

**Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. J. Eulert**

**Charakterisierung genomischer Polymorphismen und
somatischer Mutationen, sowie der Expression der
gastrointestinalen Glutathionperoxidase im Rahmen der
kolorektalen Karzinogenese**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Nurcan Üçeyler

aus Würzburg

Würzburg, Februar 2003

Referent: Prof. Dr. med. F. Jakob

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Scheurlen

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 30.05.2003

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern und meinem Bruder gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite:
1. Einführung	1
1.1 Allgemeines	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Lokalisation	1
1.1.3 Histologie	1
1.1.4 Stadieneinteilung	2
1.1.5 Metastasierungswege	2
1.2 Epidemiologie	3
1.3 Ätiologie und Pathogenese	3
1.3.1 Allgemeines	3
1.3.2 Umweltfaktoren und Familienanamnese	3
1.3.3 Molekulargenetische Ursachen	4
1.3.3.1 Tumorsuppressor-Pathway	5
1.3.3.1.1 Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)	6
1.3.3.2 Mutator-Pathway	7
1.3.3.2.1 Hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom (HNPCC)	8
1.3.3.3 Besonderheiten MSI-positiver kolorektaler Karzinome	10
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies und antioxidative Schutzmechanismen	10
1.4.1 Allgemeines	10
1.4.2 Reaktive Sauerstoffspezies	11
1.4.3 Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies	11
1.4.4 Antioxidantien	12
1.5 Selen und Selenoproteine	13
1.5.1 Selen	13
1.5.2 Selenmangelerkrankungen	14
1.5.3 Erkrankungen bei Selenüberangebot	15
1.5.4 Seleneinbau in Selenoproteine	15

1.5.5	Selenoproteine	16
	A. Dejodasen	17
	B. Thioredoxinreduktasen TRxR	17
	C. Selenoprotein P (SeP)	18
	D. Glutathionperoxidasen (GPx)	18
1.5.6	Gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx)	20
1.5.6.1	Vorkommen	20
1.5.6.2	Struktur und Bildung	20
1.5.6.3	Stabilität unter Selenmangel	21
1.5.6.4	Funktion	22
1.5.7	Selenmangel und Tumorphathogenese	24
1.5.8	Selenoproteine und Kolonkarzinogenese	26
1.6	Fragestellung	26
2	Material und Methoden	28
2.1	Untersuchtes Material	28
2.1.1	Kolonkarzinomgewebe mit korrespondierender Normalmukosa	28
2.1.2	Blutproben	28
2.1.3	Zelllinien	28
2.1.3.1	Zellkultur	30
2.2	Methoden	30
2.2.1	DNA-Extraktion und Aufreinigung aus Paraffingewebe	30
2.2.1.1	Gewebegewinnung durch Mikrodissektion	30
2.2.1.2	DNA-Extraktion aus Paraffingewebe	31
2.2.1.3	Phenol-Chloroform-Fällung	31
2.2.1.4	Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung	32
2.2.2	DNA-Extraktion aus Blut	32
2.2.3	DNA-Extraktion aus Zelllinien	33
2.2.4	DNA-Extraktion aus Kryogewebe	34
2.2.5	RNA-Extraktion aus Zelllinien und Kryogewebe	35
2.2.6	Messung der DNA und RNA-Ausbeute	36
2.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
2.2.7.1	PCR-Ansatz	37

2.2.7.2	Primer	38
2.2.7.2.1	Allgemeines	38
2.2.7.2.2	GI-GPx-Primer mit M13-Anhang - ungeteiltes Exon	39
2.2.7.2.3	GI-GPx-Primer mit M13-Anhang - geteiltes Exon	41
2.2.7.3	Gelelektrophorese	43
2.2.8	Sequenzierung	43
2.2.8.1	Allgemeines	43
2.2.8.2	Aufreinigung der PCR-Produkte	44
2.2.8.3	Sequenz-PCR	44
2.2.8.4	Aufreinigung der Sequenz-PCR-Produkte	45
2.2.8.5	Automatische Sequenzanalyse	45
2.2.8.6	Auswertung der Sequenziererergebnisse	46
2.2.9	SNaPshot-Analyse	46
2.2.9.1	Allgemeines und Prinzip	46
2.2.9.2	SNaPshot-Primer	47
2.2.9.3	Reaktionsansatz	48
2.2.9.4	Postextensionsverfahren	49
2.2.9.4.1	Aufreinigung der SNaPshot-PCR-Produkte	49
2.2.9.5	SNaPshot-Analyse	49
2.2.10	Northern-blot	49
2.2.10.1	Allgemeines und Prinzip	49
2.2.10.2	Vorbereitung der cDNA-Sonden	50
2.2.10.3	Elektrophorese und blot	50
2.2.10.4	Hybridisierung und Waschung	51
2.3	Materialien	53
2.3.1	Chemikalien	53
2.3.2	Puffer und Lösungen	54
2.3.3	Geräte	54
3.	Ergebnisse	56
3.1	Patientendaten	56
3.2	Ergebnisse der Untersuchungen zur Änderung der Expression der gastrointestinalen Glutathionperoxidase GI-GPx im Rahmen der kolorektalen Karzinogenese	61

3.2.1.1	Ergebnisse der Northern-blot Analyse zur Expression der GI-GPx-mRNA in Kolonkarzinomzelllinien	61
3.2.2	Ergebnisse der Northern-blot Analysen zur Expression der GI-GPx mRNA in Kolonkarzinomen im Vergleich zu korrespondierender gesunder Kolonschleimhaut	62
3.3	Ergebnisse der Immunhistochemie zur Proteinexpression der GI-GPx in kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu korrespondierender gesunder Kolonschleimhaut	64
3.4	Ergebnisse der Untersuchungen zum Auftreten genetischer Alterationen im GI-GPx Gen während der kolorektalen Karzinogenese	66
3.4.1	Ergebnisse der Sequenzierung des GI-GPx Gens	66
3.4.1.1	Übersicht über die Anzahl der Karzinome, in denen eine erfolgreiche Amplifikation und Sequenzierung des GI-GPx Gens gelang	66
3.4.1.2	Im Rahmen der Kolonkarzinogenese treten keine Mutationen im GI-GPx Gen auf	66
3.4.1.3	Polymorphismus im Exon 1 des GI-GPx Gens	68
3.4.1.4	Polymorphismus im Intron 1 des GI-GPx-Gens	69
3.4.1.5	Polymorphismus im Exon 2 des GI-GPx-Gens	70
3.4.2	Häufigkeit der identifizierten Polymorphismen in den untersuchten Kolonkarzinomgeweben	71
3.4.3	SNaPshot-Analyse an Blut-DNA zur Häufigkeitsverteilung des gefundenen Pro103Leu Polymorphismus	73
3.4.4	Untersuchungen an Zelllinien	73
4.	Diskussion	75
5.	Literaturverzeichnis	78

Danksagung

Lebenslauf

1. Einführung
1.1 Allgemeines
1.1.1 Definition

Kolorektale Karzinome entstehen nach dem derzeitigen Kenntnisstand als sporadische oder erblich bedingte Tumore auf dem Boden von gutartigen Vorläuferläsionen, den Adenomen, die ihrerseits von gesunder Kolonschleimhaut ausgehen. Maligne Neoplasien des Dickdarms (Kolon) und des Mastdarms (Rektum) bilden sich dabei auf ähnliche Weise und werden deshalb unter dem Begriff des kolorektalen Karzinoms zusammengefasst. Die Abgrenzung erfolgt nach dem Abstand des Tumors vom Analkanal: Tumore, deren unterer Rand weniger als 16cm vom Analkanal entfernt ist gelten als Rektumkarzinome.

1.1.2 Lokalisation

Mehr als die Hälfte aller kolorektalen Karzinome entstehen im Rektum (60%), gefolgt von Sigma (20%), C. transversum/C. descendens (10%) und Coecum/C. ascendens (10%). Sporadische Formen der kolorektalen Karzinome entstehen in der Mehrzahl der Fälle distal der linken Kolonflexur, während hereditäre Formen eher proximal davon gelegen sind.

1.1.3 Histologie

Histologisch handelt es sich beim kolorektalen Karzinom in über 90% der Fälle um Adenokarzinome, während andere Typen wie das Siegelringzellkarzinom, das Plattenepithelkarzinom, sowie das kleinzellige bzw. undifferenzierte Karzinom eher selten auftreten. Kolorektale Karzinome entwickeln sich aus epithelialen Dysplasien, die zunächst als benigne Adenome mit histologisch tubulärer, tubulovillöser oder villöser Differenzierung auftreten. Die Entartungstendenz nimmt dabei vom tubulären zum villösen Adenom zu.

1.1.4 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome erfolgt nach der Eindringtiefe in die Darmwand und dem Befall regionaler Lymphknoten bzw. dem Auftreten von Fernmetastasen. Das prognostisch und therapeutisch wichtige Tumorstadium wird nach der TNM-Klassifikation der UICC (Union International Contre le Cancer) bzw. der Dukes-Klassifikation erfasst, die in englischsprachigen Ländern noch verbreitet ist. Um die adäquate Therapiestrategie ermitteln zu können werden anhand der TNM-Klassifikation Stadien definiert, die den Schweregrad der Tumorerkrankung festlegen (Tabelle 1).

TNM				Dukes	5JÜL
Stadium 0	T _{is}	NO	MO		
Stadium 1	T1	NO	MO	A	90-95%
	T2	NO	MO		
Stadium 2	T3	NO	MO	B	60-80%
	T4	NO	MO		
Stadium 3	Jedes T	N1	MO	C	30-50%
	Jedes T	N2	MO		
Stadium 4	Jedes T	Jedes N	M1	D	< 10%

Tabelle 1: TNM-Klassifikation beim kolorektalen Karzinom mit Stadieneinteilung, Dukes-Klassifikation und Angabe der durchschnittlichen 5 Jahres-Überlebensrate (5JÜL).

1.1.5 Metastasierungswege

Je nach Tumortyp und Lokalisation des Primärmalignoms kann es lymphogen, hämatogen oder per continuitatem zur Metastasierung kommen, wobei die regionalen Lymphknoten (Lymphknoten entlang den Aa. ileocolica, colica dextra, colica media, mesenterica inferior, colica sinistra, rectalis superior, iliaca interna), die Leber, die Lunge, das Skelettsystem, die Nebennieren und das ZNS in absteigender Reihenfolge die am häufigsten befallenen Metastasierungsstationen sind. Beim tiefsitzenden Rektumkarzinom kommt es, bedingt durch den venösen Abfluss über die Beckenvenen und die paravertebralen Venen primär zu einer Metastasierung in die Lunge.

1.2 Epidemiologie

Von den in Deutschland jährlich neu auftretenden ca. 340 000 Malignomerkrankungen machen gastrointestinale Tumore etwa 25% aus. Mit mehr als 50 000 Neuerkrankungen im Jahr (ca. 24 000 Männer und ca. 28 000 Frauen) entfällt der Hauptanteil dieser Tumore auf das kolorektale Karzinom.

Hinsichtlich der Inzidenz steht das kolorektale Karzinom bei Männern nach dem Bronchial- und dem Prostatakarzinom an dritter und bei Frauen nach dem Mammakarzinom an zweiter Stelle. Der Altersgipfel liegt bei sporadischen Formen zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr, bei hereditären Formen deutlich früher.

Die Inzidenz ist in Industrienationen höher als in Entwicklungsländern und in osteuropäischen Ländern höher als in Westeuropa. In aussereuropäischen Ländern wie z.B. Ägypten oder Thailand tritt das kolorektale Karzinom nur sehr selten auf (Angaben: Robert-Koch-Institut; 1996).

Die relative 5-Jahresüberlebensrate beträgt nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts für Männer ca. 48% und für Frauen ca. 51%. Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache (Statistisches Bundesamt, Statistisches Jahrbuch 1998 für die Bundesrepublik Deutschland).

1.3 Ätiologie und Pathogenese

1.3.1 Allgemeines

Die Entstehung kolorektaler Karzinome ist ein über Jahre andauerndes, multifaktorielles Geschehen, bei dem komplexe Wechselwirkungen zwischen Umweltfaktoren und angeborenen bzw. erworbenen molekulargenetischen Veränderungen eine entscheidende Rolle spielen.

1.3.2 Umweltfaktoren und Familienanamnese

In zahlreichen epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass fett- und fleischreiche Ernährung (v.a. rotes Fleisch), geringe Ballaststoffaufnahme, Übergewicht, Bewegungsmangel und chronische Obstipation (Slattery, 1988; Winther 1997) wichtige Risikofaktoren darstellen. Ausserdem besteht bei positiver

Familienanamnese (Bonelli, 1988; Fuchs 1994; Guillem, 1992; 1996; Kune, 1989; Rozen, 1987; Sandergaard, 1991; St. John, 1993), sowie bei langjährigem Verlauf von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa (Böcker, 1994; Connell, 1994; Egbom, 1990; Gyde, 1988; Herfarth, 1998; Langhoz, 1992; Marchesa, 1997; Nuako, 1998; Pinczowski, 1994) und M. Crohn (Atkin, 1992; Binder, 1985; Ekbom, 1990; Greenstein, 1981; Persson, 1994) ein erhöhtes Risiko zur Entstehung von kolorektalen Karzinomen.

1.3.3 Molekulargenetische Ursachen

Die meisten kolorektalen Karzinome entwickeln sich sporadisch entlang der sog. Adenom-Karzinom-Sequenz aus benignen Vorstufen (Fearon, 1990; Vogelstein, 1993). Dabei kommt es durch Akkumulation von zahlreichen genetischen Alterationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen der ursprünglich gesunden Kolonschleimhaut zu Veränderungen der Zellreplikation, -adhäsion und -migration. Die so entstehenden zunächst gutartigen Adenome entwickeln sich im weiteren Verlauf zu Karzinomen (Fearon, 1990; Vogelstein, 1993).

Im Unterschied zu sporadischen Formen des kolorektalen Karzinoms liegt bei den weitaus selteneren hereditären kolorektalen Karzinomen bereits *eine* Keimbahnmutation in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen vor. Eine im Laufe des Lebens eintretende zusätzliche somatische Mutation im zweiten Allel des jeweiligen Gens (z.B. Deletion, Insertion, LOH = loss of heterozygosity, d.h. Verlust eines ganzen Genabschnitts durch Deletion) führt zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens bzw. Aktivierung des Onkogens und initiiert somit die Tumorentstehung („two-hit-Modell“ nach Knudson, 1971).

In den letzten Jahren konnten einige der für die Entstehung von sporadischen und hereditären Kolonkarzinomen verantwortlichen molekulargenetischen Zusammenhänge aufgeklärt werden. Dies wurde v.a. durch die Identifikation spezifischer genetischer Veränderungen bei hereditären Kolonkarzinomsyndromen möglich, auf deren Boden 5-8% aller Kolonkarzinome entstehen (Grodin, 1991; Hemminki, 1998; Howe, 1998; Jenne, 1998; Kinzler, 1991; Leach, 1993; Marsh, 1998; Miyaki, 1997; Nicolaidis, 1994; Nishisho, 1991; Olschwang, 1998;

Papadopoulos, 1994). Zu diesen, durch vererbte Keimbahnmutationen verursachten Syndromen gehören die FAP (familiäre adenomatöse Polyposis), das HNPCC (hereditäres non-polypöses Coloncarzinom), das Peutz-Jeghers Syndrom und die juvenile Polyposis. Die Häufigkeiten der einzelnen Entitäten gibt Tabelle 2 wieder.

Form des kolorektalen Karzinoms	Häufigkeit
Sporadisch	50-60%
Hereditär polygen	30-40%
HNPCC	5-8%
FAP; Peutz-Jeghers Syndrom; Juvenile Polyposis	<0,1%

Tabelle 2: Angaben über die Häufigkeit der einzelnen Kolonkarzinomentitäten.

Kolorektale Karzinome entstehen entlang der Adenom-Karzinom-Sequenz auf zwei verschiedenen molekulargenetischen Wegen: dem sog. "Tumorsuppressor-Pathway" (Fearon u. Vogelstein, 1990; Jackson, 1998) und dem sog. "Mutator-Pathway" (Perucho, 1996). Sie werden im folgenden kurz charakterisiert.

1.3.3.1 Tumorsuppressor-Pathway

Über den Tumorsuppressor-Pathway entstehen bis zu 80% aller kolorektalen Karzinome. Sie sind meist distal gelegen und bestehen überwiegend aus aneuploiden Zellen.

