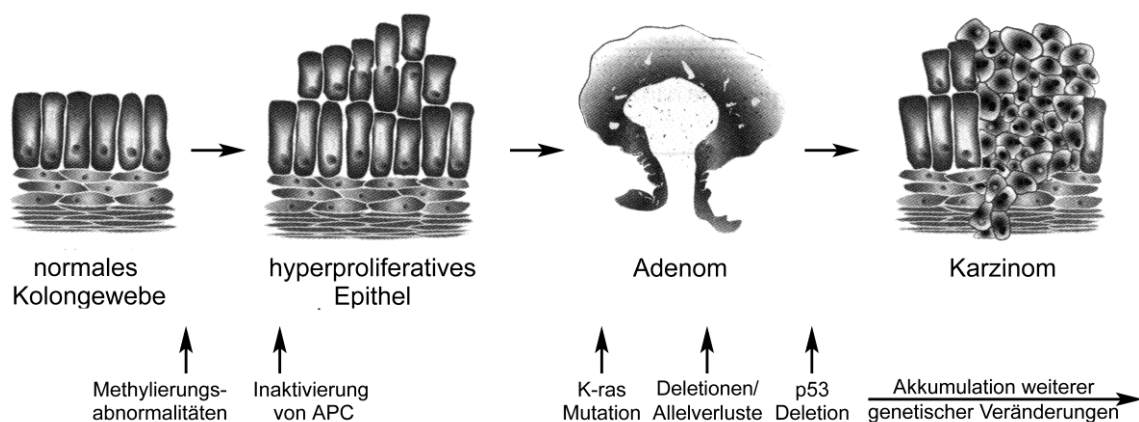


Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz (Abbildung aus Spieß et al; 1999).

Zu den Onkogenen die häufig in Kolonkarzinomen betroffen sind, gehört das Kinase-Gen RAS auf dem Chromosom 12. Das Protein Ras fungiert als ein Schalter der extrazelluläre Wachstumssignale leitet. Mutationen dieses Gens sind in beinahe 50% der kolorektalen Tumoren zu finden (Rodenhuis et al, 1992). Weitere häufig involvierte Onkogene sind c-myc, src und c-erbB2 (Tortola et al, 1999).

Das Tumorsuppressorgen APC kodiert ein Protein, das das β -Catenin-Protein inhibiert. Dieses wiederum ist an der Kontrolle von Zellsignaltransduktion und Zellwachstum beteiligt. Die Mutation des APC-Gens steht häufig am Beginn der Karzinogenese und ist entscheidend für die Zelltransformation. Es ist deswegen auch als „gatekeeper“-Gen bekannt (Mimori-Kiyosue et al, 2001).

In bis zu 70% der Kolonkarzinome ist p53 mutiert. Diese Beobachtung spielt eine entscheidende Rolle, da Patienten mit dieser Diagnose eine schlechtere Prognose haben als Betroffene ohne p53-Mutationen (Tabelle 1) (Kreesner et al, 1999).

	Karzinom (%)	Adenom (%)
Ras	20 - 38	
APC	50 – 83	20 – 80
p53	41 – 69	4 – 26
MSI	15 - 17	

Tabelle 1: Häufigkeit der Genmutationen von Ras, APC, p53 und Mikrosatteliteninstabilität in sporadisch entstanden Adnemomen, bzw. Karzinomen des Kolons (Levin et al; 2006).

Ein weiteres Tumorsuppressorgen das eine Rolle in der Karzinogenese spielt ist DCC (deleted in colorectal carcinoma). Dieses auf dem Chromosom 18 gelegene Gen ist in bis zu 70% der Kolontumore mutiert. Es ist bei Zell-Zell Interaktionen und intrazellulärer Signaltransduktion beteiligt und kann Apoptose induzieren (Mehlen et al, 2004).

Neben den genannten Genen wurden zahlreiche weitere Gene identifiziert, deren Expressionsverhalten sich im Laufe der Kolon-Adenom-Karzinom-

Sequenz verändert. Dabei wird die Produktion des kodierten Proteins zum Teil hoch-, oder herunterreguliert. Das Verhalten der einzelnen Gene unterscheidet sich aber auch je nach Progressionsstufe innerhalb der Sequenz (Lee et al, 2006).

Hereditäre Kolonkarzinomsyndrome sind zum Beispiel HNPCC und FAP. Bei beiden werden Genmutationen in den Keimzellen an die Nachkommen weitergegeben. Das APC-Gen wird bei der FAP dominant vererbt. Betroffene Personen entwickeln hunderte von Polypen. Trotz der niedrigen Transformationsrate der Polypen entwickeln sich bis zum 50. Lebensjahr in fast 100% der Patienten Karzinome. Im Falle des HNPCC-Syndroms ist das „DNA mismatch-repair“-System betroffen. Dies führt zur Mikrosatelliteninstabilität und Replikationsfehlern. Die damit verbundene genomweite Erhöhung von Mutationen bedeutet ein Karzinomrisiko von 70-80% für betroffene Personen. Grundlegend sind auch hier Keimbahnmutationen, in diesem Fall Gene der Familien hMSH und hMLH (Loeb et al, 1991; Markowitz et al, 2000; Mecklin et al, 2008).

1.3 MTUS1

1.3.1 Das MTUS1 Gen

Das Mitochondriale Tumor Suppressorgen 1 (MTUS1) ist ein in den letzten Jahren identifizierter Kandidat für ein neues Tumorsuppressorgen. Es ist auf dem „reverse“-Strang des kurzen Armes des Chromosoms 8 in Position p21.3-p22 (17545585-17657750) lokalisiert. Die kodierende Sequenz erstreckt sich über eine Länge von 112 kb und verteilt sich über 12 Exons, mit variierenden Größen von 39 bp (Exon7) bis 2,3 kb (Exon 17). Alle Donor- und Acceptor-Splicingstellen entsprechen der GT-AG Regel. Durch alternatives Splicing ergeben sich fünf unterschiedliche Produkte: ATIP1, ATIP2, ATIP3a, ATIP3b und ATIP4. Diese können aufgrund ihrer unterschiedlichen 5' Exons in drei Klassen unterteilt werden: ATIP1, ATIP3 (ATIP2, ATIP3a, ATIP3b) und ATIP4 (Benedetto et al 2006).

Die 5' nicht kodierenden Regionen und das ATG Startkodon der Transkripte ATIP1, ATIP3 und ATIP4 befinden sich in den Exons 8, 1 und 5. Aufgrund des Abstandes von mehreren Kilobasen und der unterschiedlichen gewebespezifischen Expression geht man von drei verschiedenen Promotoren aus, die aber noch nicht identifiziert sind. Die exprimierten Produkte teilen sich Exon 9-17, unterscheiden sich aber in ihrer N-terminalen Region. Je nach Splice kombination und 5'-Exon besitzen sie unterschiedliche Eigenschaften. So kodiert Exon 5 (ATIP4 spezifisch) eine Sequenz, aus 25 hydrophoben Aminosäuren, die von geladenen Aminosäuren flankiert wird. Dies macht ATIP4 zu einem Transmembranprotein. Splicing von Exon 7 zu Exon 6 führt zu einem Zellkernlokalisierungssignal (ATIP3a). Exon 8 kodiert für den N-Terminus von ATIP1 und beherbergt eine Mitochondriumzielsequenz. Dies deutet auf eine unterschiedliche Verteilung in verschiedene subzelluläre Kompartimente hin. Die allen von MTUS kodierten Proteinen gemeinsame C-terminale Region enthält coiled-coil-Motive und Leucin-Zipper-Motive; diese ermöglichen Interaktionen mit Proteinen und der DNA (Seibold et al, 2003). MTUS1 wird in einer großen Bandbreite sowohl von normalem adultem als auch von fetalem menschlichem Gewebe expremiert, wobei die höchsten Level im zentralen Nervensystem und in der Plazenta zu finden sind. Hohe bis moderate Level sind auch in anderem Gewebe wie Sklettmuskel, Prostata, Blase, Kolon oder Uterus gefunden worden. Die verschiedenen Varianten zeigen dabei ein unterschiedliches Verteilungsmuster in den einzelnen Organen/Geweben (Benedetto et al, 2006; Rogler et al, 2014).

1.3.2 Die Rolle von MTUS1 in der Zellproliferation

Das Tumorsuppressorgen MTUS1 kodiert für eine Familie von Proteinen, die aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften befähigt sind, sowohl mit anderen Proteinen als auch mit DNA zu interagieren. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass sie eine Rolle im Rahmen der Zellproliferation spielen. Eines ihrer Partnermoleküle ist der Angiotensin-Rezeptor 2 (AT2).

Der AT2-Rezeptor agiert als ein Antagonist zum AT1-Rezeptor. Beide sind G-Protein gekoppelte Proteine. AT1 hat neben seinen kardiovaskulären Effekten auch trophische Eigenschaften. Über multiple intrazelluläre Signalkaskaden übt er einen mitogenen Einfluss in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen aus. AT2 dagegen reguliert die Zellproliferation herunter. Er wirkt antiproliferativ und proapoptotisch (Landon et al, 2005). Dieser anti-proliferative Effekt des AT2 wird wahrscheinlich über die Aktivierung von Tyrosinphosphatasen und die Hemmung von Kinasen geregelt, was zu einer Inaktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK2) führt. Eine der an den AT2 gekoppelten Phosphatasen, SHP-1, spielt eine zentrale Rolle in der, durch AT2 gestarteten Signalkaskaden. Sie hemmt die durch AT1 induzierten PYK2 und Jun-Kinasen, die durch Insulin aktivierten PI3K, Akt und die Tyrosinkinase des EGFR. Des Weiteren interagiert AT2 auch negativ mit Rezeptortyrosinkinasen von bFGF (basic fibroplastic growth factor), EGF (epidermal growth factor) und Insulinrezeptoren durch eine frühe Störung der Signaltransduktion. Die intrazellulären Effekte des AT2-Rezeptors können auch unabhängig von G-Proteinen durch andere intrazelluläre Signalwege bewirkt werden. Alle vier Isoformen des ATIP-Proteins können über ihre coiled-coil-Region mit dem AT2-Rezeptor interagieren. Es wurde gezeigt, dass ATIP in primären Zellen, die mit Wachstumsfaktoren wie Insulin, bFGF, PDGF, oder EGF behandelt wurden, einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation ausübt (Nouet et al, 2004). Die dabei beobachteten Effekte ähneln denen des AT2-Rezeptors, wobei der inhibitorische Einfluss von ATIP die Expression, nicht aber die Aktivierung des AT2-Rezeptors benötigte. Die Stimulation mit Angiotensin II führt zu einer Verstärkung der vermittelten Effekte. Dies lässt vermuten, dass ATIP mit dem AT2-Rezeptor kooperiert, um durch Inhibierung des Rezeptor-Tyrosinkinase-(RTK)-Signalwegs die Zellproliferation zu regulieren. Da die verschiedenen ATIP-Varianten in jeder Art von menschlichen Gewebe expremiert werden, und der AT2-Rezeptor nur in bestimmten, lässt sich vermuten, dass ATIP auch andere AT2 unabhängige Funktionen besitzt (Nouet et al, 2004; Wruck et al, 2004; Benedetto et al, 2006).