Entlang des Tumorsuppressor-Pathways kommt es durch Punktmutationen und LOH in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen zur Störung der Zellproliferation und -differenzierung. Betroffen sind dabei u.a. die Tumorsuppressorgene APC (Adenomatous Polyposis Coli; Chromosom 5q21), DCC (Deleted in Colorectal Cancer; Chromosom 18q21) und p53 (Chromosom 17p12-13). Bereits die Inaktivierung bzw. der Verlust eines Allels bedeutet für die jeweilige Zelle einen Proliferationsvorteil. Wenn auch das zweite Allel betroffen ist kommt es entsprechend dem „two-hit-Modell“ nach Knudson zur weiteren Progression vom Adenom zum invasiven Karzinom.

Die im Rahmen des Tumorsuppressor-Pathways hauptsächlich betroffenen Onkogene sind K-ras, myc und src. Diese greifen in die Steuerung des Zellzyklus ein und bewirken in der entarteten Zelle eine Verlängerung der Überlebenszeit, sowie eine Proliferationssteigerung.

Des Weiteren kommt es zum Verlust von multiplen Chromosomenabschnitten oder Veränderungen der DNA-Methylierung im Sinne eines Verlusts von Methylgruppen an bestimmten DNA-Abschnitten (Hypomethylierung). Nur einige dieser Alterationen können bestimmten Stadien der Tumorentwicklung zugeordnet werden (vgl. Abb. 1).

Der Verlust des APC-Tumorsuppressorgens erfolgt frühzeitig, während Verluste von Allelen auf den Chromosomen 17p und 18q meist erst in späteren Stadien der Tumorgenese auftreten. Dabei scheint weniger die Reihenfolge der Veränderungen ausschlaggebend zu sein als vielmehr die Häufung der Mutationen.

Der frühzeitige APC-Gendefekt mit nachfolgendem Funktionsverlust des Proteins beim sporadischen Kolonkarzinom (deshalb auch als sog. „gatekeeper-Gen“ bezeichnet), spricht für die Bedeutung des APC-Tumorsuppressorgens bei der Regulation von Zellproliferation und -differenzierung und für die Initiierung der Kolonkarzinogenese.

Der frühe APC-Verlust konnte indessen auch als entscheidendes Ereignis bei der Entstehung der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) identifiziert werden.

1.3.3.1.1 Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)

Die autosomal-dominant vererbte FAP tritt mit einer Häufigkeit von ca. 1% aller hereditären kolorektalen Karzinome auf und ist eine obligate Präkanzerose. Sie ist charakterisiert durch das Auftreten von weit über 100 Adenomen, bevorzugt im distalen Kolon und Rektum und führt ohne Intervention (Proktokolektomie) mit nahezu 100%iger Wahrscheinlichkeit zur Entstehung eines Kolonkarzinoms in der 2. bis 4. Lebensdekade (Luschka, 1861; Skilafoswske, 1881; Hanford, 1890; Bussey, 1975).

1991 konnten Keimbahnmutationen im APC-Tumorsuppressorgen als molekulargenetische Ursache der FAP nachgewiesen werden. Sie führen zur

Inaktivierung des ersten Allels (Grodin, 1991; Kinzler, 1991; Nishisho, 1991). Durch genetische Alterationen im zweiten Allel (z.B. Deletionen, Insertionen) kommt es zum vollständigen Funktionsausfall des APC-Gens („two-hit-Modell“ von Knudson, 1971).

Das APC-Gen besteht aus 15 Exons und liegt auf Chromosom 5q21. Das Genprodukt greift entscheidend in die Zelladhäsion und -proliferation ein und interagiert dabei mit zahlreichen Proteinen wie z.B. E-Cadherin oder β -Catenin (Bodmer, 1987; Nishisho, 1991; Kinzler, 1991; Stella, 1992; Joslyn, 1991; Grodin, 1991; 1993; Olschwang, 1993; Varesco, 1993; Morin, 1997; Tomlinson, 1997). Die Mutationen im APC-Tumorsuppressorgen liegen individuell an verschiedenen Stellen im Gen. Bisher wurden über 800 Keimbahnmutationen festgestellt (Jungck, 1999), so dass es für die molekulargenetische Diagnostik keine "hotspots" gibt.

1.3.3.2 Mutator-Pathway

Der sog. Mutator-Pathway, auf dem ca. 20% aller kolorektalen Karzinome entstehen, zeichnet sich durch Mutationen in Mismatch-repair-Genen (MMR) aus, die u.a. im Dienst der Reparatur von Replikationsfehlern stehen, die während der Zellteilung häufig auftreten.

Durch teilweisen oder vollständigen Verlust des MMR-Systems kommt es zur Anhäufung von Replikationsfehlern, was sich besonders durch genetische Instabilität mit hoher Mutationsrate in repetitiven DNA-Abschnitten, den sog. "Mikrosatelliten" bemerkbar macht.

Mikrosatelliten können mononukleotid (z.B. Adenin_(n)), dinukleotid (z.B. Adenin-Guanin_(n)) oder komplex-höhergradig sein. Die Anzahl (n) dieser Basenwiederholungen ist interindividuell variabel, d.h. polymorph und intraindividuell charakteristischerweise in jeder Zelle gleich, d.h. somatisch stabil. Diese DNA-Abschnitte befinden sich sowohl in kodierenden, als auch in nicht-kodierenden Bereichen des jeweiligen Gens und sind über das gesamte Genom verteilt. Die Art und Anzahl der Basenabfolgen der Mikrosatelliten sind genetisch determiniert und werden normalerweise bei jeder Replikation unverändert an die Tochterzellen weitergegeben.

MMR-Defekte manifestieren sich im Tumorgewebe als "Mikrosatelliteninstabilität" (MSI), d.h. dass es in der Anzahl der sich wiederholenden Basen in einem Repeat zu Veränderungen kommt, weil falsch eingebaute Nukleotide unkorrigiert weitergegeben werden (Ionov, 1993; Thibodeau, 1993; Aaltonen, 1994; Jacoby, 1995).

Während die funktionelle Bedeutung von MSI in nicht-kodierenden Genabschnitten noch weitgehend unklar ist, führen MSI in kodierenden Genabschnitten zum Frameshift und damit verbunden häufig zum Funktionsverlust des betroffenen Gens. Beispiele für derartige Gene sind u.a. TGF β 2R (transforming growth-factor-beta 2 receptor), IGF2R (insuline-like growth-factor-beta 2 receptor) und BAX (bcl2-associated X gene) (Rampino, 1997; Souza, 1996; Markowitz, 1995; Parsons, 1995).

1.3.3.2.1 Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom (HNPCC)

Als klassischer hereditärer Vertreter des Mutator-Pathways macht das autosomal-dominant vererbte HNPCC mit ca. 2-5% aller kolorektalen Karzinome die grösste Gruppe aus. Genetische Grundlage sind MMR-Gendefekte, die zur MSI führen (Peltomaki, 1993; Fishel, 1993; Bronner, 1994; Papadopolous, 1994; Kullmann, 1996) (vgl. 1.3. 3.2). Es konnten bei HNPCC-Patienten in fünf verschiedenen MMR-Genen (hMSH2; hMLH1; hPMS1; hPMS2; hMSH6), sowie dem ebenfalls am Mismatch-repair beteiligten Exo1-Gen Mutationen nachgewiesen werden. Dabei sind ca. 60% der bisher identifizierten Keimbahnmutationen im hMLH1-Gen und ca. 35% im hMSH2-Gen lokalisiert (Al-Taie, 2001).

Die Erkrankung, die 1913 von Warthin (Warthin, 1913) und 50 Jahre später von Lynch beschrieben wurde, zeichnet sich aus durch ein erhöhtes Risiko für extrakolische Malignome (zusätzlich Malignome des Endometriums, des Magens und Harntraktes, der Gallenwege, der Haut und der Blutbildung), kürzere Latenz bis zur Ausbildung eines kolorektalen Karzinoms aus kolorektalen Adenomen (bereits in der 4. Lebensdekade) und nicht-polypöses Wachstum.

Die Diagnose wird anhand der Familienanamnese (Amsterdam-Kriterien 1 und 2) gestellt und durch Untersuchungen an Mikrosatelliten ergänzt. Ein typischer

Phänotyp wie er bei der FAP vorliegt fehlt bei der HNPCC. Auch gibt es therapeutisch noch keine einheitlichen Massregeln, insbesondere hinsichtlich einer prophylaktischen Kolektomie.

Folgende Schemazeichnung gibt einen Überblick über die beiden Hauptwege der Kolonkarzinogenese und die dabei hauptsächlich beteiligten Gene:

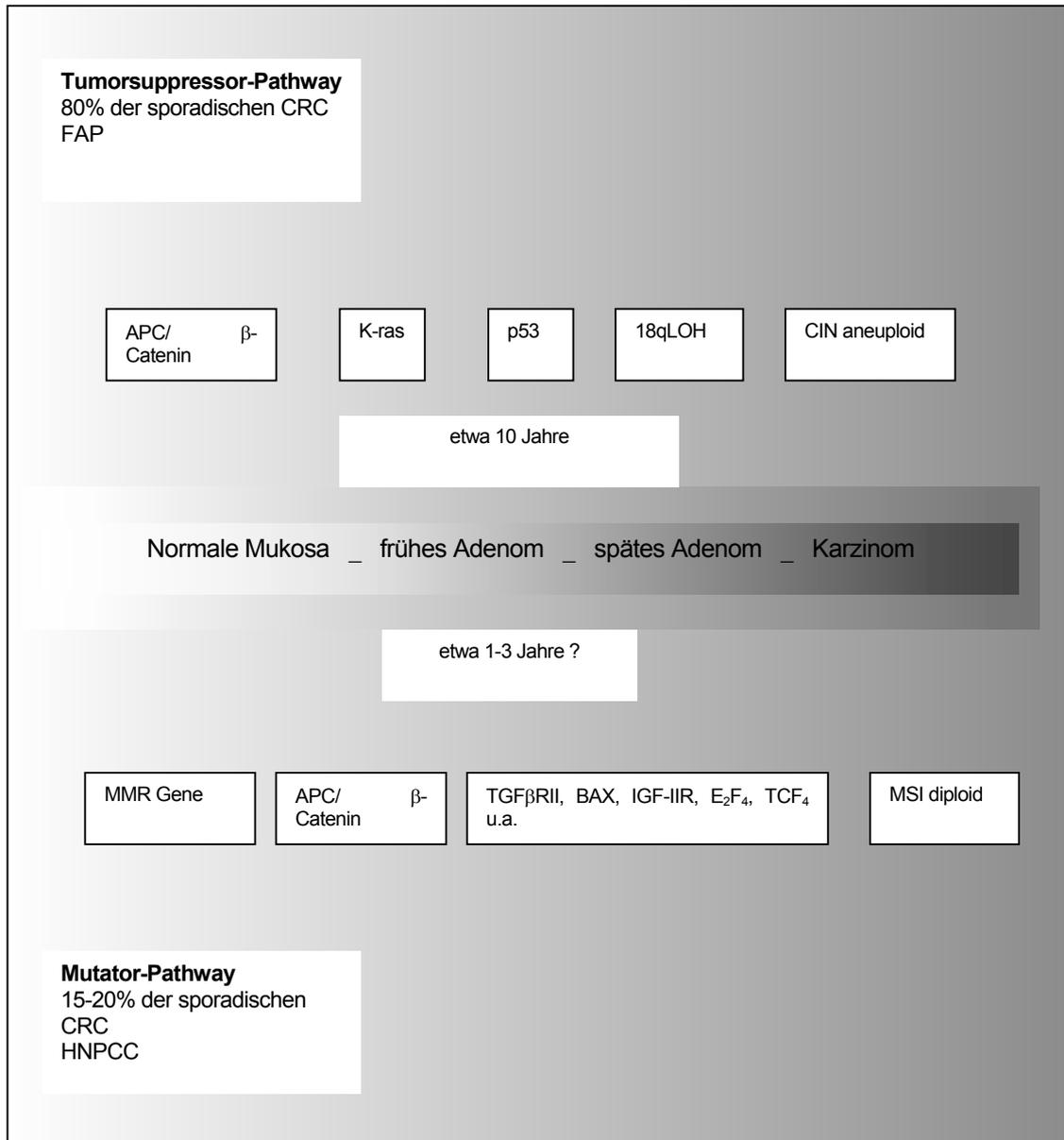


Abb. 1: Tumorsuppressor- und Mutator-Pathway und die beteiligten Gene.
 CIN: Chromosomale Instabilität; MSI: Mikrosatelliteninstabilität; MMR-Gene: Mismatch-repair-Gene

1.3.3.3 Besonderheiten MSI-positiver kolorektaler Karzinome

Defekte im MMR-Genesystem mit MSI sind bei 70% von HNPCC-Tumoren aber auch bei 15% der Patienten mit sporadischem kolorektalem Karzinom nachweisbar. Dabei führt v.a. die Methylierung des Promotors von hMLH1 zum MMR-Defekt (Gryfe, 2000; Herman, 1998; Aaltonen, 2000; Offit, 2000; Miyakura, 2001; Samowitz, 2001). Diese Tumore zeichnen sich aus durch ein jüngeres Manifestationsalter, häufigeres Vorkommen proximal der linken Kolonflexur und gering-differenzierte, eher muzinöse Tumorzellen (Guidoboni, 2001; Alexander, 2001).

Hinsichtlich ihres Verhaltens bei Einsatz von Chemotherapeutika zeigen MSI-positive Tumore bemerkenswerte Eigenschaften. In zahlreichen retrospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass HNPCC-assoziierte, sowie auch sporadische kolorektale Karzinome, die MSI-positiv sind, eine bessere Prognose haben als MSI-negative kolorektale Karzinome (Bubb, 1996; Chen, 1997; Gryfe, 2000; Lothe, 1993; Sankila, 1996; Thibodeau, 1993; Watson, 1998; Wright, 2000). In anderen Studien konnte dieser Zusammenhang allerdings nicht gefunden werden (Bertario, 1999; Curran, 2000; Feeley, 1999; Lukish, 1998; Percesepe, 1997). Sichere Daten sind noch abzuwarten.

Ausserdem zeigen MSI-positive kolorektale Karzinome im Vergleich zu sporadischen, MSI-negativen Karzinomen ein verändertes Ansprechen auf Chemotherapeutika, wobei die Datenlage allerdings auch hier noch kontrovers diskutiert wird (Aebi, 1997; Carethers, 1999; Fink, 1996; Friedman, 1997; Elsaleh, 2000; Hemminki, 2000).

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies und antioxidative Schutzmechanismen

1.4.1 Allgemeines

Die unter 1.3.3 bereits erwähnten Mutationen in Protoonkogenen, Tumorsuppressor- und MMR-Genen, die zu einer erhöhten Entartungstendenz der Zelle führen, können durch unterschiedliche Einflüsse verursacht werden. Eine wichtige Rolle spielen dabei DNA-Schädigungen, die durch freie Radikale, Peroxide

und reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species: ROS) hervorgerufen werden (Cerutti, 1985; Malins, 1996; Jackson, 1998).

1.4.2 Reaktive Sauerstoffspezies

In allen Organismen, die Sauerstoff verstoffwechseln entstehen Sauerstoffradikale bzw. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Michaelis, 1994). Dazu gehören u.a. Superoxidanionenradikale ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale ($HO\cdot$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon (O_3) und Singulett-Sauerstoff ($O\cdot$).

Diese reaktiven Stoffwechselprodukte entstehen physiologischerweise bei endogenen Reaktionen wie z.B. bei der oxidativen Phosphorylierung, dem "respiratory burst" von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten während der Phagozytose, bei der Einwirkung oxidativer Enzymsysteme (Xanthinoxidase, Monoaminoxidase, P450, membranständige NADPH-Oxidase), sowie bei der Prostaglandin- und Leukotriensynthese.

Daneben begünstigen auch exogene Einflüsse wie UV-Licht, Ultraschall, Röntgen- und Gamma-Strahlen, Chemikalien, Ozon, Medikamente und Halogene die Radikalbildung (Winnefeld, 1997; Halliwell, 1994).

Weitere Radikalspezies sind u.a. das durch die NO-Synthase im Rahmen von Entzündungsreaktionen aus L-Arginin gebildete Stickstoffmonoxid, sowie Alkoxy-, α -Tocopheryl-, Ascorbyl- und Kohlenwasserstoffradikale (Winnefeld, 1997).

Der Gastrointestinaltrakt ist dem Einfluss von ROS in besonderem Masse ausgesetzt, da es hier zum Kontakt der Darmwand mit ROS aus drei Quellen kommt: sie werden mit der Nahrung aufgenommen, entstehen bei der Verdauung und werden von der Darmflora selbst gebildet.

1.4.3 Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies

Freie Radikale übernehmen in der Zelle wichtige Aufgaben wie z.B. bei der Feinabstimmung der zellulären Signalgebung, der Induktion von Wachstum und Apoptose, sowie bei Abwehrfunktionen immunkompetenter Zellen (Fehrenbach, 2001; Saiganik, 2001).

Zugleich sind ROS allerdings so stark reaktive Verbindungen, dass sie sowohl mit Nucleinsäuren, Proteinen und Lipiden reagieren (Winnefeld, 1997), als auch direkt mutagen wirken können (Imay, 1988). Vor allem ihre schädigende Wirkung an der DNA macht sie zu Induktoren von Präkanzerosen und Tumoren u.a. im Kolon (Jackson, 2001; Dreher, 1996; Weitzman, 1990). So führt oxidativer Stress an der DNA u.a. zu Basenveränderungen, DNA-Strangbrüchen, Fragmentation der Desoxyribose (Peskin, 1997), sowie zur MMR-Defizienz (Jackson, 1998).

Zusätzlich können ROS durch Oxidation der Zellmembranphospholipide zu Veränderungen der Membranpermeabilität führen und die Enzymaktivität und das Bindungsverhalten von Rezeptoren modulieren (Gibson, 1995; Reiter, 1995).

Hydroxylradikale sind die reaktivsten ROS und können enzymatisch nicht inaktiviert werden (Winnefeld, 1997). Sie greifen bevorzugt an der Base Guanin an, was durch die Bildung von 8-Hydroxyguanin Basenfehlpaarungen bei der Replikation verursacht (Guyton, 1994). Es wurde gezeigt, dass humane ROS von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in Bakterien und Säugetierzellen zu Mutationen führen können (Weitzman, 1981) und dass es unter ihrem Einfluss auch zu chromosomalen Veränderungen wie Chromatidaustausch und DNA-Strangbrüchen kommen kann (Weitenberg, 1983; Breen, 1995). ROS scheinen somit bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren eine bedeutende Rolle zu spielen (Keshavarian, 1993)

Die Anzahl der durch ROS verursachten Schäden (hits) wird mit über 20 000 pro Zelle und Tag geschätzt (Beckman, 1997; Jackson, 1998).

1.4.4 Antioxidantien

Ohne die Wirkung von Antioxidantien, die die Bildung von ROS verhindern, entstandene ROS enzymatisch bzw. nicht-enzymatisch „entsorgen“ bzw. durch ROS verursachte Schäden reparieren (Prävention – Interzeption – Reparatur), würde es zur Selbstzerstörung des Organismus kommen. Um das Gleichgewicht zwischen Radikalbildung und -abbau zu wahren und somit dem oxidativen Stress, der durch das Überwiegen der Radikalbildung entsteht, entgegenzuwirken, nutzt

die Zelle enzymatische und nicht-enzymatische Schutzmechanismen (Winnefeld, 1997; Sies, 1991; 1993; 1997; Böhles, 1995; Köhrle, 1995).

Zu den nicht-enzymatischen Möglichkeiten der Zelle gehören u.a. Vitamin E (hauptsächlich α -Tocopherol: Reduktion von Lipidperoxidradikalen), Vitamin C, β -Karotin (Reaktion mit Hydroxylradikalen und Singulett-Sauerstoff) und Urat (Radikalfänger) (Sies, 1993; Hathcock, 1997).

Antioxidativ wirkende Enzyme sind v.a. die Katalase ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), die Superoxiddismutase (Superoxidanionradikale $\rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$), sowie verschiedene Selenoproteine, besonders die Thioredoxinreduktasen ($\text{TrxR}\alpha$, $\text{TRxR}\beta$), das Selenoprotein P (SeP), sowie die Isoenzyme der Glutathionperoxidase (GPx), deren Rolle beim Schutz vor dem physiologischen und pathologischen oxidativen Stress in den letzten Jahren zunehmend diskutiert wird.

1.5 Selen und Selenoproteine

1.5.1 Selen

Selen wurde 1817 vom schwedischen Chemiker J. Berzelius entdeckt. Bis 1957 war es nur wegen seiner Toxizität bekannt und von der amerikanischen Food and Drug Gesellschaft als Karzinogen gelistet (Beath, 1934; Franke, 1935; Yang, 1989). Erst durch die Experimente von Schwarz et al. wurde Selen als essentielles Spurenelement erkannt (Schwarz, 1957).

Selen hat eine weite Verbreitung und kommt spurenweise in praktisch allen Gewässern, Böden und Gesteinen vor, zeigt dabei allerdings regionale Unterschiede, was sich - determiniert durch den Selengehalt des jeweiligen Bodens - auch im Selengehalt von pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln widerspiegelt.

Es wird besonders im oberen Dünndarm als organisches Selen (Selenit) oder als Selenaminosäure (Selenocystein bzw. Selenomethionin) resorbiert. Nach Einbau ins aktive Zentrum verschiedener Selenoproteine (vgl. 1.5.4) beteiligt es sich an zahlreichen Redoxprozessen in der Zelle (Wolfram, 1995; Böck, 1991). Die Ausscheidung erfolgt über die Niere, die Lunge, die Haut und über den Darm.

Selen kommt im menschlichen Organismus zwar in allen Zellen vor, die Selenverteilung im Körper ist jedoch ungleichmässig: Die Schilddrüse hat vor

Nieren und Gonaden den grössten Anteil am Selenpool. Auch Muskelgewebe und Leberzellen gehören zu den selenreichen Geweben.

Die durchschnittliche Selenaufnahme in Deutschland beträgt ca. 30-50µg pro Tag, während die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung empfohlene Aufnahme bei ca. 70µg/d liegt. Nach wie vor fehlen verbindliche Richtwerte bezüglich der zu empfehlenden täglichen Selenaufnahme.

1.5.2 Selenmangelerkrankungen

Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass Selenmangel zu verschiedenen Krankheitsbildern wie Lebernekrosen, Muskeldystrophien, Herz- und Skelettschädigungen beitragen kann (Schwarz, 1957; Muth, 1971). Auch beim Menschen sind Selenmangelkrankheiten beschrieben. Die beiden bekanntesten sind die Keshan-Krankheit und die Kaschin-Beck-Krankheit.

Bei der Keshan-Krankheit handelt es sich um eine seit 1935 bekannte, endemische Kardiomyopathie, die in Zentralchina beobachtet wird und zu myokardialen Nekrosen und Fibrosen führt. (Ge, 1983; Schrauzer, 1983). Es konnte ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Keshan-Krankheit und der Selenmangelversorgung in der Region erkannt werden (Jr, Combs, 1986), wobei die Inzidenz bei regelmässiger Selensubstitution verringert werden konnte. Allerdings zeigten neuere Studien, dass wahrscheinlich auch Viren (Coxsackie B3) bei der Pathogenese der Keshan-Krankheit eine Rolle spielen (Bai, 1982; Beck, 1995).

Auch die Kaschin-Beck-Krankheit ist eine endemische Erkrankung, die u.a. in Nordchina vorkommt (Schrauzer, 1983). Die Erkrankung wurde erstmals 1849 beschrieben und äussert sich mit Gelenkentzündungen, die bei Selenminderversorgung auftreten (Aaseth, 1981). Pathogenetisch führt dabei der Selenmangel durch ungenügend abgebaute Peroxide zur Gelenkzerstörung.

Daneben werden verschiedene Allgemeinsymptome wie Müdigkeit oder Haar- und Nagelveränderungen mit einer Selenmangelversorgung in Verbindung gebracht.

1.5.3 Erkrankungen bei Selenüberangebot

Bei chronischer Selenüberladung z.B. durch zu hohen Selengehalt des Bodens (z.B. Hubei-Provinz, China) bzw. der aufgenommenen Lebensmittel können charakteristische Symptome wie vermehrte Karies mit zusätzlichem knoblauchartigem Geruch, Müdigkeit, Veränderungen an Haaren (Brüchigkeit, Ausfall) und Nägeln (Streifen, weisse Flecken), sowie periphere Neuropathien beobachtet werden. Durch alimentäre Selenüberdosierung in bestimmten Regionen kam es zum gehäuften Auftreten zentralnervöser Erkrankungen wie der amyotrophen Lateralsklerose (Vinceti, 1996).

Künftig werden Selenintoxikationen bei der Selenselbstmedikation möglicherweise eine grössere Rolle spielen, da die therapeutische Breite sehr gering ist. Obere Grenzwerte fehlen zwar, jedoch wird empfohlen, dass die tägliche Aufnahme 200-400µg nicht überschreiten sollte, da es bei chronischer Zufuhr in Dosen von über 800µg toxisch wirkt.

1.5.4 Seleneinbau in Selenoproteine

Selen wird als Selenocystein in das aktive Zentrum von Selenoproteinen eingebaut (vgl. 1.5.5). Sowohl bei Prokaryonten, als auch bei Eukaryonten wird das Selenocystein dabei von einem UGA-Codon codiert, was eigentlich ein opales Stop-Codon ist. Im Fall der Selenoproteine führt es allerdings nicht zum Kettenabbruch, sondern zum Einbau von Selenocystein ins aktive Zentrum (Zinoni, 1986; Chambers, 1986; Low, 1996).

Die Erkennung dieses spezifischen Codons als Selenocystein wird durch das sog. SECIS-Element (selenocysteine insertion sequence), das sich als dreidimensionale Haarnadelstruktur auf der mRNA befindet, gewährleistet. Bei Prokaryonten liegt das SECIS-Element im codierenden Abschnitt unmittelbar am UGA-Codon, bei Eukaryonten hingegen in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) (Heider, 1992; Berry, 1991; Martin, 1996; Walczak, 1996). Die Reaktionskette lautet bei Prokaryonten wie folgt:

Zunächst wird eine spezifische tRNA^{Sec}, das Produkt des SelC-Gens mit Serin beladen (Lee, 1990; Leinfelder, 1988). Anschliessend wird es durch die Katalase der Selenocystein-Synthetase, die ihrerseits das Produkt des SelA-Gens ist, zu Selenocystein modifiziert. Bei diesem Vorgang wird Selenophosphat als Selendonor verbraucht, was durch die Selenophosphat-Synthetase, dem Genprodukt des SelD-Gens unter ATP-Verbrauch synthetisiert wird. Das translatierende Ribosom wird anschliessend durch den speziellen Elongationsfaktor SelB mit Selenocysteyl-tRNA^{Sec} beliefert.

SECIS-Strukturen enthalten in allen bisher bekannten Selenoproteinen hochkonservierte Bereiche. Deshalb werden sie im Rahmen der experimentellen Forschung zur Identifizierung weiterer Selenoproteine herangezogen (Kryukov, 1999; Lescure, 1999).

Beim Menschen konnten indessen neben SelC und SelD-Analoga auch eine zweite Selenophosphat-Synthetase (SPS2) charakterisiert werden. Da die SPS2 selber auch Selenocystein enthält spielt sie möglicherweise eine Rolle bei der zentralen Regulation der selenstatusabhängigen Selenoproteinsynthese (Guimaraes, 1996).

1.5.5 Selenoproteine

Allen Selenoproteinen ist gemeinsam, dass sie Selen im aktiven Zentrum als Selenocystein gebunden haben und dass der Seleneinbau für die Funktion des jeweiligen Proteins essentiell ist. Von den im menschlichen Organismus vermuteten über 30 verschiedenen Selenoproteinen (Behne et al.) sind bisher u.a. die 4 Isoformen der Glutathionperoxidase, das Selenoprotein P, die Familie der Dejodasen und der Thioredoxinreduktasen im Hinblick auf Funktion und Struktur untersucht worden. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über einige der bisher bekannten Selenoproteine:

Selenoprotein	Funktion
Dejodasen	Vgl. A
Thioredoxinreduktase	Vgl. B
Selenoprotein P	Vgl. C
Glutathionperoxidase	Vgl. D
Selenoprotein W	Ein Muskelenzym (Allan, 1999; Sunde, 1997)
Selenophosphatsynthetase	Wichtig für die Synthese von Selenophosphat als Vorstufe für Selenocystein und damit für Selenoproteine (Allan, 1999)
Mitochondriale Kapselselenoproteine der Spermien	Unterform der GPx; schützt reife Spermazellen vor oxidativer Schädigung; im weiteren Verlauf: Polymerisation zu Strukturproteinen zur Stabilität und Reifung von Spermazellen (Ursini, 1999)
Prostatisches Epithelselenoprotein	Wahrscheinlich Redoxfunktion mit Schutz vor Karzinomentstehung (Behne, 1997)
DNAgebundenes spermatoides Selenoprotein	Schutz für reife Spermatozoen (Behne, 1997)
18kDa Selenoprotein	v.a. in Nieren vorkommend; auch bei Selenmangel exprimiert (Behne, 2000)

Tabelle 3: Zusammenstellung einiger Selenoproteine und ihrer Funktionen (aus Rayman, 2000).

A) Dejodasen

Zur Familie der Dejodasen gehören die Typ 1 5`-Dejodase, die Typ 2 5`-Dejodase und die Typ 3 5`-Dejodase. Während die Typ 1 und 2 5`-Dejodase die Dejodierung von L-Thyroxin (T4) zum 3,5,3`-Triiod-L-Thyronin (T3) katalysieren und damit das Hormon aktivieren, überführt die Typ 3 5`-Dejodase das T3 und das T4 in die jeweils inaktive Form, was durch Dejodierung am Thyrosylring erfolgt. Dadurch steuern die Dejodasen die Produktion und die Regulation des Aktivitätslevels der Schilddrüsenhormone.

B) Thioredoxinreduktasen TRxR

Die aus mindestens 2 Isoenzymen bestehende Thioredoxinreduktase-Familie (TrxR α , TRxR β) wurde 1996 als Selenoprotein identifiziert (Arner, 2000; Mustacich, 2000; Tamura, 1996; Gladyshev, 1996). Zu den Funktionen der TRxR gehören die Reduktion von Nukleotiden bei der DNA-Synthese, die Regeneration von verschiedenen antioxidativen Systemen wie beispielsweise Ascorbat und α -

Tocopherol, die Erhaltung des intrazellulären Redoxgleichgewichts (Allan, 1999), sowie die Regulation der Proteinfaltung, Modulation redoxregulierter Transkriptionsfaktoren wie NFκB (nuclear factor-κB) oder AP1 (activator protein-1) und NADPH-abhängige Reduktion von Thioredoxin (Berry, 1993; Jakob, 1997; Dreher, 1998; Sen, 1996; Holmgren, 1995). Dabei werden einige Reaktionen durch das Thioredoxin, einige auch durch das Enzym selbst katalysiert.

C) Selenoprotein P (SeP)

Das Glykoprotein SeP, das im Organismus in zwei Varianten vorkommt (SeP 10; SeP 2) enthält nahezu 60% des humanen Plasmaselens (Burk, 1994; Harrison, 1996) und ist vor allem bezüglich seiner genetischen Lokalisation interessant. Es befindet sich auf Chromosom 5q31 (Hill, 1996) und liegt somit dem APC-Tumorsuppressorgen benachbart, das bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen eine Schlüsselrolle spielt (vgl. 1.3.3.1). Als Funktion werden Selentransport und antioxidativer Schutz diskutiert (Motsenbocker, 1982; Burk, 1980; 1995; Saito, 1999; Hill, 1991; 1993; Steinert, 1997; Arteel, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass SeP Peroxynitrit (Sies, 1998) und Phospholipid-Hydroperoxid (Saito, 1999) reduziert. Die hohe Korrelation zwischen SeP-Konzentration und Serum-Selenspiegel macht SeP zum möglichen Screening-Marker für den Selenstatus im Organismus (Hill, J.Nutr. 1996; Marchaluk, 1995; Persson-Moschos, 1995; Huang, 1995).

D) Glutathionperoxidasen (GPx)

Die Familie der Glutathionperoxidasen (GPx) besteht aus Enzymen, die die Reduktion von Hydroxyperoxiden und Wasserstoffperoxid katalysieren, wobei sie reduziertes Glutathion als Kofaktor verwenden.