1.3.3 MTUS1 als Tumorsuppressorgen

Die in 1.3.2 beschriebenen Eigenschaften der MTUS1-Produkte legen nahe, dass sie eine Rolle in der Karzinogenese spielen. Das Gen liegt in einer Region die als Lokalisation von Tumorsuppressorgen gilt. Das Gen MTUS1 ist 0,9 MB vom Marker D8S254 entfernt lokalisiert. Genetische Veränderungen in diesem Bereich (Chromosom 8p21.3-22) wurden für die Progression beim Mammakarzinom, Lungenkarzinom, Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom, Kolonkarzinom, Rektumkarzinom, Colonkarzinom, hepatozellulären Karzinom, Pankreaskarzinom, Blasenkarzinom und beim Prostatakarzinom beschrieben (Fujiwara et al, 1993; Bardi et al, 1993; Kerangueven et al, 1997; Chan et al, 2002; Suzuki et al, 1995; Wagner et al, 1997; Tamura et al, 2001; Zuern et al, 2010; Li X et al, 2014). Auch funktionell konnte die Existenz von Tumorsuppressorgen auf dem Chromosom 8 nachgewiesen werden. Der Transfer von gesunden Chromosom 8 in kolorektale Tumorzelllinien konnte die Malignität der Tumorzellen reduzieren. Ähnliches trifft auch auf das Metastasierungspotential von Prostatakarzinomzellen zu (Gustafson et al, 1996; Ichikawa et al, 1994).

MTUS1 wird in allen gesunden Geweben exprimiert. Auch in Geweben die eine Progression der Tumore beim Allelverlust von 8p21.3-22 gezeigt haben. Seibold et al. konnten eine deutliche Reduktion der MTUS1 Expression bzw. eine komplette Inaktivierung von MTUS1 in Tumorzelllinien und Tumorgewebe nachweisen. In verschiedenen Zelllinien des Pankreaskarzinoms konnte festgestellt werden, dass die MTUS1-Expression invers mit der Proliferationsrate und dem Differenzierungsgrad in unterschiedlichen Tumorzelllinien korreliert. Langsam proliferierende und gut differenzierte Tumorzelllinien zeigten wie Normalgewebe eine hohe MTUS1-Expression. Hingegen wiesen mäßig proliferierende und mäßig differenzierte Tumorzelllinien gegenüber Normalgewebe eine erniedrigte MTUS1 Aktivität auf. In der hochmalignen Pankreastumorzelllinie MiaPaCa-2 und in Gewebe eines Pankreaskarzinoms war MTUS1 komplett inaktiviert. Entzündlich verändertes Pankreasgewebe zeigt dagegen keine veränderte MTUS1-Expression, so dass eine den Tumor umgebende Entzündungsreaktion als Ursache für die MTUS1-Inaktivierung ausgeschlossen werden kann. Durch rekombinante Expressierung

konnte nachgewiesen werden, dass MTUS1 die Tumorzellproliferation signifikant inhibieren kann (Seibold et al, 2003).

Die Region 8p22-21.3 enthält mindestens 55 bekannte Gene, von denen einige Kandidaten für Tumorsuppressorgene sind. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass MTUS1 sowohl in verschiedenen Tumorzelllinien wie auch menschlichen Tumorgewebe eine reduzierte Expression aufweist. In einer Reihe von squamösen Kopf- und Halszelltumoren zeigte sich, dass Mutationen wahrscheinlich eine wesentliche Rolle bei der Reduktion der MTUS1-Expression spielen (Ye et al, 2007). In anderen Karzinomen wie dem hepatozellulären Karzinom wurden ebenfalls Punktmutationen sowohl innerhalb, als auch außerhalb der Exons entdeckt, die teilweise auch zu Veränderungen des Splice-Verhaltens führen (Benedetto et al, 2006).

Die Tatsache, dass die Region 8p21.3-p22 in vielen Tumorentitäten in Progression und Initiation des Tumor involviert ist und die Funktion, die die Produkte des MTUS1- Gens in den Bereichen Zelldifferenzierung und Zellproliferation innehaben, zeigt, dass das MTUS1-Gen eine Rolle bei der Karzinogenese spielt.

2. Problemstellung

Das Mitochondriale Tumor Suppressorgen 1 (MTUS1) wird in ausdifferenzierten Zellen des menschlichen Körpers exprimiert. Durch die Zusammenarbeit der MTUS1-Proteine mit dem AT2-Rezeptor wirken sie hemmend auf eine Vielzahl proliferativ wirkender Signalkaskaden ein und führen dazu, dass die Zellen in den „senescence“ Zustand übergehen. MTUS1 ist auf dem Chromosom 8 in Position p21.3-p22 (17545585-17657750) lokalisiert. Diese Region ist eine häufig deletierte Region bei kolorektalen Karzinomen. Tumorsuppressorgene sind in häufig deletierten Regionen lokalisiert, da sie typischerweise durch eine Mutation des einen Allels und Deletion des zweiten Allels inaktiviert werden (LOH - "loss of heterozygosity"). Über eine mögliche Rolle von MTUS1 bei kolorektalen Karzinomen ist bisher nur wenig bekannt. In Vorarbeiten wurden bei der Charakterisierung von 168 Tumoren 14 Tumore mit einem allelischen Verlust bei 8p21.3-p22 identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit sollen diese Karzinome auf eine Inaktivierung des MTUS1-Gens untersucht werden. Falls das MTUS1-Gen ein für das kolorektale Karzinom relevantes Tumorsuppressorgen ist und durch typische Mechanismen (Knudson-Hypothese - Mutation des ersten Allels gefolgt von der Deletion des zweiten Allels) inaktiviert wird, sollte es in den untersuchten Karzinomen nicht mehr exprimiert werden. Als erstes Ziel werden die Tumore mit einem putativen Verlust der Region 8p21.3-p22 nochmals mittels LOH-Analyse überprüft. Die primäre Aufgabe dieser Arbeit ist die Etablierung einer immunhistochemischen Färbung der Proben. Da von dem gesammelten Gewebe keine RNA vorliegt, wird zur Analyse der Expression ein Antikörper gegen MTUS1 verwendet. Anschließend werden die entsprechenden Paraffinblöcke in der Pathologie herausgesucht, Schnitte angefertigt und die Färbung durchgeführt. Die Ergebnisse der Immunhistochemie werden mit den Ergebnissen der LOH-Analyse verglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Agarose „peq GOLD Universal Agarose“	PeqLab, Erlangen (GER)
Aqua Delta Select	Delta Select, Rimbach (GER)
BSA Albumin Bovine	Serva, Heidelberg (GER)
DAB	Serva, Heidelberg (GER)
Deckgläser (24 x 50 mm)	Menzl-Glaser, Braunschweig (GER)
Diluent	BioGenex, Mainz (GER)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (GER)
DNAeasy® Tissue Kit	Qiagen, Hilden (GER)
DNS-Längenstandard bis 400 Bp für Sequencer	Beckman Coulter, CA (USA)
DNS-Längenstandard für Gelelektrophorese	Promega, Mannheim (GER)
DNTP	Promega, Mannheim (GER)
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
EDTA 0,5M pH 8.0	Gibco BRL, Eggenstein (GER)
Entellan	Merck, Darmstadt (GER)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
Ethanol absolute	J.T. Baker, München (GER)
H ₂ O ₂ Suprapur Wasserstoffperoxid 30	Merck, Darmstadt (GER)
Hämalaun	Merck, Darmstadt (GER)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (GER)
Kimteck Wischtücher	Kimberly-Clark, Telgte (GER)
Methanol	Roth, Karlsruhe (GER)
Mineral Oil	Beckman Coulter, Fullerton (USA)
Natriumchlorid: >99,5%	Merck, Darmstadt (GER)
Natronlauge 1N	Merck, Darmstadt (GER)

Absolute QPCR Mix	Abgene, Epsom (UK)
Salzsäure	Dako, Aachen (GER)
Seperation Buffer	Beckman Coulter, Fullerton (USA)
Silanisierte Objektträger	Dako, Aachen (GER)
Sample Loading Solution (SLS)	Beckman Coulter, Fullerton (USA)
Streptavidin (HRP) 0,83 g/l	Dako, Aachen (GER)
Target Retrieval Solution Ready to use	Roth, Karlsruhe (GER)
Tris-Base (Trishydroxymethyl-aminomethan)	Merck, Darmstadt (GER)
Tris-hydrochlorid >99%	BioGenex, Mainz (GER)
Universal Blocking Reagent (10X)	Fluka, Basel (CH)
Xylol Isomergemisch	Nephrologisches Labor, UKW (GER)
Primärantikörper: Polyklonal anti-human-MTUS1- Antikörper (Kaninchen)	Dako, Aachen (GER)
Sekundärantikörper: Polyklonal Goat-Anti-Rabbit Biothinyliert; 0,76g/l	Nephrologisches Labor, UKW (GER)
Primer D8S254	Sigma Proglia

3.2 Geräte und Zubehör

Abzug	Kern&Sohn, Balingen-Frommern (GER)
CEQ 8000 Sequenzer	Beckman Coulter, Fullerton, CA 92834-3100 USA
Eppendorf	Memmert, Schwabach (GER)
Feinwaage	Dako, Aachen (GER)
Feuchtekkammer	Dako, Aachen (GER)
Filterpapier	Dako, Aachen (GER)
Gerfrierschrank	Dako, Aachen (GER)
Glasküvetten	HGL, Düsseldorf (GER)
Heizplatte	Dako, Aachen (GER)
Küvetten (Glas)	Dako, Aachen (GER)
Küvetten (Plastik)	MS, Dielheim (GER)
Kühlschrank	Hartenstein, Würzburg (GER)
Magnetrührer	IKA-Labortechnik, Staufen (GER)
Mikroton	Dako, Aachen (GER)
Objektträger-Ständer (Glas)	Dako, Aachen (GER)
Objektträger-Ständer (Plastik)	Hartenstein, Würzburg (GER)
Ofen	Mettler Toledo, Giessen (GER)
PCR-Thermocycler	Applied Bio Systems, Foster City (USA)
pH-Meter	Hartenstein, Würzburg (GER)
Pinzetten	Eppendorff, Hamburg (GER)
Pipettenspitzen	Hartenstein, Würzburg (GER)
Schüttler	Hartenstein, Würzburg (GER)
Sequenzierer	Beckman Coulter, Fullerton (USA)
Trichter	Memmert, Schwabach (GER)
UV-Illuminator	Biometra, Göttingen (GER)
Wasserbad	Dako, Aachen (GER)
Zentrifugen	Sigma-Aldrich, München (GER)

3.3 Tumorgewebe

In den Jahren 2000-2004 wurde im Rahmen eines interdisziplinären Projektes der Medizinischen Klinik I und II, der Chirurgischen Klinik, dem Institut für Pathologie und dem Institut für Humangenetik 165 Tumore mit korrespondierender Normalschleimhaut gesammelt. Es folgte eine Charakterisierung auf allelische Verluste der chromosomalen Regionen 1p, 4p, 8p, 18q mit den Mikrosatellitenmarkern HYTM1 (1p32-36), D4S2397 (4p14-16), D5S346 (5q21), D8S254 (8p22) und D18S474 (18q21) Für diese Doktorarbeit wurden die Tumoren und die Normalschleimhaut der Subgruppe der Patienten mit einem allelischen Verlust im Bereich von 8p22 (n=14) verwendet (Tabelle 2).

Nr.	Geschlecht	Differenzierung	UICC-Stadium
1	M	2	2
2	M	2	3
3	M	2	3
4	M	2	4
5	M	2	2
6	W	2	1
7	M	2	4
8	W	3	1
9	M	2	4
10	W	3	4
11	W	2	4
12	W	2	4
13	M	2	3
14	M	2	3

Tabelle 2: Geschlecht, Differenzierung und Staging der Proben

3.4 Methoden

3.4.1 LOH-Analyse mittels Fragmentlängenanalyse

Es erfolgte zunächst eine DNA-Extraktion aus den durch die Pathologie zur Verfügung gestellten Proben des Tumors und der Normalschleimhaut. Im Anschluss daran wurde die DNA –Konzentration bestimmt und auf 10ng/µl verdünnt. Zur weiteren Analyse wurde die DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert. Der verwendete Primer D8S254 ist in der chromosomalen Region 8p22 lokalisiert (Tab. 4). Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophore verifiziert.

Primer	Region	Verlauf	Sequenz	Repeat	Markierung	Größe (bp)
D8S254	8p22	Forward	5'-TGC CGG ACA TAC ATT AGT GA	(CA) _n	Dye 4	55-75
		Reverse	5'-TTG TAA ACA CCA CAA GCA GG			

Tabelle 4: Eigenschaften des Mikrosatellitenprimer D8S254

Die LOH-Analyse erfolgte als Fragmentlängenanalyse an einem Sequenziergerät (CEQ8000, Beckmann Coulter, USA). Der Sequenzer arbeitet mit dem Prinzip der Glaskapillarelektrophorese. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist neben der angelegten Spannung auch vom pH, den Ausmaßen der Kapillare, sowie der Länge und Ladung der DNA-Fragmente abhängig. Die amplifizierten Fragmente wandern zu einem Detektierlaser. Dieser erkennt die mit Dye4 markierten ff-Primer und kann diese spezifischen Fragmentlängen zuordnen. Zeigen sich zwei Allele mit gleicher Fragmentlänge, so handelt es sich um homozygote Allelen. Zeigen sich unterschiedliche Fragmentlängen, handelt es sich um heterozygote Allele.

Die Bandenlage und Signalstärke der amplifizierten Fragmente wurden verglichen. Das Verhältnis der Allele in der Normalmukosa (Allel N1/2) und Tumor (Allel T1/2) wurde berechnet, und diese in Relation zueinander gestellt (Gleichung 1).

Allel N-1 <hr/> Allel N-2 <hr/> Allel T-1 <hr/> Allel T-2
--

Gleichung: N = Normalmukosa-DNA, T = Tumorschleimhaut-DNA. Die Werte entsprechen den Signalintensitäten der amplifizierten Alle-Fragmente bei Sequenzierung

3.4.2 Herstellung von Dünnschnitten

Die Tumorblöcke wurden in ein Microtom eingespannt. Die Schnittdicke wurde auf 3 µm eingestellt. Die produzierten Dünnschnitte wurden auf silanisierte Objektträger gelegt, und mit frisch angesetztem und filtriertem Streckwasser beträufelt.

Streckwasser:

- 40 ml A. d.
- 10 ml Aceton
- 500 µl Hühnereiweiß

Die Objektträger wurden anschließend für ca. fünf Sekunden auf eine Wärmeplatte (38 – 40 °C) gestellt. Die noch verbleibende Flüssigkeit wurde abgetropft. Dann wurden die Schnitte zum Antrocknen an den Rand der Wärmeplatte gelegt. Im Anschluss daran trockneten die Schnitte in einem Wärmeschrank (37°C) für drei Tage.

3.4.3 Entparaffinieren

Zum Entparaffinieren werden die Dünnschnitte zunächst für 30 Minuten in einen vorgeheizten Ofen erwärmt. Anschließend werden die Gewebeproben gewässert. Hierfür durchlaufen sie eine mit Xylol beginnende absteigende Alkoholreihe:

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

3.4.4 Vorbehandlung

Nach der Behandlung mit 70 % Alkohol werden die Dünnschnitte weiter vorbehandelt. Hierzu werden sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur in ein Gemisch aus Methanol (200 ml) und Wasserstoffperoxid H_2O_2 (5 ml) inkubiert. Im Anschluss daran erfolgt das Umsetzen der Objektträger in destilliertes Wasser. Danach werden sie in eine mit Ready-to-use-Buffer gefüllte Küvette gegeben. Die Schnitte müssen Vollständig bedeckt sein um eine Austrocknung zu verhindern. Dann werden sie für 30 Minuten in ein auf 90 °C vorgeheiztes Wasserbad gesetzt. Dabei wird alle 10 Minuten der Füllungsstand der Küvette geprüft, und gegebenenfalls Pufferlösung zugegeben. Die Küvette wird anschließend aus dem Wasserbad genommen. Sie kühlt dann für ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur ab.

3.4.5 Proteinblock

Nach der Vorbehandlung werden die Objektträger in ein PBS/BSA Gemisch überführt. Dieses wird am Tag des Versuchs angesetzt:

Ansatz für 1 Liter:

- Natriumchlorid (NaCl) 7,2 g
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na₂HPO₄) 1,48 g
- Kaliumhydrogenphosphat (KH₂HPO₄) 0,43 g
- A.d. 1 l
- pH auf 7,4 einstellen

- BSA

1 g

Die Dünnschnitte werden darin für 5 Minuten auf dem Schüttler gespült. Dies wird anschließend wiederholt.

Die Objektträger werden dann vorsichtig getrocknet. Hierzu lässt man zunächst das PBS/BSA-Gemisch abtropfen und trocknet mit Wischtüchern die Objektträger mit Ausnahme der Schnitte. Auf die Gewebeproben werden dann 100 µl einer Proteinblock-Lösung gegeben (10XProteinblock (Biogenex), 1:10 verdünnt mit A.d.). Die Gewebeproben werden so dann für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

3.4.6 Primärantikörper

Im Anschluss an die Behandlung mit dem der Proteinblock-Lösung werden die Dünnschnitte erneut für zweimal 1 Minute in neuer PBS/BSA Lösung gespült. Die Objektträger werden dann wie in 3.4.4 getrocknet. Währenddessen wird die Antikörperlösung vorbereitet. Der Primärantikörper (Polyklonal anti-human-MTUS1-Antikörper (Kaninchen)) wird 1:500 mit Diluent verdünnt. Anschließend werden auf die als Negativkontrolle gedachten Gewebeproben mit 100 µl Diluent bedeckt. Auf die restlichen Dünnschnitte werden 100 µl der Antikörperlösung gegeben. Die Objektträger inkubieren dann für mindestens 12 Stunden, bei 4 °C in einer feuchten Kammer.

3.4.7 Sekundärantikörper

Am folgenden Tag wird zunächst die Lösung mit dem Primärantikörper vorsichtig, unter Zuhilfenahme einer Pipette, mit neu angesetzter PBS/BSA-Lösung von den Objektträgern abgespült. Anschließend werden diese zweimal für 5 Minuten in PBS/BSA auf dem Schüttler gewaschen.

Die Objektträger werden dann wieder vorsichtig getrocknet. Hierzu lässt man zunächst das PBS/BSA-Gemisch abtropfen und trocknet mit Wischtüchern die Objektträger mit Ausnahme der Schnitte. Auf die Gewebeproben werden dann

100 µl einer Streptavidinlösung (Streptavidin 1:2000 A.d.) auf die Dünnschnitte gegeben. Es folgt ein weiterer Inkubationsschritt in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten.

Nach einem weiteren Waschschrift für zweimal 5 Minuten in PBS/BSA auf dem Schüttler, folgt die Reaktion mit dem Sekundärantikörper. Hierfür werden die Objektträger erneut vorsichtig getrocknet und dann mit 100 µl der Sekundärantikörperlösung versetzt (Sekundärantikörper [Polyklonal Goat-Anti-Rabbit Biothinyliert] 1:200 A.d.). Dies inkubiert dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.

3.4.8 Entwicklung und Färbung

Nach der Inkubation in der feuchten Kammer wird die Sekundärantikörperlösung vorsichtig mit PBS/BSA abgespült. Die Objektträger werden dann für zweimal 5 Minuten in PBS/BSA auf dem Schüttler gewaschen und anschließend in destilliertes Wasser überführt.

Für die Entwicklung wird folgende Lösung verwendet:

- 230 ml Tris-Puffer pH 7,6
- 7,88 g Tris-Hydrochlorid in 1 l A.d.
- 35 µl H₂O₂
- 40 mg DAB
- 40mg DAB in 1 ml A.d.

Die einzelnen Bestandteile werden vermischt und anschließend gefiltert um Schmutzpartikel (DAB) zu entfernen.

Die Objektträger werden für ca. 10 Sekunden in die Entwicklungslösung gegeben und dann wieder in destilliertes Wasser überführt. Ob die Entwicklungszeit ausreichend war wird unter dem Mikroskop überprüft. Falls dem nicht so ist wird der Schritt wiederholt, bis die Färbung ausreichend ist. Als Maß dient die Positivkontrolle der Normalmukosa.

Diesem Entwicklungsschritt folgt die Zellfärbung. Hierfür dient eine Hämalanlösung (Hämalan 1:2 A.d.). Diese wird vor der Färbung ebenfalls

filtriert. Die Objektträger werden für ca. 15 Sekunden bis 1 Minute in die Hämalaunlösung gegeben. Hier sind ebenfalls Kontrollen unter dem Mikroskop nötig um die optimale Färbung zu erlangen. Zum stoppen der Färbung werden die Schnitte in destilliertes Wasser überführt.

Zum Nachbläuen der Gewebeschnitte werden diese dann in eine Küvette gegeben und diese für 7 Minuten unter schwach laufendes warmes Wasser gestellt. Dann werden sie wieder in destilliertes Wasser gegeben.

3.4.9 Aufsteigende Alkoholreihe

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

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

3.4.10 Eindecken

Nach den Inkubationsschritten in Xylol werden die Objektträger vorsichtig mit Kompressen getrocknet. Auf die Gewebeschnitte wird dann unter Zuhilfenahme eines Glasstabes ein Tropfen Entellan (Polymer in Xylol gelöst) gegeben. Darauf wird ein Deckglas gelegt. Zügig wird dann, durch das Ausüben von leichtem Druck auf das Deckglas das Entellan gleichmäßig verteilt. Hierbei sollten Lufteinschlüsse vermieden werden. Anschließend werden die Objektträger über Nacht getrocknet.

4. Ergebnisse

4.1 LOH-Analyse

Als erster Schritt wurden die Subgruppe der Tumoren mit putativem allelischem Verlust im Bereich 8p22 einer nochmaligen LOH-Analyse unterzogen. Diese wurde mit Primer für den Marker D8S254 durchgeführt. Die Ergebnisse lagen nach Auswertung bei einem prozentualen Wert von ca. 3% - 90%. Bei der Auswertung der Ergebnisse müssen die Kontamination der Probe mit nicht tumorösen Gewebe (laut pathologischem Institut max. 50%), methodisch bedingte Intensitätsschwankungen und eine Fehlertoleranz von ca. 20% berücksichtigt werden. Als Cut-Off-Wert wurde wie in den vorausgehenden Arbeiten daher 30 % gewählt. Dies bedeutet, dass ab einem LOH-Wert von mehr als 30 % ein tatsächlicher LOH angenommen wird. Bei den 14 untersuchten Tumoren konnte ein LOH bestätigt werden (Tabelle 4).