Bisher konnten vier verschiedene Isoformen selenabhängiger GPx charakterisiert werden (Ursini, 1995), die alle von verschiedenen Genen kodiert werden und sich auch in ihrer Verteilung in den einzelnen Körpergeweben unterscheiden: die plasmatische GPx (pGPx), die cytosolische GPx (cGPx), die Phospholipidhydroperoxid GPx (PHGPx) sowie die gastrointestinale GPx (GI-GPx).

Der Gastrointestinaltrakt ist dabei das einzige Organsystem, in dem alle vier Isoformen zugleich exprimiert werden. Diesen verschiedenen Isoformen der GPx (vgl. Tabelle 3) wird als Antioxidantien eine wichtige Rolle beim Abbau von Peroxiden und bei der Bekämpfung des intrazellulären und extrazellulären oxidativen Stress zugeschrieben (Brigelius-Flohé, 1994; Chu, 1993; Ursini, 1995).

cGPx, pGPx und GI-GPx sind im Zytosol lokalisiert und liegen als tetramere Proteine vor. PGPx wird sezerniert. Die PHGPx, die zusätzlich auch als membranständiges Molekül vorkommt, hat eine monomere Struktur.

Das aktive Zentrum jeder Untereinheit dieser GPx enthält einen Selenocysteinrest, in dem das Schwefelatom durch ein kovalent gebundenes Selen ersetzt ist. Mit diesem Rest reduzieren die GPx Peroxide zu Alkohol bzw. Wasser, wobei sie selber von der Selenolatform (E-Se-) zur Selenylsäure (E-SeOH) oxidiert werden. Durch Reaktion mit GSH kommt es anschliessend zur Bildung von Selensulfid (E-Se-S-G) und ein weiteres GSH regeneriert das aktive Zentrum des Enzyms unter Bildung von oxidiertem Glutathion.

Die cGPx wurde als erstes Säuger-Selenoprotein bereits 1957 entdeckt (Mills, 1957; Flohé, 1973; Rotruck, 1973). Als wichtiges antioxidativ wirkendes Enzym wird es vor allem in Erythrozyten, Leber und Niere gebildet (Flohé, 1973; Rotruck, 1973; Sunde, 1994; Mills, 1959). Das humane cGPx-Gen konnte auf Chromosom 3q11-3q12 lokalisiert werden. Unter Selenmangelbedingungen im Rahmen von Zellkulturuntersuchungen kam es zu einer starken Abnahme der Enzymaktivität aufgrund der Instabilität der mRNA bei eingeschränkter Verfügbarkeit von Selenocystein. Daher kann cGPx als Marker der Selenversorgung im Organismus dienen (Wingler, 1999).

Die pGPx wurde 1987 in Blutplasma entdeckt und charakterisiert. Es lässt sich, trotz einer über 50%igen Übereinstimmung auf DNA-Ebene durch unterschiedliches Wanderungsverhalten im SDS-Gel und unterschiedliche Antikörperspezifität von cGPx unterscheiden (Takahashi, 1987; Yoshimura, 1994). Das Gen befindet sich auf Chromosom 5q32. pGPx ist ein extrazelluläres Antioxidans, wobei es allerdings bedingt durch das geringe Thiolangebot nur

geringe Effektivität zeigt. Die höchsten Konzentrationen werden u.a. in der Niere, Ziliarkörper, Leber, Lunge, Muskulatur, Pankreas, Dickdarm bzw. Plazenta gebildet und sezerniert (Avissar, 1991; 1996; Kingsley, 1998; Huang, 1997; Yoshimura, 1991). Unter Selenmangelbedingungen reagiert es ähnlich wie cGPx.

Das 22kD schwere PHGPx-Protein ist besonders bei der Reduktion von Phospholipid-, und Linolsäure-Hydroperoxiden wirksam, wobei zum effektiven Schutz der Lipide vor Peroxidation Vitamin E notwendig ist (Roveri, 1994). Es ist somit ein wichtiger antioxidativer Schutzfaktor für biologische Membranen (Ursini, 1985; Maiorino, 1990). Das codierende Gen konnte auf Chromosom 19 nachgewiesen werden (Chu, 1994). Die höchste Enzymaktivität wurde in Testes gefunden (Roveri, A., 1992). Ausserdem wurde PHGPx kürzlich als Strukturprotein der Mitochondrienmembran von Spermatozoen identifiziert (Ursini, 1999). Dass PHGPx auch Cholesterin-Hydroperoxide reduzieren, lenkte die Aufmerksamkeit auf eine mögliche Beteiligung des Enzyms bei der Atherogenese (Sattler, 1994). PHGPx wirkt ausserdem auch bei der DNA-Reparatur mit (Bao, 1997).

1.5.6 Gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx)

1.5.6.1 Vorkommen

Die mRNA der im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersuchten GI-GPx, einer cytosolischen Isoform der GPx, wird bei der Ratte lediglich in den Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts (GIT) (Ösophagus bis distales Kolon) gefunden, wobei die höchste Konzentration im Ileum und Coecum detektiert wurde. Das Protein erscheint in den Krypten und Villi des mittleren und unteren GIT (Chu, 1993; 1995; Esworthy, 1998).

Beim Menschen wird die mRNA ausser in Zellen des GIT auch in der Leber exprimiert (Chu, 1993).

1.5.6.2 Struktur und Bildung

Die Klonierung der cDNA erfolgte aus boviner Leber und anschliessendem Screening einer cDNA-Bibliothek der humanen HepG2-Zelllinie (Chu, 1992). Das Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 14q24 und besteht aus zwei Exons:

GI-GPx Exon 1 und GI-GPx Exon 2 (Chu, 1997). Exon 1 besteht aus 222 Basenpaaren (bp), Exon 2 aus 330bp. Die Länge des Intronabschnitts zwischen diesen beiden Genen beträgt 2665bp.

Bei Untersuchungen von Chu et al. wurde das GPx-Gen der Maus auf Chromosom 12 - korrelierend zur Lokalisation beim Menschen - in der Nähe des Kolonkarzinom-Suszeptibilitätsgens Ccs 1 gefunden (Chu, 1997).

Das Genprodukt der GI-GPx ist ein homotetrameres Protein und enthält pro Untereinheit einen Selenocysteinrest im katalytischen Zentrum. Dieses wird über das Basentriplett UGA codiert und mit Hilfe eines SECIS-Elements erkannt und eingebaut (vgl. 1.5.4).

1.5.6.3 Stabilität unter Selenmangel

Für die Biosynthese der Glutathionperoxidasen (GPx) ist die zelluläre Verfügbarkeit von Selen essentiell. Nur bei optimalem Selenangebot werden alle vier Isoformen der GPx exprimiert. Wenn der Selengehalt im Serum sinkt, verändert sich die Syntheserate der einzelnen GPx-Isoformen, da das vorhandene Selen nur noch in die Synthese von bestimmten GPx-Isoformen kanalisiert wird. Ausserdem führt der Selenmangel zur vorzeitigen Degeneration der mRNA der einzelnen GPx-Isoformen (Christensen, 1992; Bermano, 1996). Dabei werden diejenigen Isoformen, die als letzte auf den Selenmangel reagieren bei Optimierung des Selenangebots als erste regeneriert (Weitzel, 1990).

Wingler et al. konnten zeigen, dass die GI-GPx in Zelllinien und im GIT von Ratten auch bei Selenmangel nahezu unverändert exprimiert wird und bei Selensubstitution am schnellsten wieder seine Maximalkonzentration erreicht (Wingler, 1999): in selendefizienten HepG2 und CaCo2-Zellen blieben unter vermindertem Selenangebot geringe Mengen an GI-GPx-Protein detektierbar, hinsichtlich der GI-GPx-mRNA-Expression konnte sogar eine Steigerung unter Selenmangelbedingungen festgestellt werden (Wingler, 1999). Bei Selensubstitution der Zellen wurde als erstes GI-GPx-Protein synthetisiert. Es

erreichte seine maximale Konzentration bereits nach 18 Stunden, wohingegen beispielsweise die cGPx dazu fast 3 Tage benötigte. Im GIT selendefizienter Ratten blieb die mRNA-Expression nahezu unverändert hoch (Winger, 2000).

Die hohe Stabilität der GI-GPx- mRNA bei Selendefizienz, die Geschwindigkeit, mit der die Maximalwerte bei Optimierung des Selenangebots wieder erlangt werden und die kaum erreichbare komplette Ausschaltung der GI-GPx-Proteinsynthese bei Selenmangel zeigen, dass die GI-GPx in der Rangfolge der GPx eine führende Stellung hat, was sich v.a. in der mRNA-Stabilität widerspiegelt (Brigelius-Flohé, 1999):

$$\text{GI-GPx} > \text{PH-GPx} > \text{p-GPx} = \text{c-GPx}$$

1.5.6.4 Funktion

Die GI-GPx dient hauptsächlich als Absorptionsbarriere gegen Hydroperoxide. Diese fallen im Organismus aus verschiedenen Quellen an: sie werden mit der Nahrung aufgenommen, oder entstehen endogen, z.B. beim Abbau von Xenobiotika (Chu, 1993; Aw, 1994) bzw. im Rahmen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Parks, 1983).

Die ausgeprägte mRNA-Stabilität der GI-GPx unter Selenmangelbedingungen (vgl. 1.5.6.3), ihre hohe Substratspezifität für organische Hydroperoxide wie z.B. Linolsäurehydroxide, sowie das Verteilungsmuster im GIT der Ratte und zusätzlich in der Leber beim Menschen unterstützen diese Hypothese genauso, wie die Ergebnisse zahlreicher weiterer Untersuchungen.

Beispielsweise konnten Mohr et al. zeigen, dass es bei Ratten, die mit oxidierten Lipiden gefüttert wurden, zu keiner Absorption von intakten Hydroperoxiden kommt (Mohr, 1999).

Im Rahmen von Zellkulturuntersuchungen mit CaCo2-Zellen wurde nachgewiesen, dass Hydroperoxide bei intaktem Monolayer nicht zur basolateralen Seite transportiert werden (Wingler, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass auch bei Selenmangel geringe Mengen an GI-GPx in CaCo2-Zellen und auch im GIT von

Selenmangel-Ratten vorkommen, während cGPx unter diesen Bedingungen nicht mehr detektierbar war. 13-Hydroperoxy-octadecadien-Säure (13-HPODE) erreichte unabhängig vom Selenstatus die basolaterale Seite eines intakten CaCo2-Monolayers nicht. Lediglich ein geschädigter Zellverband unter Selenmangelbedingungen lässt die Substanz nach basolateral eindringen. Da unter Selenmangelbedingungen im Western-blot lediglich GI-GPx detektierbar war wurde daraus geschlossen, dass bereits geringe GI-GPx-Mengen ausreichen, um die Aufnahme von Lipid-Hydroperoxiden in die Zellen zu verhindern. Immunhistochemische Untersuchungen an Dünndarmpräparaten von selendefizienten und adäquat mit Selen substituierten Ratten zeigten, dass auch in vivo geringe Mengen an GI-GPx-Protein bei Selenmangel synthetisiert werden. (Wingler, 2000).

Neuere Untersuchungen weisen auf mögliche weitere Funktionen der GI-GPx hin. So konnte in Östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinom-Zelllinien und Tumorgewebe GI-GPx nachgewiesen werden. Möglicherweise wird es dort durch die therapeutisch eingesetzte Retinsäure induziert (Chu, 1999).

Der Nachweis von mehreren GATA-Bereichen innerhalb des GI-GPx-Promoters führte zur Annahme, dass GI-GPx in der Proliferation und im Wachstum von intestinalen Epithelzellen eine Rolle spielen könnte (Gao, 1998; Kelner, 2000).

Schliesslich zeigten Chu et al. in ihren Untersuchungen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Menge an GI-GPx-mRNA in der Zelle und der Induktion von Kolonkarzinomen durch Dimethylhydrazin (DMH) gibt (Chu, 1997). Das GI-GPx-Gen der Maus wurde auf Chromosom 12, in der Nähe des Kolonkarzinomsuszeptibilitätsgens Ccs gefunden (Chu, 1996; Jacoby, 1994). Bei weiteren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass C57BL/6HA-Mäuse, die bei DMH-Exposition kein Kolonkarzinom entwickeln, grössere Mengen an GI-GPx-mRNA exprimieren als ICR/HA-Mäuse, die bezüglich der Kolonkarzinomentwicklung DMH-sensibel sind.

Kürzlich wurden von der Arbeitsgruppe um Florian et al. immunhistochemische Untersuchungen an Tumor- und Normalschleimhaut von Kolonkarzinompatienten durchgeführt.

Dabei zeigte sich im gesunden Ileumgewebe eine hohe GI-GPx-Expression im Zytoplasma der Paneth-Zellen. Im Epithel der Villi konnte kaum GI-GPx nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung von gesunder kolorektaler Schleimhaut wurde eine graduelle Abnahme der GI-GPx-Expression von den Krypten nach apikal festgestellt. Im Kryptengrund liegt das Protein diffus im Zytoplasma vor, wohingegen es sich im apikalen Darmepithel auf der luminalen Seite des Zellkerns innerhalb von Vesikeln konzentriert.

Im Kolonkarzinomgewebe zeigte sich, dass die GI-GPx-Expression abhängig ist vom Differenzierungsgrad des Tumors: während die GI-GPx-Expression in frühen Transformationsstadien sehr hoch ist und das Protein sich v.a. am apikalen Pol des Zellkerns anreichert, ist die Expression in fortgeschrittenen Tumorstadien herabgesetzt und das Protein diffus im Zytoplasma verteilt (Florian, 2001).

Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass die GI-GPx neben ihrer Funktion als stärkstes antioxidativ-wirkendes System im GIT (Reddy, 1974; Brigelius-Flohé, 1999) möglicherweise auch eine Rolle beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung spielt (Florian, 2001).

1.5.7 Selenmangel und Tumorpathogenese

In zahlreichen epidemiologischen Studien, tierexperimentellen Untersuchungen und Interventionsstudien konnten Hinweise für den Zusammenhang zwischen dem Selenangebot und dem Auftreten gastrointestinaler Tumore gefunden werden.

Tierexperimentelle Studien zeigten beispielsweise, dass bei Ratten, die mit dem kolonspezifischen Karzinogen Methylazoxymethanol gefüttert wurden und zusätzlich unter Selenmangelbedingungen lebten, der Karyorhexisindex höher war als bei Ratten, die mit Selen supplementiert wurden (Nelson, 1996).

Auch die von Jao et al. (1996) durchgeführten Experimente ergaben ein ähnliches Ergebnis: diese Arbeitsgruppe stellte fest, dass Ratten, denen das ebenfalls

kolonspezifische Karzinogen Dimethylhydrazin zugeführt wurde, unter Selensupplementation signifikant weniger Kolonkarzinome entwickelten als unter Selenmangel.

Der protektive Effekt einer Selensubstitution konnte auch in weiteren tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden (El-Bayoumy, 1995; Reddy, 1994; Reddy, 1997). Desweiteren konnte bei Ratten in einer Studie unter Selenmangelbedingungen eine gesteigerte Hydrogenperoxidkonzentration im Gallesekret bei verminderter GPx-Enzymaktivität festgestellt werden (Ueda, 2000).

In epidemiologischen Studien zur Krebsmortalität in unterschiedlichen Ländern in Zusammenhang mit der durchschnittlichen alimentären Selenzufuhr, konnte eine inverse Korrelation zur Prävalenz des kolorektalen Karzinoms gezeigt werden (Schrauzer, 1977).

Auch andere Arbeitsgruppen wiesen in Regionen mit hoher Selenversorgung eine niedrigere Kolonkarzinominzidenz nach, als in Regionen mit geringer Selenversorgung (Janson, 1985).

Bei z.T. kontrovers diskutierter Datenlage gelang es im Rahmen weiterer epidemiologischer Studien einen ähnlichen Nachweis mit negativer Korrelation zwischen dem Selenstatus und dem Auftreten von Kolonkarzinomen zu erbringen (Yu, 1985; Gupta, 1994). Russo et al. zeigten 1997, dass es eine Assoziation zwischen dem Auftreten von kolorektalen Adenomen, besonders mit multiplem Wachstum, und einem geringen Selenangebot gibt.