Prob.-Nr.	LOH D8 - %	LOH bei 30% Cut-Off
1	84,88	+
2	57,10	+
3	72,40	+
4	75,11	+
5	60,30	+
6	53,28	+
7	42,94	+
8	59,00	+
9	52,24	+
10	40,02	+
11	58,80	+
12	30,42	+
13	89,81	+
14	56,15	+

Tabelle 4: Ergebnisse der LOH-Analyse

4.2 Immunhistochemische Färbung

Bei den immunhistochemischen Versuchen wurden stets mehrere Karzinome parallel untersucht, wobei alle Proben mit den gleichen Lösungen behandelt und unter denselben Bedingungen inkubiert wurden. Bei jedem Versuch dienten Schnitte von normaler Kolonschleimhaut als Kontrolle. Dabei wurde eine Probe Normalmukosa nicht mit Primärantikörper behandelt, um Artefaktbindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen (Abbildung 3a und b). Diese stellten die Negativkontrolle dar. Aus dem gleichen Grund wurde auch je ein Schnitt der untersuchten Karzinome nicht mit dem Primärantikörper inkubiert.

Nach dem Eindecken der Proben wurden diese unter einem Lichtmikroskop untersucht. Das MTUS1-Protein ist in den Mitochondrien lokalisiert und daher auf den Schnitten nicht im Zellkern, sondern im Zytoplasma der Epithelzellen der Kolonschleimhaut zu finden.

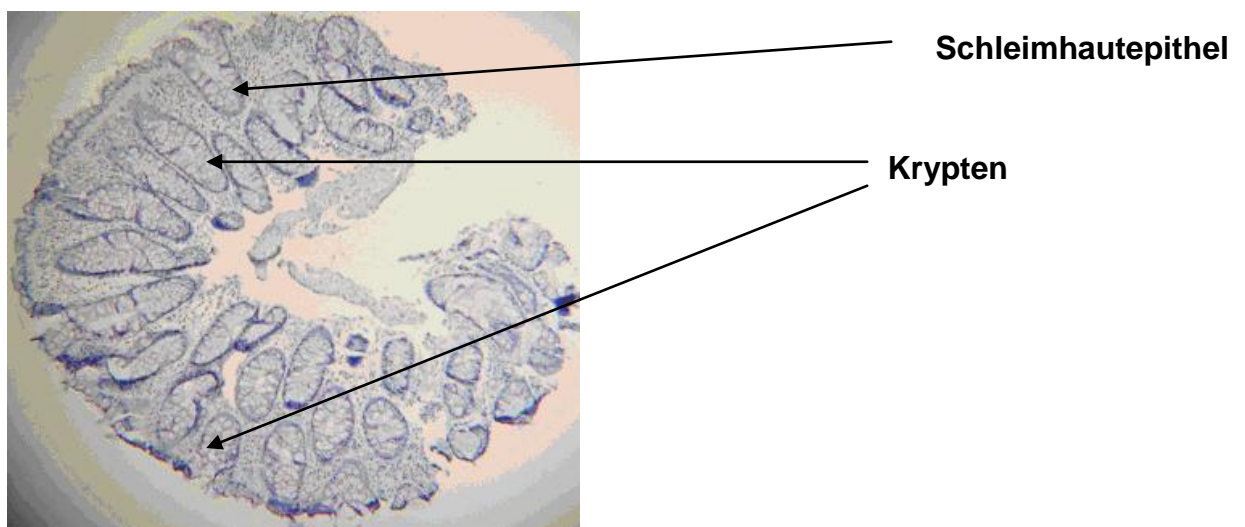


Abbildung 3 a: Normalmukosa ohne Inkubation mit dem Primärantikörper (Negativkontrolle), Vergrößerung 1:100.

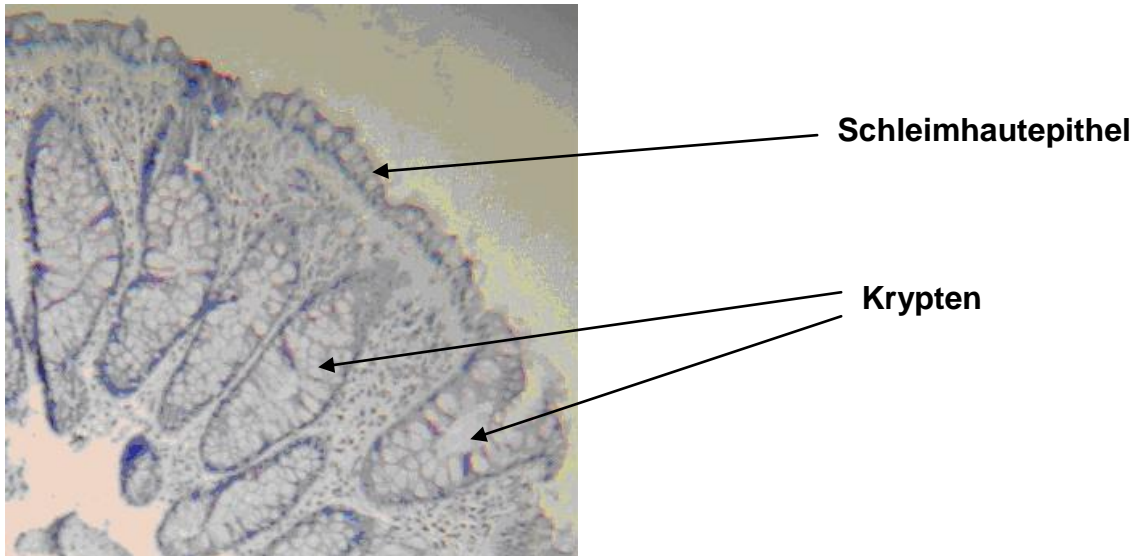


Abbildung 3 b: Normalmukosa ohne Inkubation mit dem Primärantikörper (Negativkontrolle), Vergrößerung 1:400.

In den Schnitten der Kolonnormalmukosa, die mit Primärantikörper behandelt wurden zeigt sich hingegen gefärbtes Zytoplasma (braun) in den Epithelzellen (Abbildung 7).

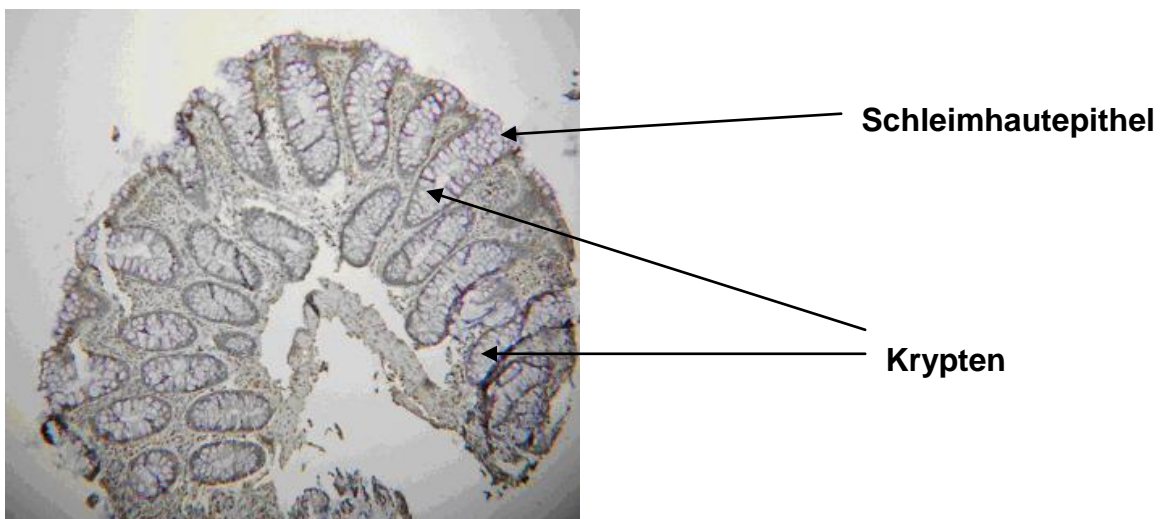


Abbildung 4 a: Normalmukosa; Inkubation mit dem Primärantikörper (Positivkontrolle), Vergrößerung 1:100.

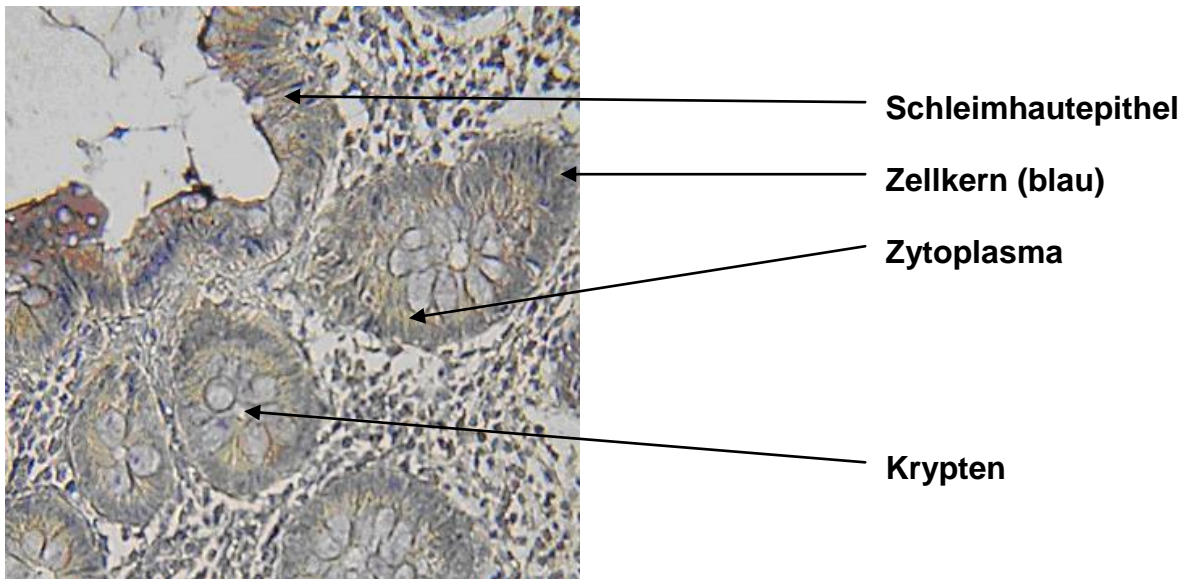


Abbildung 4 b: Normalmukosa; Inkubation mit dem Primärantikörper (Positivkontrolle), Vergrößerung 1:400.

Bei den einzelnen Färbungen wurden pro Karzinom fünf Objektträger mit mehreren Schnitten verwendet. Eine der Proben diente als Negativkontrolle und wurde nicht mit dem Primärantikörper behandelt. Die gefärbten Schnitte wurden anschließend unter dem Mikroskop untersucht und die Färbintensität mit der der Normalmukosakontrolle verglichen. Entsprechend dieser der Positivkontrolle, wurde der Tumor als „positiv“ im Sinne der MTUS1-Expression bewertet. War keine Färbung des Zytoplasmas zu erkennen, galt das Karzinom als „negativ“. Eine schwächere, aber erkennbare Färbung der Tumorzellen wurde als „schwach positiv“ bewertet und gibt den Hinweis auf eine erniedrigte MTUS1-Expression.