Im Rahmen einer prospektiven, Placebokontrollierten, doppelblinden klinischen Interventionsstudie untersuchten Clark et al. 1996 die Wirkung von Selen auf die Entwicklung von Hautkrebs. Dazu wurden 1.312 Probanden über 4,5 Jahre mit täglich 200µg Selen vs. Placebo substituiert (Beobachtungszeitraum: 6,4 Jahre). Es zeigte sich, dass Selen zwar gegen Hautkrebs keinen protektiven Effekt hatte, jedoch konnte für andere maligne Tumore, insbesondere Prostata-, Bronchial- und kolorektales Karzinom, eine Reduktion der Gesamtinzidenz und –mortalität beobachtet werden. Die Gesamtkrebsmortalität sank um ca. 50%, die Inzidenz um ca. 37%. Da diese Tumorentitäten allerdings im Verlauf der Studie erst später als

„sekundäre Endpunkte“ definiert worden waren, sind zur genaueren Evaluierung weitere Untersuchungen notwendig.

1.5.8 Selenoproteine und Kolonkarzinogenese

Wie Selen der Entstehung von kolorektalen Karzinomen entgegenwirkt ist noch nicht geklärt. Fest steht, dass es in Form von Selenocystein ein essentieller Bestandteil im aktiven Zentrum antioxidativ wirkender Selenoproteine ist. Mörk et al. (1998) konnten die selenocysteinhaltigen Proteine GI-GPx, pGPx, SeP und TRxR in der Mukosa des Gastrointestinaltrakts nachweisen.

Diese Enzyme wurden in einer späteren Studie an Hand von Biopsiematerial von kolorektalen Adenomen im Hinblick auf ihre Expression auf mRNA-, Protein- und Funktionsebene untersucht (Mörk, 2000). Es zeigte sich zum einen, dass die mRNA-Expression und Enzymaktivität der GI-GPx in allen analysierten Adenomen im Vergleich zum Normalgewebe um 50-400% gesteigert war. Dagegen fand sich bei SeP eine Verminderung der mRNA-Expression und der Enzymaktivität um 70-90%. Im Gegensatz zu GI-GPx und SeP konnten in kolorektalen Adenomen keinerlei Veränderungen der pGPx- und TRxR-Expression nachgewiesen werden.

1.6 Fragestellung

Die Ursache für die Hochregulation der GI-GPx-Expression und Enzymaktivität in kolorektalen Adenomen (Mörk, 2000) ist bisher nicht geklärt. Das Gen für GI-GPx liegt auf Chromosom 14q24.1 (Chu, 1996;1997), ist damit dem Kolonkarzinom-Suszeptibilitätsgenlocus CCs1 (Jacoby, 1994) unmittelbar benachbart und befindet sich ausserdem in der Nähe von Fos und TGF β 3. Ausserdem zeigen zahlreiche tierexperimentelle Studien, Zellkulturanalysen und immunhistochemische Untersuchungen, dass die GI-GPx möglicherweise bei der Zellproliferation und -differenzierung eine entscheidende Rolle spielt (vgl. 1.5.6.4). Mutationen im GI-GPx-Gen könnten zu einer Veränderung der Expressionrate der GI-GPx führen bzw. auch ein verändertes Expressionsmuster des Proteins in Kolonkarzinomgeweben bewirken.

Um diese Frage zu beantworten wurde in der vorliegenden Arbeit der codierende Abschnitt der GI-GPx in DNA-Proben aus mikrodisseziertem Kolonkarzinomgewebe, peripheren Blutleukozyten von Patienten mit kolorektalem Karzinom und von gesunden Probanden, sowie Kolonkarzinomzelllinien vom Tumorsuppressor- und Mutator-Phänotyp auf genetische Alterationen hin untersucht.

Zusätzlich wurde durch Northern-blot Analysen an Kolonkarzinomgewebe und korrespondierender Normalschleimhaut, sowie an Kolonkarzinomzelllinien die mRNA-Expression der GI-GPx im Rahmen der kolorektalen Karzinogenese untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchtes Material

2.1.1 Kolonkarzinomgewebe mit korrespondierender Normalmukosa

Für die Durchführung der molekulargenetischen Untersuchungen wurden Biopsate bzw. Operationsresektate von Patienten mit kolorektalem Karzinom verwendet. Das sowohl als Paraffin-, wie auch als Kryogewebe gelagerte Material wurde uns vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden 61 Paraffin- sowie 13 Kryogewebebeurproben untersucht.

2.1.2 Blutproben

Von den insgesamt 372 untersuchten Blutproben stammten 187 von gesunden Probanden und 185 von Kolonkarzinompatienten. Dabei wurde ein Teil der Proben von freiwilligen gesunden Probanden an der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg gesammelt (121). Diese wurden zusammen mit weiteren Proben gesunder Probanden (66) und Kolonkarzinompatienten (185) vom Medizinischen Institut für Umwelthygiene der Universität Düsseldorf bearbeitet.

2.1.3 Zelllinien

Zusätzlich wurden 5 humane Kolonkarzinom-Zelllinien (kolorektale Adenokarzinome) des Tumorsuppressor-Pathways und des Mutator-Pathways untersucht (vgl. 1.3.3.1; 1.3.3.2). Die Zelllinien wurden von American Type Culture Collection (ATCC) kommerziell erworben. Folgende Zusammenstellung gibt die verwendeten Zelllinien mit den in Klammern angegebenen ATCC-Bezeichnungen wieder:

<i>Tumorsuppressor-Pathway</i>	<i>Mutator-Pathway</i>
Colo 205 (CCL-222)	HCT 15 (CCL-225)
Caco 2 (HTB-37)	HCT 116 (CCL-247)
LoVo (CCL-229)	

Tabelle 4: Untersuchte Kolonkarzinom-Zelllinien. Dabei weisen die Zelllinien Colo 205 und CaCo2 chromosomale Instabilität und die Zelllinien HCT15 und HCT 116 Mikrosatelliteninstabilität auf (vgl. 1.3.3.1 und 1.3.3.2). Die Zelllinie LoVo hat Eigenschaften beider Pathways. In Klammern ist jeweils die ATCC-Bezeichnung angegeben.

CoLo 205 (CCL-222)

Diese Zelllinie wurde aus dem Aszites eines 70jährigen Mannes mit metastasiertem kolorektalem Adenokarzinom isoliert. Die Zellen wachsen locker-adhären und in Suspension und sind hypertriploid.

CaCo-2 (HTB-37)

Diese Zellen wurden aus dem kolorektalen Adenokarzinom eines 72jährigen Mannes isoliert und wachsen adhären. Die vorwiegend enterozytisch-differenzierten Zellen sind hypertetraploid und enthalten durchschnittlich 96 Chromosomen.

HCT 15 (CCL-225)

Hierbei handelt es sich um diploide Zellen eines kolorektalen Adenokarzinoms. Sie wachsen adhären und weisen Mutationen in beiden Allelen des hMSH6-Gens, sowie dem Polymerase δ -Gen (3'-5' proof reading exonuclease domain: Lettieri, 1999) auf.

HCT 116 (CCL-247)

Diese Zelllinie stammt ebenfalls aus einem kolorektalen Adenokarzinom und wächst adhären. Die diploiden Zellen weisen sowohl einen hMLH1-Defekt, als auch eine Mutation im Codon 13 des ras-Protoonkogens auf.

LoVo (CCL-229)

Es handelt sich um Zellen aus der supraklavikulären Metastase eines kolorektalen Adenokarzinoms bei einem 56jährigen Mann. Die hyperdiploiden

Zellen zeigen adhärentes Wachstum. Als Besonderheit liegt sowohl chromosomale Instabilität, als auch Mikrosatelliteninstabilität durch einen hMSH2-Defekt auf.

2.1.3.1 Zellkultur

Die unter 2.1.3 charakterisierten Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in wasserdampfgesättigter 5%-CO₂-Atmosphäre und 37°C auf der laminar Air-flow-Arbeitsbank bearbeitet. Die 25cm² Kulturflaschen wurden mit je 5ml DMEM (Dulbeco`s Modified Eagle Medium: Natriumbikarbonat 1500mg/l; Glukose 4500mg/l; L-Glutamin 4mM) mit Antibiotikazusatz (Penicillin/Streptomycin) gefüllt und die Zellen alle 4 Tage im Verhältnis von 1:4 bzw. 1:6 wie folgt gesplittet: nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen um anschliessend zur Lösung der adhärenen Zellen vom Flaschenboden mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert zu werden. Die Zellen wurden danach in 50ml-Falkon-Röhrchen transferiert und zentrifugiert (<1000rpm x 6-7 Min.). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in neuem Kulturmedium resuspendiert.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion und Aufreinigung aus Paraffingewebe

2.2.1.1 Gewebegewinnung durch Mikrodissektion

Von den Paraffin- und Kryogewebeblöcken wurden zunächst je 10-15 Schnitte mit einer Dicke von 8-10µm angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Ein Schnitt jedes Tumorblokes wurde nach HE-Färbung histologisch in Zusammenarbeit mit einem Pathologen der Universität Würzburg begutachtet und die Tumorausdehnung mit Farbstiftmarkierung festgelegt.

Durch Vergleich der übrigen ungefärbten Objektträger mit dem jeweils begutachteten HE-Schnitt wurden anschliessend mit sterilen Klingen und unter Einhaltung eines entsprechenden Sicherheitsabstandes, Tumor- und Normalgewebe manuell disseziert und in getrennte Reaktionsgefässe überführt.

Dieses Vorgehen war durch die Grösse der tumortragenden Gewebeareale möglich, die durchschnittlich eine Ausdehnung von $\geq 1\text{cm}^2$ aufwiesen. Eine Gewebegewinnung mittels Lasermikrodissektion, wie ursprünglich geplant, war deshalb nach Absprache mit den beteiligten Pathologen nicht erforderlich.

2.2.1.2 DNA-Extraktion aus Paraffingewebe

Das gewonnene Gewebe wurde nach folgendem Protokoll verarbeitet:

- Die Gewebeasservate wurden in 1000 μl Xylol aufgenommen, ca. 5 Min. gevortext und bei 10 000 rpm für 5 Min. zentrifugiert.
- Der Überstand wurde abpipettiert und durch Wiederholung der Xylolwaschung das Gewebe entparaffinisiert.
- Anschliessend wurde das Zelldebris in 1000 μl Ethanol (96%) aufgenommen, gevortext und 5 Min. bei 10 000 rpm zentrifugiert.
- Danach wurde das Gewebe bei 55°C im Heizblock getrocknet.
- Es wurden dann 300 μl Higuchi-Verdaupuffer (Higuchi, 1989) (vgl. 2.3.2) und 45 μl Proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben und gevortext.
- Der Verdau erfolgte bei 56°C über Nacht im Heizblock.
- Die Proben wurden im Anschluss für 7 Min. auf 95°C erhitzt (Denaturierung der Proteinase K), das Gewebedebris abzentrifugiert (4000 rpm x 2 Min.) und der Überstand durch eine Phenol-Chloroform-Fällung aufgereinigt (vgl. 2.2.1.3).

2.2.1.3 Phenol-Chloroform-Fällung

Die extrahierte DNA wurde nach Entparaffinisierung und Verdau (vgl. 2.2.1.2) mittels Phenol-Chloroform-Fällung gereinigt und anschliessend mit Natrium-Acetat gefällt. Dazu wurden jeweils 100 μl DNA aus dem Verdauvolumen folgendermassen aufgearbeitet:

- Vom ursprünglichen Verdauvolumen (300 μl) wurden jeweils 100 μl DNA entnommen und mit je 100 μl TE-Puffer auf 200 μl aufgefüllt.

- Dann wurden 200µl Phenol-Chloroform dazu pipettiert, gevortext und zentrifugiert (12 000 rpm x 1 Min.).
- Die Oberphase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 200µl Chloroform versetzt, gevortext und zentrifugiert (12 000 rpm x 1 Min.).
- Erneut wurde die Oberphase entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben.

2.2.1.4 Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung

Im Anschluss an die unter 2.2.1.3 beschriebene Phenol-Chloroform-Fällung wurde die DNA wie folgt weiter behandelt:

- Es wurden 10µl Natrium-Acetat (3mM) und 250µl Ethanol (100%) zugegeben, gevortext und die DNA-Proben für ca. 30 Min. bei Raumtemperatur belassen.
- Danach wurden die Proben zentrifugiert (12 000 rpm x 15 Min.).
- Der Überstand wurde verworfen und erneut 250µl Ethanol (70%) zum Pellet pipettiert.
- Nach kurzem Schwenken wurden die Proben zentrifugiert (12 000 rpm x 10 Min.)
- Der Überstand wurde abgenommen und die Reaktionsgefäße mit offenem Deckel bei Raumtemperatur zur Trocknung aufgestellt (ca. 40 Min.).
- Anschliessend wurde das DNA-Pellet in 60µl Ampuva aufgenommen, gevortext und kurz abzentrifugiert.
- Die DNA-Ausbeute wurde photometrisch bestimmt (vgl. 2.2.6).

2.2.2 DNA-Extraktion aus Blut

Die DNA-Extraktion aus Blut erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit. Dabei handelt es sich um einen Proteinase K-Verdau mit anschliessender Säulenaufreinigung. QIAGEN Protease, Puffer AL, QIAamp Säulen, 2ml-Sammelröhrchen, Puffer AW1, Puffer AW2 sowie Puffer AE sind Bestandteile des Kits:

- 20µl QIAGEN Protease wurden mit 200µl EDTA-Blut und 200µl Puffer AL zusammenpipettiert, gevortext, abzentrifugiert und bei 56°C für 10 Min. inkubiert.

- Danach wurden die Proben erneut abzentrifugiert und 200µl Ethanol (100%) hinzugefügt.
- Nach dem Abzentrifugieren erfolgte der Transfer der Lösungen auf QIAamp-Säulen in Sammelröhrchen.
- Die Trennsäulen wurden zentrifugiert (8000 rpm x 2 Min.).
- Das Eluat wurde verworfen und die Säulen mit neuen Auffangcaps kombiniert.
- Nach Zusatz von 500µl Puffer AW1 wurden die Trennsäulen erneut zentrifugiert (8000 rpm x 2 Min.).
- Das Eluat wurde wieder verworfen und 500µl Puffer AW2 zugesetzt.
- Die Trennsäulen wurden anschliessend wieder zentrifugiert (14 000 rpm x 4 Min.) und das Eluat verworfen.
- Die QIAamp-Säulen wurden dann in neue Caps gegeben und 200µl Puffer AE aufpipettiert.
- Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Min. wonach die DNA durch Zentrifugieren (8000 rpm x 1 Min.) eluiert werden konnte.

2.2.3 DNA-Extraktion aus Zelllinien

Die DNA-Extraktion aus Zelllinien erfolgte mit Hilfe des TRIzol Reagenz nach der Methode von Chomczynski (Chomczynski, 1993). Das Extraktionsprotokoll lautet wie folgt:

Homogenisation

Nach Trypsinisierung wurden die Zellen mit 1ml TRIzol Reagenz versetzt.

Phasentrennung

Die Proben wurden für 5 Min. bei 15-30°C inkubiert und mit 200µl versetzt. Anschliessend wurde die Inkubation wiederholt (15-30°C; 2 Min.) und die Proben zentrifugiert (12 000 g x 15 Min. bei 4-8°C):

- Oberphase: RNA (vgl. 2.2.5 für Weiterverarbeitung)
- Unterphase: DNA

Präzipitation

Zur Unterphase wurden 300µl Ethanol (100%) zugegeben und nach 3 minütiger Inkubation bei 15-30°C gevortext. Nach anschliessender Inkubation (2-3 Min., 15-30°C) erfolgte die Zentrifugation (2000 g x 5 Min. bei 4-8°C).

Waschung

Nach Abnahme des Überstandes wurde 1ml Natrium-Citrat-Lösung in Ethanol (10%) zugegeben und 5 Min. bei 15-30°C inkubiert. Danach wurden die Proben pelletiert (2000 g x 5 Min. bei 4-8°C).

- Der Waschvorgang wurde 2x wiederholt.

Anschliessend wurde die DNA in 2ml Ethanol (75%) inkubiert (15-30°C; 15 Min.) und zentrifugiert (2000 g x 5 Min. bei 4-8°C).

Auflösung

Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pallet luftgetrocknet (5-15 Min.) und dann in NaOH (8mM) aufgelöst.