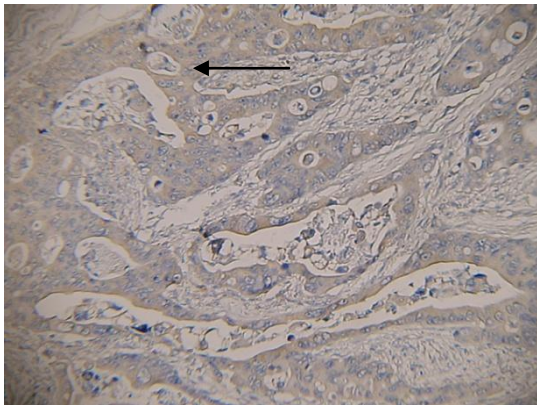
Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen sind in Tabelle 5 gezeigt. Daneben sind auch die pathologischen Werte im Bezug auf Staging und Grading der Karzinome, sowie der LOH-Wert (Prozent) der Karzinomzellen im Bezug auf die MTUS1-Region des Chromosom 8p21.3-22 angegeben. Von den 14 untersuchten Karzinomen wiesen 7 (50%) mindestens die gleiche Farbintensität auf wie die Positivkontrolle der Normalmukosa. 3 Proben zeigten im Vergleich zur Positivkontrolle eine schwächere Färbung (21%). In einigen der Karzinomschnitte waren auch Bereiche aufzufinden, die Normalmukosa zeigten, so dass die Färbung auch innerhalb desselben Tumorschnittes

verglichen werden konnte. 4 der Proben (29%) wiesen keine gefärbten Tumorzellen auf (Tabelle 4) (Diagramm 1).

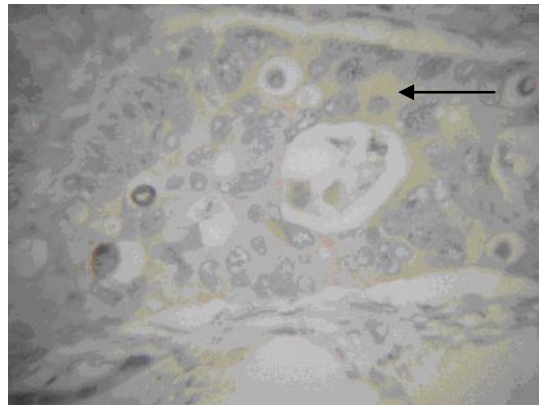
Prob.-Nr	Färbung	UICC-Stadium	Differenzierung	LOH D8-%
1	Negativ	2	2	84,88
2	Positiv	3	2	57,10
3	Schwach positiv	3	2	72,40
4	Positiv	4	2	75,11
5	Negativ	2	2	60,30
6	Positiv	1	2	53,28
7	Positiv	4	2	42,94
8	Negativ	1	3	59,00
9	Schwach positiv	4	2	52,24
10	Positiv	4	3	40,02
11	Schwach positiv	4	2	58,80
12	Negativ	4	2	30,42
13	Positiv	3	2	89,81
14	Positiv	3	2	56,15

Tabelle 5: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung: Spalten von rechts beginnend:
A: Pathologie-Nummer des Karzinoms; B: Intensität der Färbung; C: Staging; D: Grading; E:
LOH in Prozent

4.3 Beispiele



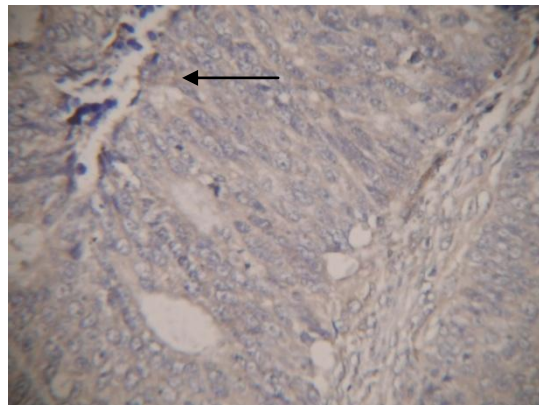
a)



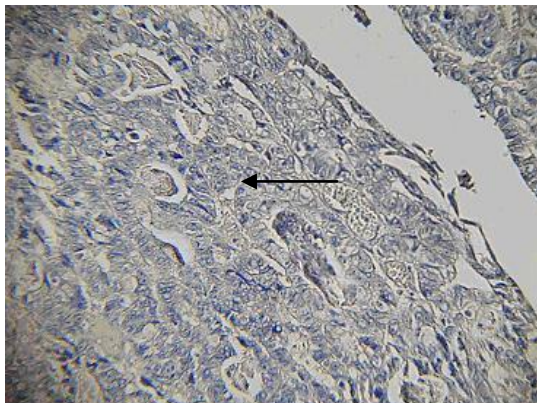
b)



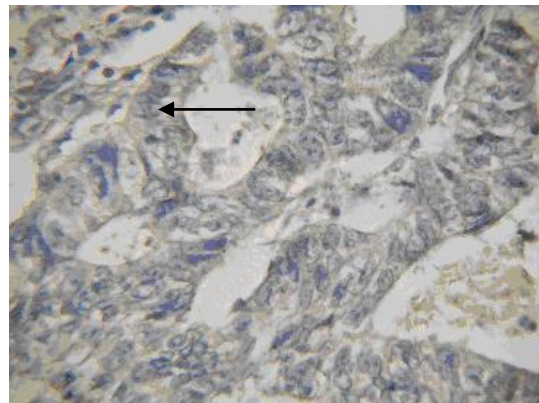
c)



d)



e)



f)

Abbildung 5: a) und b) (Nr 5): Erhaltene Expression von MTUS1 im Zytoplasma der Tumorzellen (Pfeil); c) und d) (Nr. 12): Reduzierte Expression von MTUS1 im Zytoplasma von Tumorzellen im Vergleich von Zellen der Kolonmukosa (Pfeil). e) und f) (Nr. 2): Keine Expression von MTUS1 im Zytoplasma der Tumorzellen (Pfeil). (Bilder 5a, 5c, 5e Vergrößerung 1:100, 5b, 5d, 5f Vergrößerung 1:400).

5. Diskussion

5.1 MTUS1 wird nicht nach den Mechanismen der Knudson-Hypothese inaktiviert

Die zur Verfügung stehenden Tumoren (n=14) stellen eine Subgruppe von 168 im Jahr 2000-2004 gesammelten Tumoren dar, die bereits auf allelische Verluste untersucht worden sind (bisher unveröffentlichte Ergebnisse). Vor der eigentlichen immunhistochemischen Analyse erfolgte nochmals eine LOH-Analyse der zur Verfügung stehenden Tumoren. Die Untersuchung erfolgte mit den gleichen Primern auf den gleichen Sequenzen. Als Cut-off für den LOH wurde wie bei den Voruntersuchungen 30% angenommen. Bei den zu untersuchenden Tumoren konnte das Vorliegen eines LOH bestätigt werden.

Im zweiten Schritt der Arbeit erfolgte die Etablierung des Antikörpers, und die immunhistochemische Färbung der Tumordünnschnitte. Anschließend wurde das Expressionsverhalten von MTUS1 in Kolonkarzinomen mit dem von gesunder Normalmukosa verglichen (Diagramm 1). Die Färbung der Normalmukosa diente als Kontrolle, und deren Intensität als Standard. Die Färbeintensität der Kontrollen bei einzelnen Versuchsdurchführungen variierten leicht, so dass stets die jeweilige Kontrolle als Referenz für die Färbeintensität hergenommen wurde.

Von den untersuchten Karzinomen wiesen 7 von 14 (50%) eine der Normalmukosa vergleichbare Färbeintensität auf und 3 von 15 (21%) zeigte eine reduzierte aber noch erhaltene Farbintensität im Vergleich zur Normalmukosa. Eine Angabe über die Quantität der Reduktion lässt sich aufgrund der Farbintensität nicht geben. Unterschiede in der MTUS1-Proteinbildung lassen sich auch innerhalb einzelner Tumorschnitte beobachten. Ursächlich dafür ist wahrscheinlich die Heterogenität des Tumors. Die dabei entstehenden genetischen Veränderungen können sich auf die (Gesamt-) Expressionsrate von MTUS1 auswirken.

Lediglich 3 von 15 (21%) Tumoren zeigten keine Färbung der malignen Zellen im Vergleich zu der Normalmukosa im Sinne eines Verlustes der MTUS1-Expression. Auch wenn die reduzierte Intensität als Reduktion der Expression von MTUS1 gewertet werden kann, kann lediglich bei 50% der untersuchten

Tumoren mit einem allelischen Verlust im Bereich der MTUS1-Region eine Expressionänderung des Genproduktes festgestellt werden. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem LOH der Region auf Chromosom 8p21.3-22 und der MTUS1-Expression konnte somit nicht bei allen Tumoren gezeigt werden. Daher scheint MTUS1 zumindest beim kolorektalen Karzinom kein klassisches Tumorsuppressorgen mit allelischen Verlust in der chromosomalen Region als erstes Ereignis ("first hit") und folgender Mutation mit komplettem Expressionsverlust des zweiten Allels zu sein. Möglicherweise kann ein anderes Gen im Bereich 8p21.3-22 gefunden werden, dessen Genprodukt im Rahmen des allelischen Verlustes immer komplett inaktiviert wird. Dazu müssen weitere Studien durchgeführt werden.

5.2 Alternative Inaktivierungsmechanismen für MTUS1

Obwohl in dieser Arbeit keine klare Verbindung zwischen einem allelischen Verlust im Bereich 8p22 und dem Expressionsverlust von MTUS1 nachgewiesen werden konnte, belegen viele Studien eine Relevanz in Tumoren sowohl bei einem allelischen Verlustes der Region 8p22 (Fujiwara Y, 1993; Bardi G, 1993; Kerangueven F, 1997; Chan KL, 2002; Suzuki H, 1995; Wagner U, 1997; Tamura G, 2001) als auch bei einem Expressionsverlustes von MTUS1 (Ye et al., , 2007; Benedetto MD, 2006; Seibold et al., 2003). Möglicherweise wird das MTUS1-Gen durch andere Mechanismen inaktiviert. Neben der Deletion der Region Chromosom 8p21.3-22, können Mutationen im Promotor und innerhalb der Gensequenz die Transkriptionsrate beeinflussen. Dies kann beispielsweise zu einer Erniedrigung der Bindungsaffinität eines Transkriptionsfaktors an den Promotor führen, oder es wird ein funktionell inaktives bzw. verkürztes Protein produziert, das verstärkt abgebaut wird. Es wurde allerdings auch gezeigt, dass in hepatozellulären Karzinomen nur fünf von 108 untersuchten Geweben MTUS1-Mutationen aufwiesen (Benedetto et al., 2006). Allerdings muss einschränkend gesagt werden, dass die Sequenzierung sich nur auf die codierende Sequenz bezog und der Promotor und die nicht-codierende Sequenz nicht analysiert wurden. Mutationen die sich

in diesen Regionen befinden könnten sich ebenfalls auf die Expressionsrate auswirken.