Abschliessend wurden die Proben für 10 Min. mit 12 000 g zentrifugiert und die Oberphase gewonnen.

2.2.4 DNA-Extraktion aus Kryogewebe

Hierzu wurde der High Pure PCR Template Preparation Kit verwendet. Dabei wird das Gewebe zunächst mit Proteinase K lysiert und anschliessend über Glasfibersäulen filtriert. Die DNA, die an das Glasfiber bindet wird anschliessend mit einer Pufferlösung eluiert und gereinigt. Das Bearbeitungsprotokoll ist nachfolgend aufgeführt, wobei Proteinase K, Trennsäulen, Lyse-, Bindungs-, Inhibitions-, Wasch- und Elutionspuffer Bestandteile des Kit sind:

- Zu 50mg Kryogewebe wurden 40µl Proteinase K und 200µl Lysepuffer zugegeben, gevortext und 1 Stunde bei 55°C inkubiert.
- Danach wurden weitere 200µl Bindungspuffer hinzugefügt und 10 Min. bei 72°C inkubiert.
- Zusätzlich wurden 100µl Isopropanol aufpipettiert und gevortext.
- Die Lösung wurde dann in Filtersäulen mit Auffanggefässen gegeben und zentrifugiert (8000 rpm x 1 Min.).
- Die Flüssigkeit im Auffanggefäss wurde verworfen.
- Dann wurden 500µl Inhibitionsbuffer auf eine neue Trennsäule pipettiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt.
- Die Flüssigkeit im Auffanggefäss wurde verworfen.

- Anschliessend wurden 500µl Waschpuffer auf eine neue Trennsäule pipettiert und zentrifugiert (8000 rpm x 1 Min.).
- Die Flüssigkeit im Auffanggefäss wurde verworfen.
- Der letzte Waschvorgang wurde wiederholt, die Trennsäule nach Dekantierung der Flüssigkeit mit demselben Auffanggefäss kombiniert und erneut zentrifugiert (14 000 rpm x 10 Sek.).
- Die Trennsäulen wurden danach auf neue Reaktionsgefässe gegeben.
- Schliesslich wurden 200µl des auf 70°C vorgewärmten Elutionspuffers hinzugegeben und die DNA durch Zentrifugieren (8000 rpm x 1 Min.) gewonnen.

2.2.5 RNA-Extraktion aus Zelllinien und Kryogewebe

Die RNA-Extraktion aus den verwendeten Zelllinien und dem Kryogewebe erfolgte unter Verwendung des TRIzol-Reagenz in Anlehnung an die Methode von Chomczynski (Chomczynski, 1993).

Homogenisation

Zelllinien: vgl. 2.2.3

Kryogewebe: 1ml TRIzol-Reagenz wurden zu 50-100mg Gewebe zugegeben.

Phasentrennung

vgl. 2.2.3

Präzipitation

Die Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäss überführt und 500µl Isopropanol zugegeben.

Die Proben wurden dann 10 Min. bei 15-30°C inkubiert und anschliessend zentrifugiert (12 000 g x 10 Min; 4-8°C).

Waschung

Der Überstand wurde verworfen und 1ml Ethanol (75%) zugegeben. Anschliessend wurden die Proben gevortext und zentrifugiert (7500 g x 5 Min; 4-8°C).

Auflösung

Der Überstand wurde verworfen und RNA Luftgetrocknet (5-10 Min.) und das Pellet in 20µl Ampuva resuspendiert.

2.2.6 Messung der DNA und RNA-Ausbeute

Die Bestimmung der DNA bzw. RNA-Ausbeute erfolgte mittels photometrischer Messung. Dazu wurde die zu messende Probe mit Ampuva auf ein Volumen von 50µl aufgefüllt und anschliessend die optische Dichte der Lösung bei 260nm und 280nm bestimmt. Die Ratio 260/280 für jede Probe wurde automatisch ermittelt.

2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der untersuchten Genabschnitte der Gl-GPx erfolgte mit der Polymerasekettenreaktion (Saiki, 1988). Diese ist eine Methode zur in vitro Vervielfältigung von Genabschnitten und verläuft in drei Schritten:

Zunächst wird die zu amplifizierende DNA durch Hitzezufuhr (94°C) denaturiert, d.h. in Einzelstränge überführt. Den Startpunkt der Neusynthese bilden maschinell hergestellte Oligonukleotide (Primer), die die zu amplifizierende Region flankieren. Durch primerspezifische Senkung der Temperatur auf Werte zwischen 40 und 60°C wird ihnen die Anlagerung, das sog. Annealing an die Ursprungs-DNA ermöglicht.

Der als Extension bezeichnete dritte Schritt der Amplifikation erfolgt dann bei 72°C, dem Temperaturoptimum der hitzestabilen Taq-Polymerase. Sie nutzt die entstandenen DNA-Matrizes zur Synthese eines komplementären Stranges. Durch Anlagerung der hinzugefügten dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) kommt es zur exponentiellen Vermehrung der zu amplifizierenden Genregion.

Die drei Phasen der PCR (Denaturierung, Annealing, Extension) werden zyklisch durchlaufen, wobei die Zyklusanzahl primerspezifisch ermittelt wird, um optimale Amplifizierungsausbeute zu erlangen. Sie liegt in der Regel zwischen 30 und 40 Zyklen.

2.2.7.1 PCR-Ansatz

Die PCR's wurden mit dem Taq-DNA-Polymerase Kit durchgeführt, der 10XPCR-Puffer, MgCl₂ und dNTP enthält. Der PCR-Mix wurde nach folgendem Ansatz pipettiert.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
10XPCR-Puffer (mit 15mM MgCl ₂)	5µl
MgCl ₂ (25mM)	1µl
dNTP (2,5mM)	2µl
Sense- bzw. Antisense-Primer (je 5pmol/µl)	je 1µl
Ampuva	29µl
Summe	39µl

Tabelle 5: Pipettierschema für den PCR-Mix.

Zu diesen 39µl PCR-Mix wurden 100-150ng genomische DNA (0,5-10µl), sowie je 1-5IE Taq-Polymerase pipettiert und der Ansatz mit Wasser auf 50µl aufgefüllt.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
PCR-Mix	39µl
DNA-Template	0,5 - 10µl
Taq-Polymerase	1-5IE
Ampuva	0 - 9,5µl
Summe	50µl

Tabelle 6: Pipettierschema für die einzelnen PCR-Proben.

Zur Durchführung der PCR wurden Thermocycler mit beheiztem Deckel benutzt, (GeneAmp® PCR-System 2400) für die die in Tabelle 7 gezeigten Bedingungen galten.

	Bedingungen
Denaturierung	94°C, 5 Min.
Denaturierung	94°C, 45 Sek.
Annealing	X°C*, 45 Sek.
Extension	72°C, 45 Sek.
Abschlussexension	72°C, 10 Min.
Zyklusanzahl	40

Tabelle 7: Thermocyclerbedingungen für die durchgeführten PCRs.

* primerspezifisch ermittelte Annealing-Temperatur

2.2.7.2 Primer

2.2.7.2.1 Allgemeines

Die benutzten Primer wurden nach Chu et. al. (Chu, 1996) ausgewählt und die primerspezifischen Annealing-Temperaturen mit Blut-DNA etabliert. Die Sense-Primer wurden jeweils am 5'-Ende mit der nicht-annealenden **M13-Basensequenz 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT- 3'**, die Antisense-Primer mit der ebenfalls nicht-annealenden **M13R-Basensequenz 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC- 3'** verlängert. Dadurch konnten später die PCR-Produkte eines jeden amplifizierten Genabschnitts mit universellen M13- bzw. M13R-Primern sequenziert werden (vgl. 2.2.8).

Bei der Anwendung der mit Blut-DNA etablierten Bedingungen auf DNA aus Paraffingewebe mussten allerdings aufgrund einer DNA-Degeneration jeweils zahlreiche Modifikationen durchgeführt werden, um ausreichende Amplifikatmengen zu erhalten. Diese Modifikationen bezogen sich dabei auf die Durchführung von nested PCRs, Anwendung verschiedener DNA-Aufreinigungsverfahren (Fällung, Säulenaufreinigung: QIAquick™ PCR Purification Kit), Änderung der Annealing-Temperatur und Zyklusanzahl, sowie Veränderung der eingesetzten DNA/MgCl₂/Primer-Menge, sowie Taq-Menge und -Sorte (TaKaRa Ex Taq™; Herkulase™ Enhanced DNA-Polymerase; Ampli Taq Gold) (vgl. 2.3.1).

2.2.7.2.2 GI-GPx-Primer - ungeteilte Exons

Zunächst wurden die Exon-PCRs für die beiden, kompletten Exons des GI-GPx-Gens etabliert (vgl. 2.2.7.2.3). Die jeweiligen Primersequenzen mit den zugehörigen Primerpositionen, den spezifisch ermittelten Annealing-Temperaturen, den Produktlängen und den Primerbezeichnungen sind im folgenden tabellarisch aufgeführt. Die M13-Anhangsequenz ist dabei nicht mit aufgeführt, befindet sich aber jeweils am 5'-Ende aller Oligonukleotide.

<i>Name</i>	<i>Sequenz (5' - 3')</i>	<i>Position*</i>	<i>Länge (bp)</i>	<i>Temp. (°C)</i>
GI-GPx1 S	CGT-M13-TCTCTGCGGGGCTCACTCT	-30 bis -12 Intron	306	60
GI-GPx1 AS	CGT-M13-ACCTGAGCTACACCAACCCAACAC	+55 bis +32 Intron		
GI-GPx2 S	CGT-M13-CTGTCCACGCACTTTGTCTTTTTC	-33 bis -10 Intron	404	60
GI-GPx2 AS	CGT-M13-TGTGTTGAGCAGTTCACATC	+19 bis +1 Intron		

Tabelle 8: Primer für jeweils komplettes GI-GPx Exon 1 und Exon 2.

*Positionsangaben beziehen sich auf Chu et al. 1996

S= Sense-Primer; AS= Antisense-Primer; Länge= Produktlänge; Temp.= Annealing-Temperatur

Da die Amplifikation der kompletten Exons trotz der unter 2.2.7.2.1 aufgeführten Modifikationen problematisch blieb, mussten die codierenden Abschnitte der beiden Exons als kleinere Fragmente in jeweils 2 überlappenden Abschnitten amplifiziert werden (vgl. Abb. 2). Dazu wurden jeweils zwei weitere Primer im Exon eingesetzt (vgl. 2.2.7.2.3).

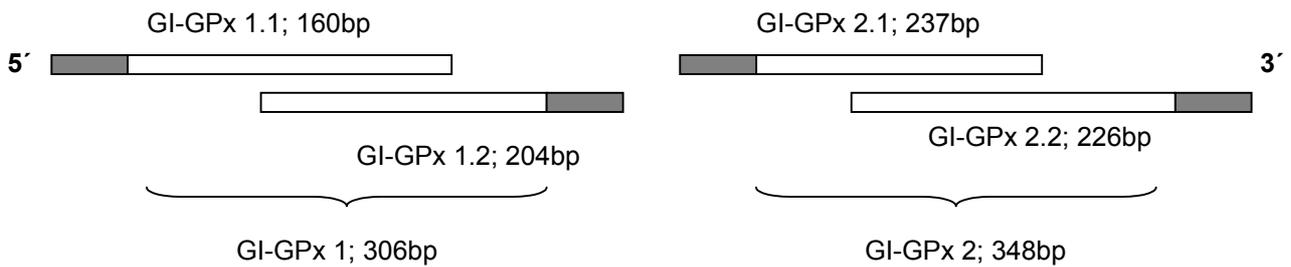


Abb. 2: Darstellung der überlappenden Amplifizierung der beiden geteilten GI-GPx Exons 1 und 2 mit Angabe der jeweiligen Produktängen.

■ = Intronabschnitt

Auf diese Weise wurde das Exon 1 des GI-GPx-Gens (GI-GPx 1; 306 bp) in 2 Exonfragmenten (GI-GPx 1.1: 160 bp und GI-GPx 1.2: 204 bp) amplifiziert. Ebenso wurde mit dem Exon 2 (GI-GPx2; 348 bp) verfahren, so dass es über die beiden Fragmente GI-GPx 2.1 (237 bp) und GI-GPx 2.2 (226 bp) amplifiziert wurde. Die sich daraus ergebenden Primerverhältnisse sind im folgenden dargestellt.

2.2.7.2.3 GI-GPx-Primer - geteilte Exons

GI-GPx Exon 1-Sequenz

GI-GPx 1S

5' ggcctctctgcggggctcactctgcgcttcaccATGGCTTTCATTGCCAAGTCCTTCTATG

GI-GPx 1.2S

ACCTCAGTGCCATCAGCCTGGATGGGGAGAAGGTAGATTTCAATACCGTTC

GI-GPx 1.1AS

CGGGGCAGGGCCGTGCTGATTGAGAATGTGGCTTCGCTCTGAGGCACAA

CCACCCGGGACTTCACCCAGCTCAACGAGCTGCAATGCCGCTTTCCCAGG

CGCCTGGTGTGGTCCTTGGCTTCCCTTGCAACCAATTTGGACATCAGgtgag

GI-GPx 1AS

gggtccctcctgtaatgacacaaaaggttgggttgggtg agctcaggtgggataaaaag 3'

Name	Sequenz (5' - 3')	Position*	Länge (bp)	Temp (°C)
GI-GPx1 S	CGT-M13-TCTCTGCGGGGCTCACTCT	-30 bis -12 Intron	160	60
GI-GPx1.1 AS	CGT-M13- GTGGTTGTGCCTCAGAGCGAA	+74 bis+94 Exon		
GI-GPx1.2 S	CGT-M13- CGTTCGGGGCAGGGCCGTGC	+111 bis +131 Exon	204	60
GI-GPx1 AS	CGT-M13- ACCTGAGCTACACCAACCCAACAC	+55 bis +32 Intron		

Tabelle 9: Primer zur Amplifizierung des geteilten GI-GPx Exon 1.

*Positionsangaben beziehen sich auf Chu et al. 1996

S= Sense-Primer; AS= Antisense-Primer; Länge= Produktlänge; Temp.= Annealingtemperatur

GI-GPx Exon 2-Sequenz

GI-GPx 2S

5' ccaccctgctccacgcactttgtcttttctcccctagGAGAAGTGTGAGAATGAGGAGATC

CTGAACAGTCTCAAGTATGTCCGTCCTGGGGGTGGATAACCAGCCCACCTT

CACCCTTGTCCAAAAATGTGAGGTGAATGGGCAGAACGAGCATCCTGTCT

GI-GPx 2.2S

TCGCCTACCTGAAGGACAAGCTCCCCCTACCCTTATGATGACCCATTTTCCC

GI-GPx 2.1AS

TCATGACCCGATCCCAAGCTCATCATTGGAGCCCTGTGCGCCGCTCAGA

TGTGGCCTGGAACCTTTGAGAAGTTCCTCATAGGGCCGGAGGGAGAGCCCT

TCCGACGCTACAGCCGCACCTTCCCAACCATCAACATTGAGCCTGACATC

GI-GPx 2AS

AAGCGCCTCCTTAAAGTTGCCATATAGatgtgaactgctcaacacacagatctcctactccat

ccagtcctgaggagccttaggatgcagcatgccttcaggagacactgctggac 3'

<i>Name</i>	<i>Sequenz (5' - 3')</i>	<i>Position*</i>	<i>Länge (bp)</i>	<i>Temp (°C)</i>
GI-GPx2 S	CGT-M13-CTGTCCACGCACTTTGTCTTTTTTC	-33 bis -10 Intron	237	60
GI-GPx2.1 AS	CGT-M13-CCAAATGATGAGCTTGGGATC	+146 bis +166 Exon		
GI-GPx2.2 S	CGT-M13- TCCCCTACCCTTATGATGACC	+185 bis +205 Exon	226	60
GI-GPx2 AS	CGT-M13- TGTGTTGAGCAGTTCACATC	+19 bis +1 Intron		

Tabelle 10: Primer zur Amplifizierung des geteilten GI-GPx Exon 2.

*Positionsangaben beziehen sich auf Chu et al. 1996

S= Sense-Primer; AS= Antisense-Primer; Länge= Produktlänge; Temp.= Annealing-Temperatur

2.2.7.3 Gelelektrophorese

Das Ergebnis der PCR-Amplifikation wurde mittels Gelelektrophorese in 1%`igem Agarosegel kontrolliert. Das Gel wurde aus 50ml TBE-Puffer (0,5%) und 0,5g Agarose hergestellt und durch Zusatz von 1µl Ethidiumbromid (0,5µg/ml) gefärbt. Es wurden jeweils 5µl PCR-Produkt mit 1,5µl loading-buffer versetzt und das Gel beladen. Dabei erleichtert der loading-buffer sowohl durch seine Eigenfarbe, als auch durch Erhöhung des spezifischen Gewichts der DNA das Einfüllen in die Geltaschen, während das Ethidiumbromid durch Interkalation mit der DNA diese unter UV-Licht detektierbar macht. Die Gelelektrophorese wurde mit TBE als Laufpuffer bei Raumtemperatur und 105 Volt für 25 Minuten durchgeführt, wobei ein 100bp-DNA-Basenleiter zur Bestimmung des Molekulargewichts eingesetzt wurde. Anschliessend konnten die DNA-Banden unter UV-Lichtbestrahlung visualisiert und das Gel zur Dokumentation photographiert werden.

2.2.8 Sequenzierung

2.2.8.1 Allgemeines

Das Prinzip der automatischen Sequenzierung, die sich von der Methode nach Sanger et al. ableitet (Sanger, 1977) beruht darauf, die zu sequenzierende DNA nach PCR-Amplifikation und Aufreinigung einer Sequenz-PCR zuzuführen. Bei dieser PCR treten während der zyklischen Amplifikation markierter DNA-Abschnitte durch den Einbau von 2',3'-Didesoxinukleotiden kontrollierte Kettenabbrüche ein. Dazu werden dem Reaktionsgemisch neben der DNA-Matrix, einer hitzestabilen Polymerase, Sequenzierprimern und dNTPs zusätzlich ddNTPs aller vier Basen zugeführt, die auch an ihrem 3'-C-Atom anstelle einer OH-Gruppe, ein H-Atom tragen und somit keine weitere Bindung eingehen können. Wird nun im Rahmen der Sequenz-PCR und der dabei stattfindenden Konkurrenz der dNTPs und ddNTPs letzteres in die neusynthetisierte Komplementär-DNA eingebaut, erfolgt ein Kettenabbruch mit dem jeweiligen ddGTP, ddCTP, ddATP oder ddTTP. Die so entstandenen Fragmente werden automatisch mit Hilfe eines Polyacrylamidgels der Grösse

nach aufgetrennt und die eingebauten fluoreszenzmarkierten Endnukleotide mit Hilfe eines Laserstrahls computergesteuert erkannt.

2.2.8.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Vom 50µl-Ansatz der PCR wurden je 20µl mit 80µl H₂O verdünnt und mittels Natrium-Acetat-Fällung (vgl. 2.2.1.4) aufgereinigt. Das gereinigte DNA-Pellet wurde anschliessend in 20µl Ampuva resuspendiert.

2.2.8.3 Sequenz-PCR

Bei der Sequenz-PCR wird jedem Ansatz nur *ein* produktspezifischer Primer - Sense oder Antisense - zugesetzt (Sanger, 1977). Die Sequenzreaktion wurde mit dem ABI PRISM Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit durchgeführt, der folgende Komponenten enthält: A/G/T/C-Dye-Terminator, dITP, dATP, dCTP, dTTP, Tris HCl (pH9,0), MgCl₂ (2mM), hitzestabile Ampli Taq Polymerase. Die im Kit enthaltenen Didesoxynukleotide sind unterschiedlich farbstoffmarkiert, was die spätere Fluoreszenzanalyse ermöglicht.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Big Dye	6µl
Sense-Primer bzw. Antisense-Primer (je 5pmol/µl)	1µl
Ampuva	3µl
Summe	10µl

Tabelle 11: Pipettierschema für den Sequenz-PCR-Mix.

Die zu sequenzierenden Proben wurden anschliessend nach folgendem Schema vorbereitet.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Mix	10µl
Gereinigtes PCR-Produkt	5 - 10µl
Ampuva	0 - 5µl
Summe	20µl

Tabelle 12: Pipettierschema für die Sequenz-PCR-Proben.

Die Sequenz-PCR wurde in Thermocyclern unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	<i>Bedingungen</i>
Denaturierung	94°C, 5 Min.
Denaturierung	94°C, 1 Min.
Annealing	50°C, 1 Min.
Extension	60°C, 3 Min.
Abschlussextension	60°C, 10 Min.
Zyklusanzahl	40

Tabelle 13: Thermocyclerbedingungen für die Sequenz-PCR.

2.2.8.4 Aufreinigung der Sequenz-PCR-Produkte

Der 20µl-Sequenz-PCR-Ansatz wurde mittels Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung (vgl. 2.2.1.4) von den unverbrauchten PCR-Reagenzien gereinigt und das DNA-Pellet für die automatische Sequenzanalyse vorbereitet.

2.2.8.5 Automatische Sequenzanalyse

Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 16µl Template Suppression Reagent (TSR) aufgenommen, bei 94°C für ca. 3 Minuten denaturiert und sofort für weitere 5 Minuten auf Eis gestellt. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Version 1.0.2.

Dabei wurden die Proben mittels Kapillarelektrophorese bei 75kV, 75µA und 42°C auf Performed Optimized Polymere 6 (POP6) und 1x310 Genetic Analyzer Buffer als Laufpuffer analysiert. Das Gerät arbeitet auf der Basis einer automatischen Kapillarelektrophorese mit anschliessender Laserdetektion der Fluoreszenzfarbstoff-gelabelten Sequenz-PCR-Produkte und Analyse der erhaltenen Rohdaten.

2.2.8.6 Auswertung der Sequenzierergergebnisse

Die vom Sequencer durchgeführte Analyse liefert die Basenabfolge des untersuchten Genabschnitts und gibt eine graphische Darstellung in Form von Elektropherogrammen. Der Vergleich dieser Daten mit den veröffentlichten Sequenzen der jeweiligen Gene erfolgte mit dem Programm DNasis for Windows. Um vorliegende Polymorphismen und Heterozygotien nicht zu übersehen, wurden alle Sequenzen auch manuell analysiert.

2.2.9 SNaPshot-Analyse

2.2.9.1 Allgemeines und Prinzip

Die SNaPshot-Analyse ist ebenfalls eine PCR-gestützte Methode zur Detektion von Einzelbasenabweichungen (single nucleotide polymorphisms). Zunächst wird ein Abschnitt, der die zu untersuchende Lokalisation enthält mittels PCR amplifiziert. Mit einem Primer, der genau vor der interessierenden Base endet, wird eine zweite PCR-Amplifikation durchgeführt. Da im PCR-Ansatz lediglich Dideoxynukleotide eingesetzt werden, erfolgt nach dem ersten Baseneinbau ein Amplifikationsstop. Somit entstehen Produkte, die die Länge des Primers plus eine Base aufweisen. Die eingesetzten vier Dideoxynukleotide sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass die PCR-Produkte ähnlich wie bei einer Sequenzierung mit dem ABI-Prism 310 Genetic Analyzer Version 1.0.2 durch das sequenzspezifische Farbsignal analysiert werden können.

2.2.9.6 SNaPshot-Primer

GI-GPx-Exon 2-Sequenz

5'ccaccactgtccacgcactttgtcttttctcccctagGAGAACTGTCAGAATGAGGAGATC

CTGAACAGTCTCAAGTATGTCCGTCCTGGGGGTGGATAACCAGCCCACCTT

CACCCTTGTCCAAAAATGTGAGGTGAATGGGCAGAACGAGCATCCTGTCT

SS-GI-GPx-Ex.2.1S

SS-GI-GPx-Ex.2.1AS

TCGCCTTACCTGAAGGACAAGCTCCCCTACCCTTATGATGACCCATTTTCCC

TCATGACCCGATCCCAAGCTCATCATTTGGAGCCCTGTGCGCCGCTCAGA

TGTGGCCTGGAACCTTTGAGAAGTTCCTCATAGGGCCGGAGGGAGAGCCCT

TCCGACGCTACAGCCGCACCTTCCCAACCATCAACATTGAGCCTGACATC

AAGCGCCTCCTTAAAGTTGCCATATAGatgtgaactgctcaacacacagatctcctactccat

ccagtctgaggagccttaggatgcagcatgccttcaggagacactgctggac 3'

<i>Name</i>	<i>Sequenz (5' - 3')</i>	<i>Position*</i>	<i>Länge (bp)</i>	<i>Temp (°C)</i>
SS-GI-GPx- Ex. 2.1S	TACCTGAAGGACAAGCTCCCCTACC	+169 bis +194 Exon	26	50
SS-GI-GPx- Ex. 2.1AS	CATGAGGGAAAATGGGTCATCATAA	+196 bis +220 Exon		

Tabelle 14: Primer für SNaPshot-PCR.

*Positionsangaben beziehen sich auf Chu et al. 1996

S= Sense-Primer; AS= Antisense-Primer; Länge= Produktlänge; Temp.= Annealing-Temperatur

2.2.9.3 Reaktionsansatz

Zunächst erfolgte mit einem 50µl-PCR-Ansatz die Amplifizierung der DNA des gesamten Genabschnitts, in dem ein Basenaustausch vermutet wurde (vgl. 2.2.6.2). Dazu wurde der ABI PRISM SNaPshot™ ddNTP-Primer Extension Kit verwendet. 20µl des PCR-Amplifikats wurden anschliessend mittels Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung wie unter 2.2.1.4 beschrieben gereinigt und das Pellet in 20µl Wasser aufgelöst. Der Mix wurde nach dem folgenden Schema pipettiert.

Reagenz	Menge
SNaPshot-Ready Reaction Premix	4µl
Sense-Primer bzw. Antisense-Primer (je 5pmol/µl)	1µl
Ampuva	3µl
Summe	8µl

Tabelle 15: Pipettierschema für SNaPshot-Mix.

Der SNaPshot-Ready Reaction Premix enthält fluoreszierende ddNTPs, Ampli Taq Polymerase und Reaktionspuffer.

Zu den vorgelegten 8µl Mix wurden je 2µl gereinigtes DNA-Template pipettiert und die Proben im Thermocycler unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

	Bedingungen
Denaturierung	96°C, 10 Sek.
Annealing	50°C, 5 Sek.
Extension	60°C, 30 Sek.
Kühlung	4°C
Zyklusanzahl	30

Tabelle 16: Thermocyclerbedingungen für die SNaPshot-PCR.

2.2.9.4 Postextensionsverfahren

2.2.9.4.1 Aufreinigung der SNaPshot-PCR-Produkte

Im Post-Extensionsverfahren wurden die Proben dann von nicht gebundenen fluoreszenzmarkierten ddNTPs gereinigt, was nach diesem Protokoll erfolgte:

<i>Verfahren</i>	<i>Reagenz</i>	<i>Bedingungen</i>
Inkubation	0,5U Krabben alkalische Phosphatase	37°C, 1h
Enzymdenaturierung		72°C, 15 Min.
Kühlung		4°C

Tabelle 17: Schema zur Weiterverarbeitung der SNaPshot-PCR-Produkte. Die verwendete Phosphatase ist Bestandteil des ABI PRISM SNaPshot™ ddNTP-Primer Extension Kit.

2.2.9.5 SNaPshot-Analyse

Die Vorbereitung der Proben für die automatische Analyse erfolgte durch das Zusammenpipettieren von 12µl TSR und 1,5µl DNA. Nach Denaturierung durch 5 minütiges Erhitzen bei 95°C und anschließender kurzer Lagerung auf Eis wurde die Analyse mit dem ABI-Prism 310 Genetic Analyzer Version 1.0.2. durchgeführt. Das erhaltene Elektropherogramm ist unter 3.4.2 wiedergegeben.

2.2.10 Northern-blot

2.2.10.1 Allgemeines und Prinzip

Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, mit dem unter Verwendung radioaktivmarkierter Sonden spezifische RNA-Fragmente detektiert werden können.

Dazu wird zunächst die zu untersuchende RNA elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Die Fixierung (cross-linkage) erfolgt durch Bestrahlung mit UV-Licht (UV-Stratalinker). Nach Hybridisierung der RNA-Stränge mit radioaktivmarkierten Sonden kann dasjenige Fragment, das eine zur Sonde komplementäre Sequenz aufweist, autoradiographisch visualisiert werden.

2.2.10.2 Vorbereitung der cDNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der bei der Northern-blot-Hybridisierung verwendeten GI-GPx cDNA-Sonden erfolgte mit einem Readyprime random labelling Kit und deoxy- $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}$ CTP (110TBq/mmol) entsprechend den Herstellerangaben. Anschliessend wurde die freie Aktivität mit Sephadex G-50 Säulen entfernt.

2.2.10.3 Elektrophorese und blot

Die Auftrennung der wie unter 2.2.5 extrahierten RNA erfolgte mittels Gelelektrophorese in 1% igem denaturierendem Fomaldehyd-Agarosegel in einer Flachbettapparatur, mit 1-fach MOPS als Laufpuffer. Das Gel setzte sich wie folgt zusammen:

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Agarose	1,8g
Ampuva	132ml
Ethidiumbromid (500 $\mu\text{g/ml}$)	50 μl
Formaldehyd (37%)	30ml

Tabelle 18: Zusammensetzung des RNA-Trenngels für Northern-blot Analyse.

15 μg der extrahierten RNA wurden dazu mit 15 μl Probenpuffer versetzt und für 10 Min. bei 65°C im Wasserbad denaturiert. Die Zusammensetzung des Probenpuffers lautet wie folgt:

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Formamid	7 μl
Formaldehyd (37%)	2,8 μl
10-fach MOPS	2,1 μl
Ladepuffer	2 μl

Tabelle 19: Zusammensetzung des Northern-blot Probenpuffers.

Der Ansatz wurde mit Ampuva zum Endvolumen von 30µl aufgefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 20V für 16h, wonach das Gel für 30 Min. gewässert und photographiert wurde. Zur Grössenbestimmung der RNA-Fragmente diente ein RNA-Basenleiter.

Die Übertragung auf eine Nylonmembran (Hybond-N-Membran) erfolgte mittels Kapillarblot entsprechend den Herstellerangaben mit 10-fach SSC als Transferpuffer. Die RNA-Fixierung auf der Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung (UV-Strataliner 1800, Stratagene; 2 x 1200kJ). Bis zur Durchführung der Hybridisierung wurden die Blots in Frischhaltefolien bei -20°C gelagert.

2.2.10.4 Hybridisierung und Waschung

Die Hybridisierung der blots mit den radioaktivmarkierten GI-GPx-cDNA-Sonden erfolgte bei 65°C über Nacht in einer Hybridisierungslösung folgender Zusammensetzung:

<i>Reagenz</i>	<i>Konzentration</i>
5xSSC	
Formamid	50%
1X Denhardt`s Reagenz	
SDS	1%
Natriumphospat	20mM, pH 6,3
Denaturierte Lachssperma-DNA	100µg/ml
³² P-radioaktivmarkierte cDNA	0,3MBq/ml

Tabelle 20: Hybridisierungspuffer für Northern-blots.

Anschliessend wurden die blots zur Entfernung überschüssiger Radioaktivität mit SSC gewaschen, wobei der Salzgehalt des Waschpuffers schrittweise erniedrigt wurde (1-, 0,5-, 0,1-fach SSC mit je 1% SDS). Zugleich wurde die Temperatur jeweils um 2°C erhöht, bis ein Signal mit dem Handmonitor

erkennbar wurde. Die Waschung wurde bis zu einer Aktivität von ca. 20-30 counts fortgesetzt.

Zur Dokumentation wurden die blots in Kunststofffolien eingeschweisst und bei -80°C in einer Autoradiografiekassette mit Verstärkerfolie auf einen Kodak X-omat-Röntgenfilm für 1-5 Tage exponiert. Das Hybridisierungssignal wurde densitometrisch erfasst.