Neben genetischen Veränderungen, können auch epigenetische Modifikationen, die zu molekularen und strukturellen Veränderungen des Chromatins führen, eine Rolle in der Expressionskontrolle von MTUS1 in Karzinomen spielen. Diese Modifikationen sind kovalent und werden nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz begleitet. Es existieren dabei zwei Substrate für die epigenetische Prozessierung des Chromatins: zum einen die DNA, und zum anderen die Histone. Beide werden in vielfältiger Weise durch kovalente Bindung verschiedener Moleküle (Acetyl-, Phosphat-, Methylgruppen u.a.) modifiziert. Dies spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Genexpression und der Entwicklung der Zelle (Morgan HD, 2005; Khorasanizadeh S, 2004; Horn PJ, 2002). Viele Gene durchlaufen im Rahmen der Transformation einer Zelle eine Hypermethylierung. Zu ihnen gehören solche, die den Zellzyklus regulieren (p16, RB), Gene die mit DNA-Reparatur (BRCA1), Apoptose, Angiogeneese oder Metastasierung assoziiert sind (Clark SJ, 2002; Esteller M, 2002). Daneben spielt auch die Hypomethylierung in einer Vielzahl maligner Erkrankungen eine Rolle wie dem Zervixkarzinom, Prostatakarzinom, oder metastasierendem hepatozellulären Karzinom. Sie wird mit der Aktivierung von verschiedenen Onkogenen wie cMYC oder RAS und Chromosomeninstabilität in Verbindung gebracht (PM, 2004; Ushijima T, 2007). Die Epigenetik spielt damit eine Rolle im Verlauf der Tumorprogression. Somit könnte eine reduzierte Expression von MTUS1 auch durch eine Hypermethylierung der Promotorregion erklärt werden. Eine Analyse der Methylierungsmuster könnte weiteren Aufschluss über das veränderte Expressionsverhalten von MTUS1 in Kolonkarzinomen geben.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst bei den gesammelten 14 Tumoren mit einem putativen allelischen Verlust im Bereich 8p21.3-22 nochmals eine LOH-Analyse durchgeführt und die Voruntersuchungen bestätigt. Als zweiter Schritt konnte die Etablierung des MTUS1-Antikörpers erfolgreich durchgeführt werden. Die Paraffinblöcke wurde aus dem Institut für Pathologie herausgesucht und selbstständig Schnitte davon angefertigt. Die immunhistochemische Analyse der MTUS1-Expression ergab einen Expressionsverlust bei 7 von 14 Tumoren und eine Reduktion der Expression bei weiteren 3 der 14 Tumoren. Bei insgesamt 7 von 14 Tumoren scheint somit die Expression von dem allelischen Verlust assoziiert zu sein. Allerdings konnte bei den übrigen 7 Tumoren eine Expression des MTUS1-Gens nachgewiesen werden. Ein allelischer Verlust führt somit nicht immer zu einer Inaktivierung von MTUS1. MTUS1 wird somit nicht immer nach dem klassischen Mechanismen der Knudson-Hypothese (Mutation des ersten Allels gefolgt von der Deletion des zweiten Allels) inaktiviert. Möglicherweise kann in weiteren Studien ein anderes Gen in dem entsprechenden Bereich identifiziert werden, das im Rahmen eines allelischen Verlustes immer komplett inaktiviert wird. Außerdem sollten, da andere Studien eine Relevanz von MTUS1 als Tumorsuppressorgen beim kolorektalen Karzinom und auch bei anderen Tumoren zeigen konnten, weitere Studien durchgeführt werden, in denen alternativen Inaktivierungsmechanismen von MTUS1 untersucht werden.

7. Abstract

In this thesis 14 tumor samples with putative allelic loss in the region 8p21.3-22 in earlier studies, the allelic loss was confirmed by performing a LOH-analysis. In the second step a MTUS1-antibody was established successfully. The tumor samples were collected from the institute of pathology and then cut with a microtome for further analysis. The analysis showed a loss expression of MTUS1 of in 7/14 samples and a reduction of expression of MTUS1 in 3/14 tumor samples. Therefore LOH in 8p21.3-22 might play a role in the inactivation of MTUS1. Therefore in 7/14 samples LOH in 8p21.3-22 might play a role in the inactivation of MTUS1. However MTUS1 expression was detected in 7 tumor samples with a LOH. This shows, an allelic loss does not always leads to the inactivation of MTUS1. Therefore the inactivation of MTUS1 is not always following the classic model of the Knudson theory (Two-Hit model). Perhaps in further studies an other gene in this area can be identified, which can in case of an allelic loss completely inactivate MTUS1. Other studies showed the relevance of MTUS1 as a tumorsupressorgene in colon cancer and other tumor entities. Therefore further studies are necessary to examine the mechanism of inactivation of MTUS1.

8. Literatur

Alberts B, Johnson A, Lewis J. Molecular Biology of the cell. 2008.

Alexandria VA. Cancer Genetics an Cancer Predisposition Testing. *American of Clinical Oncology Curriculum*. 1998.

Arias E, Anderson RN, Kung HC, Murphy SL, Kochanek KD. Deaths: final data for 2001. *Natl. Vital Stat. Rep.* 2003; 52:1 – 115.

Arteaga CL. Epidermal growth factor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist*. 2002; Suppl 4:31-39.

Bakkerist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimmer dissociation. *Nature*, 2003; 421: 486-488.

Banbera M. Cell Devision and Cancer. *Nature*, 2004; Vol. 432: 293-341.

Benedetto MD, Bieche I, Deshaves F, Vacher S, Nouet S, Collura V, Seitz I, Louis S, Pineau P, Amsellem-ouazana D, Couraud PO, Strosberg AD, Stoppa-Lyonnet, Lidereau R, Nahamias C. Structural organization and expression of human MTUS1, a candidate tumor suppressor gene encoding family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins, ATIP. *Gene*. 2006; 380: 127-136.

Benedetto MD, Pineau P, Nouet S, Berhouet S, Seitz I, Louis S, Dejan A, Couraud PO, Strosberg AD, Stoppa-Lyonnet D, Nahmis C. Mutation of the 8p22 candidate tumor suppressor gene ATIP/MTUS1 in hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006; 252: 207-215.

Bardi G, Johansson B, Pandis N, Mandahl N, Bak-Jensen E, Andren-Sandberg A, Mitelman F, Heim S. Karyotypic abnormalitis in tumors of the pancreas. *British Journal of Cancer*. 1993; 67: 1106-1112.

- Cahill DP**, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C: Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 1999, 9(12).
- Cavenee WK**, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983, 305 (5937):779-784.
- Chan KL**, Le JM, Guan XY, Fan ST, Ng IO. High-density allelotyping of chromosome 8p in hepatocellular carcinoma and clinicopathologic correlation. *Cancer.* 2002; 94: 3179- 3185.
- Chan TA**, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. *Nature*, 1999; 401:535-537.
- Clark SJ**, Melki J. DANN methylation and gene silencing in cancer: Which is the guilty party? *Oncogene.* 2002; 21: 5380-5387.
- Cowell JK**. Double minutes and homogenously staining regions: gene amplifications in mammalian cells. *Annual Review Genetics.* 1982; 229: 974-976.
- Croce CM**. Oncogenes and Cancer. *N. Eng. J. Med.* 2008; 358: 502-511.
- Croce CM**. Role of chromosome translocation in human neoplasia. *Cell.* 1987; 49:155-160.
- Galluzzi L**, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapie. *Oncogene.* 2006; 25: 4812-4830.
- Calvert M**, Frucht H. The Genetics of Colorectal Cancer. *Annals of Internal Medicine.* 2002; 137: 603-612.
- Campisi J**. Senescent Cells, Tumor Suppression and Organism Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell.* 2005; 120: 513-522.

Das PM, Singal R. DNA Methylation and Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2004. 22: 4632-4642.

Esteller M. CpG islands hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*. 2002; 21 5427-5440.

Fujiwara Y, Emi M, Ohata H, Kato Y, Nakajima T, Mori T, Nakamura Y. Evidence of two tumor suppressor genes on chromosome 8p for colorectal carcinoma. *Cancer Research*. 1993; 53: 1172-1174.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein , Harris CC. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Research*. 1994; 54: 4855-4878.

Gustafson CE, Wilson PJ, Lukeis R, Baker E, Woollatt E, Annab L, Hawke L, Barrett JC, Chenevix-Trench G. Functional evidence for a colorectal cancer tumor suppressor gene at chromosome 8p22-23 by monochromosome transfer. *Cancer Research*. 1996; 56: 5238-5245.

Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N. Engl. J. Med*. 2002; Vol 347, NO 20.

Heldin CH, Westermark E. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Review*. 1999; 79: 1283-1318.

Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 1995; 80: 31-39.

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med*. 2003; 349: 2042-2054.

Ho A, Dowdy SF. Regulation of G₁ cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2002; 12:47-52.

Horn PJ, Craig LP. Chromatin Higher Order Folding: Wrapping up Transcription. *Science*. 2002; 297: 1824-1827.

Hornsby PJ. Senescence As an Anticancer Mechanism. *Journal of Clinical Oncology*. 2007; 14: 1852-1857.

Ichikawa T, Nihei N, Suzuki H, Oshimura M, Emi M, Nakamura Y, Hayata I, Isaacs JT, Shimazaki J. Suppression of metastasis of rat prostatic cancer by introducing human chromosome 8. *Cancer Research*. 1994; 54: 2299-2302.

Kaelin WG Jr. The p53 gene family. *Oncogene*. 1999; 18: 7701-7705.

Kastan MB, Bastek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 2004; 432, 316-323.

Kastan MB. Wild-Type p53: Tumors Can't Stand It. *Cell*. 2007; 128: 837-840.

Kerangueven F, Naguchi T, Coulier F, Allione F, Warginiez V, Simony-Lafontaine J, Longy M, Jacquemier J, Sobol H, Eisinger F, Birnbaum D. Genome-wide search for loss of heterozygosity shows extensive genetic diversity of human breast carcinomas. *Cancer Research*. 1997; 57: 5469-5474.

Khorasanizadeh S. The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation. *Cell*. 2004; 116: 250-272.

Knudson AG. Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1971; Vol 68: 820-823.

Knudson AG. Mutation and human cancer. *Adv. Cancer Res.* 1973; Vol 17: 317-352.

Kressner U, Inganas M, Byding S, Blikstad I, Pahlman L, Glimelius B. Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1999; 17:593-599.

Kunkel TA, Bebenek K. DNA replication fidelity. *Annual Review of Biochemistry*. 2000; 69: 497-529.

Landon EJ, Inagami T. Beyond the G Protein: The Saga of the Type 2 Angiotensin II Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005; 25: 15-16.

Lawrence AL. A Mutator Phenotype in Cancer. *Cancer Research*. 2001; Vol: 61, 3230-3239.

Lee S, Bang S, Song K, Lee I. Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. *Oncology Reports*. 2006; 16: 747-754.

Levin B. Molecular Screening Testing for Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2006; Vol 12: 5014-5017.

Li X, Liu H, Yu T, Dong Z, Tang L, Sun X. Loss of MTUS1 in gastric cancer promotes tumor growth and metastasis. *Neoplasma*. 2014;61(2):128-35

Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993; 362: 709-715.

Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science*; 286: 1897-1905.

Loeb LA. Mutator phenotype maybe required for multistage carcinogenesis. *Cancer Research*. 1991;51: 3075-3079.

Markowitz S. DNA Repair Defects Inactivate Tumor Suppressor Genes and Induce Hereditary and Sporadic Colon Cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 2000; 18: 75-80.

Mecklin JP. The implications of genetics in colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2008; 19: 87-90.

Mehlen P, Fearon, ER. Role of the Dependence Receptor DCC in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Journal of Clinical Oncology*. 2004; 22: 3420-3428.

Metro G, Finocchiaro G, Cappuzzo F. Anti-cancer therapy with EGFR inhibitors: factors of prognostic and predictive significance. *Annals of Oncology*. 2006; 17: 42-45.

Mimori-Kiyosue Y, Tsukita S. Where is APC going? *Journal of Cell Biology*. 2001; 154: 1105-1109.

Moazed D, Grewal SIS. Heterochromatin and Epigenetic Control of Gene Expression. *Science*. 2003; 301: 798-802.

Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*. 2005; 14: 47-58.

Müller M. Chirurgie. 2006/2007; Vol. 8.

Mullan PB, Quinn JE, Harkin DP. The role BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene*. 2006; 25: 5854-5863.

Mungar K. The role of human papilloma virus in human cancer. *Frontiers Bioscience*. 2002; 7: 641-649.

Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, Alleaume AM, Benedetto MD, Boden C, Masson M, Strosberg AD, Horiuchi M, Couraud PO, Nahmias C. Transinactivation of Receptor Tyrosine Kinase by Novel Angiotensin II AT2

Receptor-interacting Protein , ATIP. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 28989-28997.

Pawson T, Warner N. Oncogenic rewiring of cellular signaling pathways. *Oncogene*. 2007; 26: 1268-1275.

Press MF, Bernstein L, Thomas PA. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node negative breast arcinomas. *Journal of Clinical Oncology*. 1997; 15: 2894-2904.

Rodenhuis S. Ras and human tumors. *Seminar Cancer Biology*. 1992. 3: 241-247.

Rogler A, Hoja S, Giedl J, EkiciA, Wach S, Taubert H, Goebell HJ, Wullich B, Stöckle M, Lehmann J, Petsch J, Hartmann A, Stoehr H. Loss of MTUS1/ATIP expression is associated with adverse outcome in advanced bladder carcinomas: data from a retrospective study. *BMC Cancer*. 2014, 14:2014

Rougier P, Mitry E. Epidemiology, treatment and chemoprevention in colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2003; 2: 3-5.

Rubin H. Selected Cell and Selective Microenviroment in Neoplastic Development. *Cancer Research*. 2001; 61: 799-807.

Sage J, Miller AL, Peres-Mancera PA, Wysockis JM, Jacks T. Acute mutations of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature*, 2003; 424: 223-228.

Santarosa M, Ashworth A. Haploinsufficiency for tumor suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004; 1654: 105-122.

Scully R, Livingston DM. in search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature*. 2000; 408: 429-432.

Seibold S, Claudia R, Weber M, Galle J, Wanner C, Marx M. Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22. *The FASEB Journal*. 2003; 17: 1180-1182.

Sellers WR, Kaelin WG Jr.. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 1997; 15: 3301-3312.

Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*. 2001; 20: 2390-2400.

Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology*. 2002; 4: 131-136.

Sherr C, Roberts J. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Development*. 1999; 13: 1501-1512.

Sherr CJ. Principles of Tumor Suppression. *Cell*. 2004; 116: 235-246.

Shtiveman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985; 315: 550-554.

Spieß C, Wagner FM. Molekulargenetische Untersuchungen zur präsymptomatischen Diagnostik einer Familie mit klinisch manifestem Lynch-Syndrom (HNPCC). Dissertation 1999, Uni-Hamburg.

Statistisches Bundesamt

Suzuki H, Emi M, Komiya A, Fujiwara Y, Yatani R, Nakamura Y, Shimazaki J. Localization of tumor suppressor gene associated with progression of human prostate cancer within a 1.2 Mb region of 8p22-p21.3. *Genes Chromosomes. Cancer*. 1995; 13: 168-174.

Tamura G, Sato K, Akijama S, Tsuchiya T, Endoh Y, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Motoyama T. Molecular characterization of undifferentiated-type gastric carcinoma. *Lab. Invest.* 2001; 81: 593-598.

Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1993; 3: 226-231.

Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S. Recurrent fusion of TMPRSS and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science.* 2005; 310: 644-648.

Tortola S, Marcuello E, Gonzales, I, Reyes G, Arribas R, Aiza G. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 1999; 17: 1375-1381.

Ushijima T. Epigenetic Field for Cancerization. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 2007; 40: 142-150.

Van Gent DC, Hoeijmakers JHJ, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA doublestranded break connection. *Nature Reviews Genetics.* 2001; 2: 196-206.

Velculescu VE. Defining the blueprint of the cancer genome. *Carcinogenesis.* 2008; 29: 1087-1091.

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine.* 2004 Vol. 10, NO 8.

Vogelstein B, Lane D, LeVine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*, 2000; 408: 307-310.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990;1;61(5):759-67.

Wagner U, Bubendorf L, Gasser TC, Moch H, Gorog JP, Richter J, Mihatsch MJ, Waldman FM, Sauter G. Chromosome 8p deletions are associated with invasive tumor growth in urinary bladder cancer. *American Journal of Pathology*. 1997; 151: 753-759.

Weinberg DS. Colorectal Cancer Screening. *Annals of Internal Medicine (in the clinic)*. 2008; 1-16.

Weinberg RA, Hahn WC. Rules for making human tumor cells. *New England Journal of Medicine*. 2002; 347: 1593-1604.

Wilson DM, Thompson LH. Life without DNA Repair. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1997; 94: 12754- 12757.

Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserov H, Menk M, Scheffe JH, Kruse ML, Stoll M, Unger T. Regulation of Transport of the Angiotensin AT2 Receptor by a Novel Membrane-Associated Golgi Protein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology*. 2005; 25: 57-64.

Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2008; 14: 378-389.

Ye H, Pungpravat N, Huang BL, Muzio LL, Mariggio MA, Chen Z, Wong DT, Zhou X. Genomic assessments of the frequent loss of heterozygosity region on 8p21.3-p22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2007; 176: 100-106.

Zentrum für Krebsregisterdaten

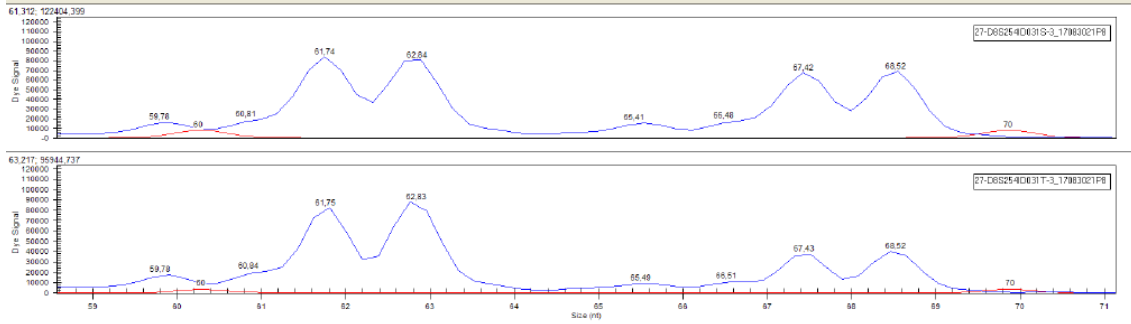
Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000; 408: 433-439.

Zuern C, Heimrich J, Kaufmann R, Richter KK, Settmacher U, Wanner C, Galle J, Seibold S. Down-regulation of MTUS1vin human colon tumors. *Oncol Rep*:2010 Jan:23(1):183-9

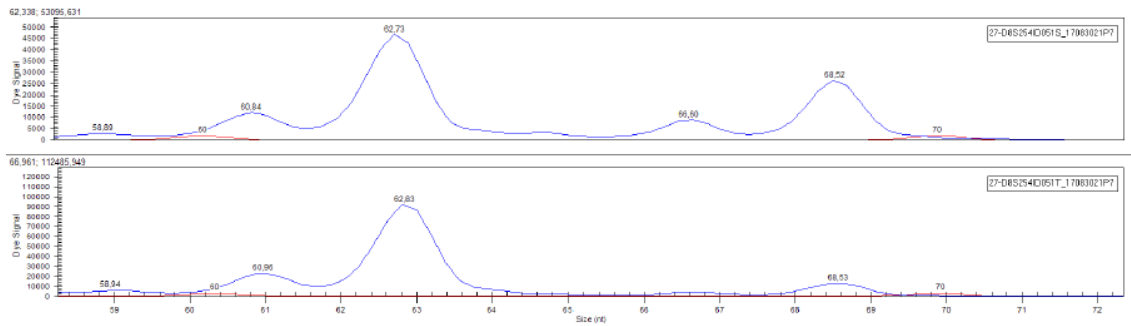
Anhang:

Rohdaten der Sequenzierung.

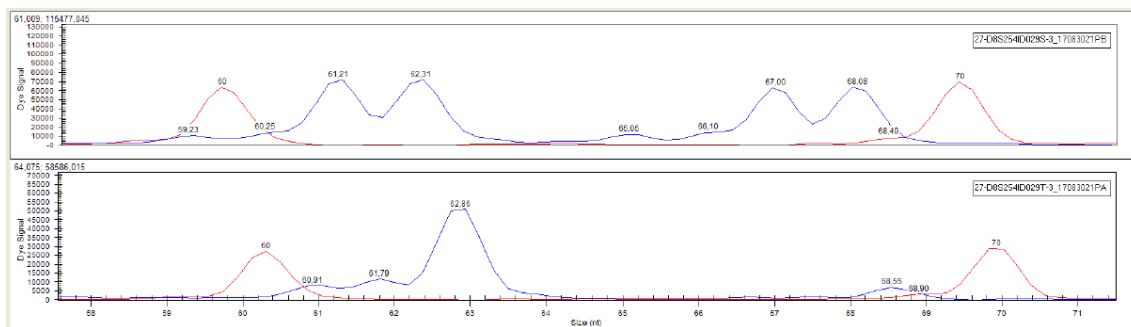
1



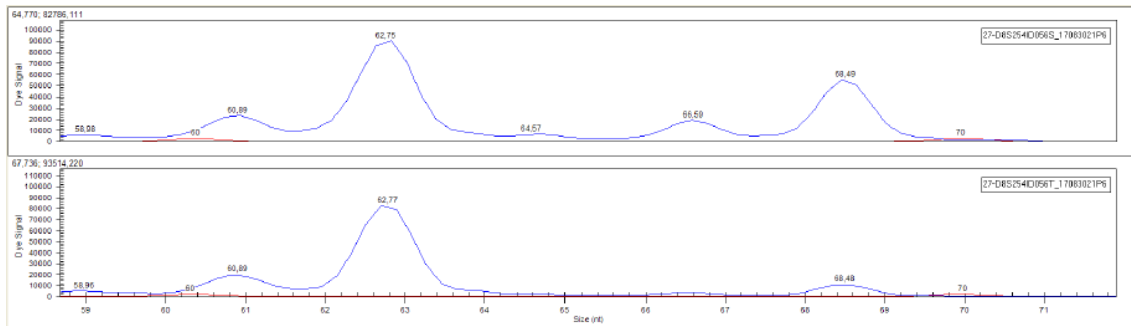
2



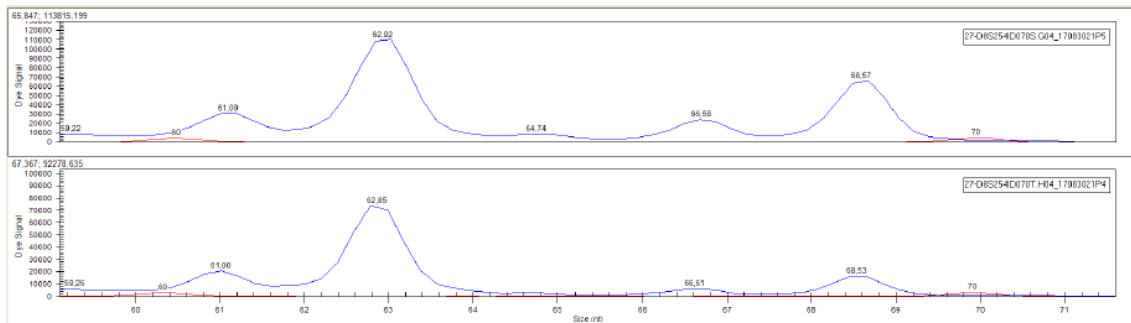
3



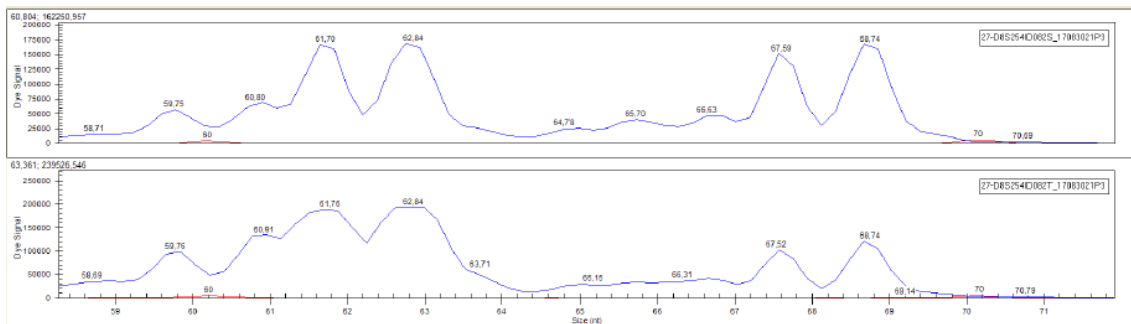
4



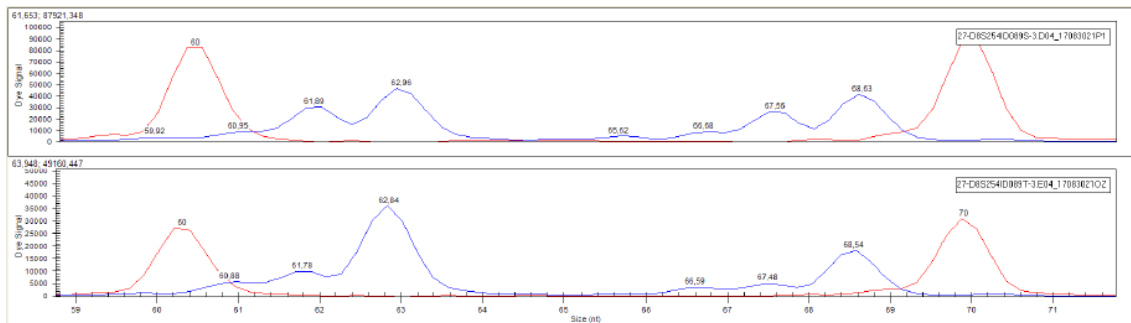
5



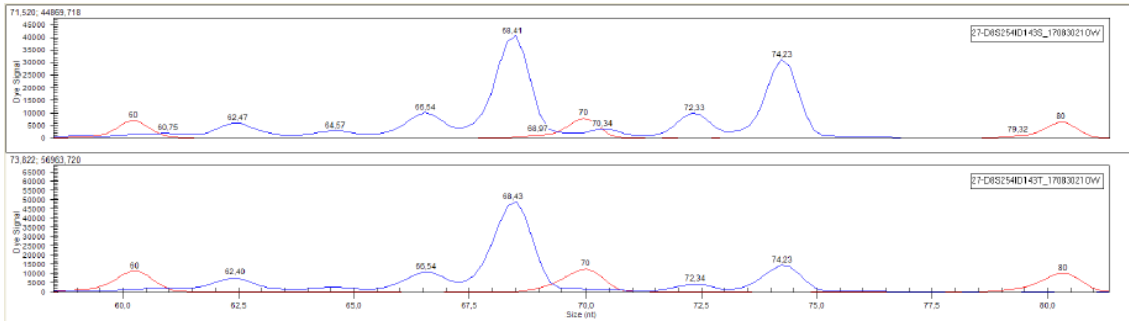
6



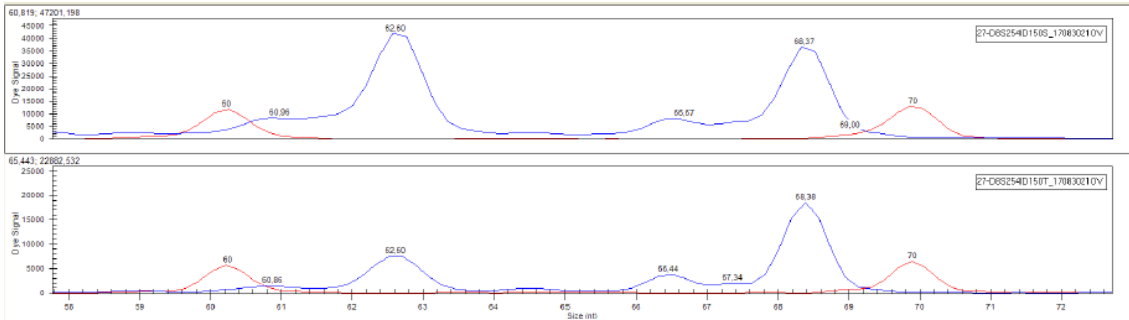
7



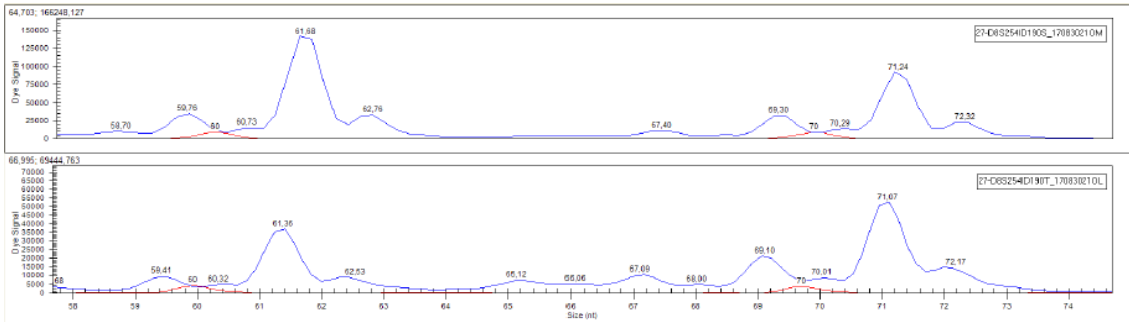
8



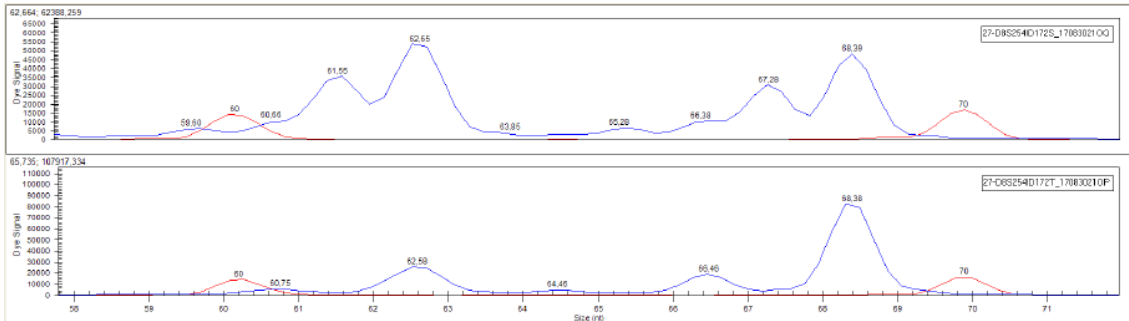
9



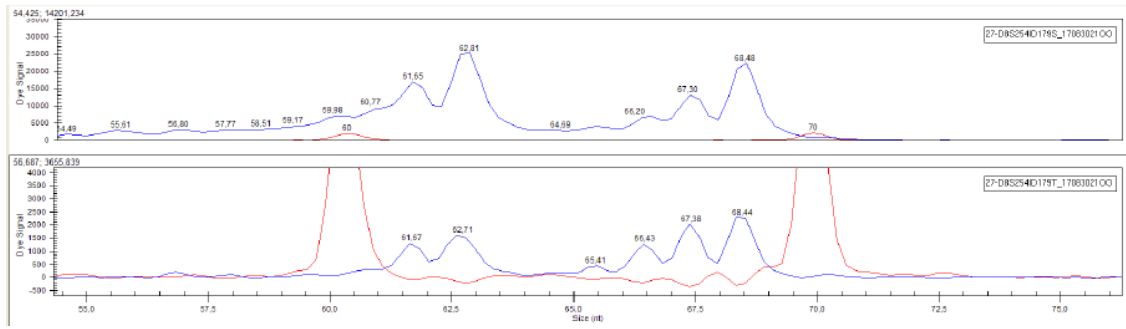
10



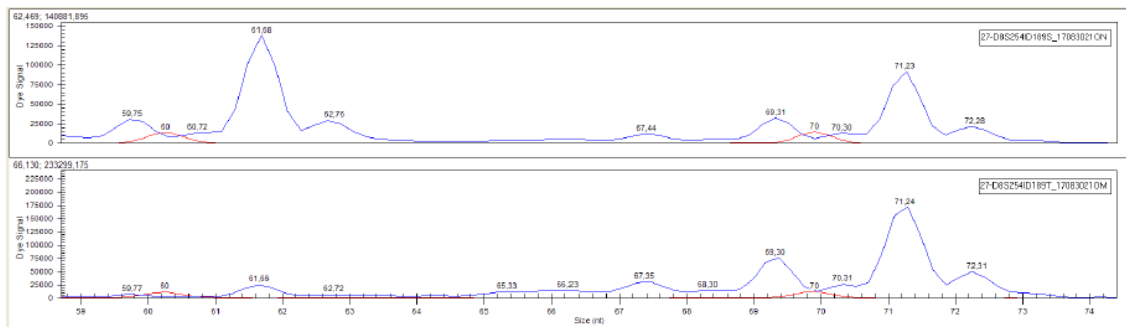
11



12



13



14