2.3 Materialien
2.3.1 Chemikalien

<i>Reagenz</i>	<i>Firma</i>
Pufferbestandteile, Aufreinigungen, PCR, Verdau	
Absoluter Ethanol	J.T.Baker
Agarose ultra PURE™	GIBCO BRL life technologies
Aqua ad injectabilem (Ampuva)	Pharmacia
Chloroform	Merck
dNTPs (2,5mM)	TaKaRa Biomedicals
EDTA (0,5M; pH 8,0)	Sigma
Ethidiumbromid (0,5µg/ml)	Sigma
Gelatine	Merck
Gene Scan™-500-TAMRA™ size standard	PE Applied Biosystems
Isopropanol	Roth
KCl (50mM)	Roth
Nonidet p40 (0,45%)	Sigma
Phenol-Chloroform-Isoamyl (25:24:1)	Roth
Primer	Amersham Pharma Biotech MWG Biotech AG
Proteinase K	Roche Promega
SDS	Sigma
Template Suppression Reagent (TSR)	PE Applied Biosystems
Tris-HCl (1M)	Sigma
Tween 20	Sigma
Xylol	Roth
Zellkultur	
DMEM= Vitacell Dulbecco's Modified Eagle's Medium	ATCC
PBS	GIBCO BRL life technologies
Trypsin/EDTA (0,25% Trypsin, 0,05% EDTA)	Seromed, Biochrom
Northern-blot	
{α- ³² P}dCTP (110TBq/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech
MOPS	Sigma
Sephadex G-50 Säulen	Amersham Pharmacia Biotech
Basenleiter	
100Bp-DNA-Basenleiter	GIBCO BRL life technologies
RNA-ladder (0,24-9,5kb)	GIBCO BRL life technologies
Kits	
ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit	PE Applied Biosystems
ABI PRISM SNaPshot™ ddNTP-Primer extension Kit	PE Applied Biosystems
Ampli Taq Gold	Perkin Elmer
Herkulase™ Enhanced DNA Polymerase	PE Statagene
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN
QIAquick™ PCR Purification Kit	QIAGEN
Readyprime random labelling Kit	Roche
TaKaRa Ex Taq™	TaKaRa Biomedicals
Taq-DNA-Polymerase Kit	Amersham Life Science
TRizol-Reagenz	GIBCO BRL life technologies

2.3.2 Puffer und Lösungen

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
Higuchi-Verdaupuffer 50ml-Ansatz (bei -20°C aufbewahrt)	KCl 50mM TrisHCl 10mM; pH8,3 MgCl ₂ 2,5mM Gelatine 0,1mg/ml Nonidet P40 0,45% Tween 20 0,45%
10 x loading-buffer (In 10ml Ampuva aufgenommen)	Glycerol 50% 0,5M EDTA 1mM; pH8,0 Bromphenolblau 0,25% Xylencyanid 0,25%
Natrium-Acetat	Natrium-Acetat 3M Ampuva
SSC	NaCl 3M Na-Citrat 0,3M
TAE	Tris-Acetat 0,04M EDTA 1mM; pH8,0
TBE (Mit RNase freiem Wasser auf 1000ml aufgefüllt)	Tris 1M Borsäure 0,9M EDTA 0,5M; pH 8,0
TE-Puffer	Tris-HCl 10mM EDTA 1mM; pH 8,0

2.3.3 Geräte

Gerät	Firma
ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer Collection (Version 1.0.2)	Perkin Elmer
Air-flow-Arbeitsbank (Hood)	Hereus Sepatech GmbH
BIO Photometer	Eppendorf
DNA-Geldokumentation	Kodak Digital Science™1D
Flachbettapparatur	AGS
Gelkammer LKB GPS 200/400;GNA 100; TBE-Gel	Pharmacia
Gelkammer POWER PAC 300; TAE-Gel	BIO RAD
GeneAmp® PCR-System2400	Perkin Elmer
Heizblock	Techne
HS300 Säulen	Amersham Pharmacia Biotech
Hybond-N Nylonmembranen	Amersham Pharmacia Biotech

Material und Methoden

Hybridisierungssofen	Biometra
Kodak X-omat Film	Pakard Systems
Szintillator Ultima Gold	Packard
UV-Lichttisch	Hartenstein
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Vortexer	Hartenstein
Waage	Hartenstein
Zellkultur-Brutschrank	Hereus Sepatech GmbH
Zentrifuge 28RS	Hereus Sepatech GmbH

Es wurden Plastikwaren der Firmen Eppendorf, Sarstedt, Noras, Greiner und Falcon verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Insgesamt wurden 74 Karzinome (61 Karzinome aus Paraffinmaterial, 13 aus Kryogewebe) untersucht. Klinische Angaben zu den untersuchten Karzinomen sind in Tabelle 21 aufgeführt.

<i>Pat.</i>	<i>Gewebe</i>	<i>Alter</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Lokalisation</i>	<i>Histologie</i>	<i>Grad</i>	<i>TNM</i>
P1	P	52	F	C.transversum	Adenokarzinom	G2	PT2N0
P2	P	55	F	Sigma	z.T. ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT4N3
P3	P	74	M	C.ascendens	z.T. muzinöses Adenokarzinom	G2	PT2N0
P4	P	34	M	C.transversum	Adenokarzinom	G2	PT4N0
P5	P	66	F	Sigma	z.T.muzinöses Adenokarzinom,	G2	PT4N1MX
P6	P	56	M	C.descendens	Adenokarzinom	G2	PT3N0M1
P7	P	66	M	C. ascendens	Adenokarzinom	G2	PT3N0
P8	P	60	F	Rektum	Adenokarzinom	G3	PT3N2M0
P9	P	73	M	C.ascendens	Adenokarzinom	G2	PT2N0
P10	P	45	F	C.descendens	Adenokarzinom	G2	PT3N0MX
P11	P	65	M	C.ascendens	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N1MX
P12	P	66	M	Sigma	muzinöses Adenokarzinom	muzinös	PT4N0
P13	P	61	M	Rektosigmoidaler Übergang	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT4N0
P14	P	70	M	Sigma	Adenokarzinom	G2	PT4N2
P15	P	22	M	C.ascendens	muzinös-siegelringzellhaltiges Adenokarzinom	muzinös	PT4N3
P16	P	74	M	Sigma	Adenokarzinom	G2	PT3N1
P17	P	53	M	C.ascendens	Adenokarzinom	G2	PT3N0

Ergebnisse

P18	P	41	F	Coecum	Adenokarzinom	G2	PT3N3M1
P19	P	70	M	C.descendens	z.T. muzinöses Adenokarzinom	G2	PT1N0
P20	P	46	F	Coecum	Adenokarzinom	G2	PT3bN3M0
P21	P	81	M	Coecum	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT4N1M1
P22	P	85	F	Coecum	muzinös- siegelringzellhal- tiges Adenokarzinom	G3	PT3N2MX
P23	P	75	M	Sigma	Adenokarzinom	G2	PT2N1MX
P24	P	74	M	Sigma	Adenokarzinom	G2	PT2N0MX
P25	P	84	M	Rektosigmoidaler Übergang	Adenokarzinom	G3	PT4N1MX
P26	P	53	F	Sigma	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT2N1MX
P27	P	88	F	C.ascendens	muzinöses Adenokarzinom	G3	PT3N0MX
P28	P	78	M	Sigma	Adenokarzinom	G3	PT1N0MX
P29	P	90	F	Coecum	Adenokarzinom	G2	PT1N0MX
P30	P	65	M	C.ascendens	muzinöses Adenokarzinom	G2	PT3N0MX
P31	P	77	M	Sigma	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N2MX
P32	P	58	M	C.ascendens	muzinöses Adenokarzinom	G2	PT2N0MX
P33	P	68	M	Rektum	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N1MX
P34	P	79	M	Sigma	Adenokarzinom	G2	PT1NXMX
P35	P	69	M	C.descendens	Adenokarzinom	G2	PT3N1MX
P36	P	64	M	Rektum	Adenokarzinom	G2	PT3N1MX
P37	P	77	M	C.ascendens	Adenokarzinom	G2	PT3N0MX
P38	P	51	M	Sigma	muzinöses Adenokarzinom	muzinös	PT3N0MX
P39	P	76	F	C.ascendens	tubulöses Adenokarzinom	G1	PT1N0MX

Ergebnisse

P40	P	79	F	C.ascendens	Adenokarzinom	G2	PT3N0MX
P41	P	73	M	C.ascendens	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT4N2M1
P42	P	55	F	Sigma	Adenokarzinom	G2	PT1N0MX
P43	P	69	M	Rektum	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT2N0MX
P44	P	57	M	Rektum	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT4N2MX
P45	P	90	F	Sigma	Adenokarzinom	G2	PT1N0MX
P46	P	77	F	Coecum	Adenokarzinom	G2	PT3N0MX
P47	P	60	F	Coecum	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N0MX
P48	P	89	F	C.ascendens	Adenokarzinom	G2	PT3N0M1
P49	P	58	M	Sigma	Adenokarzinom	G2	PT2N0MX
P50	P	69	F	C.descendens	partiell muzinöses Adenokarzinom	G2	PT3N0MX
P51	P	64	M	Coecum	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N2MX
P52	P	68	F	Sigma	Adenokarzinom	G2	PT2N0MX
P53	P	85	M	Sigma	z.T. ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N2MX
P54	P	74	F	C.ascendens	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N1MX
P55	P	75	M	Rektum	ulzeriertes Adenokarzinom	G2-3	PT3N0MX
P56	P	68	M	Rektum	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N1MX
P57	P	60	M	Rektum	Adenokarzinom	G2	PT2N1MX
P58	P	38	M	Coecum	Adenokarzinom	G3	PT4N1MX
P59	P	47	M	C.descendens	Adenokarzinom	G2	PT4N0M0
P60	P	34	M	Übergang Sigma- C.descendens	muzinöses Adenokarzinom	G2	PT4N0MX
P61	P	51	M	C.ascendens	Adenokarzinom	G2	PT2N0MX

Ergebnisse

P62	K	79	F	C. ascendens	Adenokarzinom	G2	PT3N2M1
P63	K	73	F	Coecum	ulzeriertes, z.T. muzinöses Adenokarzinom	G2	PT3N0MX
P64	K	59	F	Sigma	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N0MX
P65	K	59	M	Sigma	Adenokarzinom	G2	PT2N0MX
P66	K	75	M	Rektum	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N0MX
P67	K	60	M	Rektum	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N2MX
P68	K	87	F	Coecum	ulzeriertes, z.T. muzinöses Adenokarzinom	G2	PT2N0MX
P69	K	48	F	Rektum	Adenokarzinom	G3	PT3N0MX
P70	K	62	M	Rektum	Adenokarzinom	G2	PT2N0MX
P71	K	74	F	C. descendens	Adenokarzinom	G3	PT3N1MX
P72	K	65	M	C. traransversum	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT4N0MX
P73	K	62	M	C. ascendens	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N0MX
P74	K	52	F	C. descendens	ulzeriertes Adenokarzinom	G2	PT3N2MX

Tabelle 21: Klinische und histologische Angaben zu den untersuchten Kolonkarzinomgeweben, sowie Daten zu den jeweiligen Patienten.

P1-P74: untersuchte Kolonkarzinomproben; Gewebe: Einbettung des untersuchten Materials; P: Paraffingewebe; K: Kryogewebe; F: weiblich; M: männlich

Die Eckdaten zum untersuchten Patientenkollektiv und zur Histologie der untersuchten Paraffin- und Kryogewebe sind im folgenden zusammengefasst:

Charakteristik	alle untersuchten Gewebe	beide Exons komplett sequenziert
Anzahl der bearbeiteten Karzinome	74	63
Gewebeeinbettung	Paraffin: 61; Kryo: 13	Paraffin: 50; Kryo: 13
Geschlechtsverteilung	28 Frauen, 46 Männer	24 Frauen, 39 Männer
Alter bei Tumormanifestation	65,3 Jahre (22-90 Jahre)	64,8 Jahre (22-90 Jahre)
Tumorlokalisation	Coecum: 11 C. ascendens: 18 C. transversum: 3 C. descendens: 8 Sigma: 19 Rektum: 15	Coecum: 10 C. ascendens: 15 C. transversum: 3 C. descendens: 6 Sigma: 17 Rektum: 12
Histologie	G1: 1 G2: 62 G3: 9 mucinös: 3	G1: 1 G2: 52 G3: 8 mucinös: 3

Tabelle 22: Klinische und histologische Daten der untersuchten Kolonkarzinomgewebe, sowie zum untersuchten Patientenkollektiv.

Zusätzlich wurden weitere 12 Kryogewebeproben mit jeweils korrespondierender Normalschleimhaut mit Hilfe von Northern blot Analysen untersucht. Die folgende Tabelle stellt die klinischen Daten zum untersuchten Patientenkollektiv, sowie zu den Gewebeproben zusammen.

<i>Pat.</i>	<i>Alter</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Lokalisation</i>	<i>Histologie</i>	<i>Grad</i>	<i>TNM</i>
1	59	M	Rektum	Adenokarzinom	G2	PT2N0M0
2	71	F	Coecum	muzinöses Adenokarzinom	G3	PT3N0M0
3	62	M	C. ascendens	Adenokarzinom	G2	PT3N0M0
4	74	F	Coecum	muzinös Adenokarzinom	G3	PT2N0M0
5	74	M	C. descendens	Adenokarzinom	G3	PT4N0M0
6	65	M	Rektum	Adenokarzinom	G2	PT3N2M0
7	81	F	C. ascendens	Adenokarzinom	G2	PT3N0M0
8	81	F	Rektum	z.T. muzinöses Adenokarzinom	G2	PT3N0M0
9	86	F	Coecum	z.T. muzinöses Adenokarzinom	G2	PT2N0M0
10	79	F	C. ascendens	Adenokarzinom	G2	PT3N2M1
11	56	F	Rektum	tubulovillöses Adenom	-	-
12	68	F	Rektum	Adenokarzinom	G2	PT2N2M0

Tabelle 23: Klinische und histologische Angaben zu den in der Northern-blot Analyse untersuchten Kolonkarzinomgeweben und einem Adenom (kryokonserviert), sowie Daten zu den jeweiligen Patienten.

F: weiblich; M: männlich

3.2 Ergebnisse der Untersuchungen zur Änderung der Expression der gastrointestinalen Glutathionperoxidase GI-GPx im Rahmen der kolorektalen Karzinogenese

3.2.1 Ergebnisse der Northern-blot Analyse zur Expression der GI-GPx-mRNA in Kolonkarzinomzelllinien

Mit Hilfe von Northern-blot Analysen wurde die mRNA-Expression der GI-GPx und TrxRa in den Kolonkarzinomzelllinien CaCo2, Colo 205, HCT15, HCT116 und LoVo untersucht. Die Hepatomzelllinie HepG2 wurde als GI-GPx-Positivkontrolle verwendet. Als Referenz wurde die konstituionelle mRNA-Expression der Glycerolaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase GAPDH untersucht.

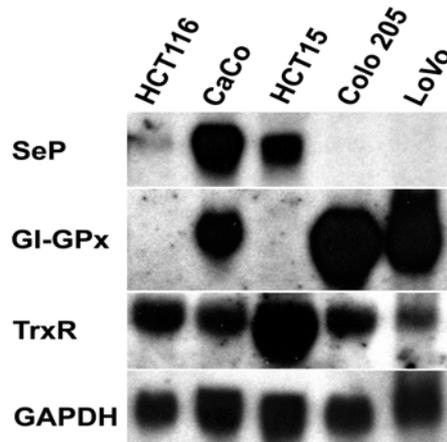


Abb. 3: Northern-blot Analyse an den Kolonkarzinomzelllinien CaCo2, Colo 205, HCT 116, HCT 15 und LoVo. Dargestellt ist die mRNA-Expression der GI-GPx, TrxR (Thioredoxinreduktase □), sowie GAPDH (Glyzerolaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase) in diesen Zelllinien. SeP = SelenoproteinP (vgl. 1.5.5 C).

Es zeigte sich eine gesteigerte mRNA-Expression der GI-GPx in den Zelllinien LoVo, Colo 205 und CaCo. In den Zelllinien HCT 116 und HCT 15 konnte keine mRNA-Expression der GI-GPx nachgewiesen werden. Dagegen konnte in allen untersuchten Zelllinien eine mRNA-Expression der TrxR nachgewiesen werden. Diese war in HCT 15-Zellen am stärksten ausgeprägt.

3.2.2 Ergebnisse der Northern-blot Analysen zur Expression der GI-GPx mRNA in Kolonkarzinomen im Vergleich zu korrespondierender gesunder Kolonschleimhaut

Kolonkarzinomgewebe mit korrespondierender Normalschleimhaut von 5 Kolonkarzinompatienten (1, 2, 3, 4, 5), die in Tabelle 23 aufgeführt sind wurden ebenfalls mittels Northern-blot Analyse untersucht. Abb. 4 zeigt die bei diesen Tumoren gefundene mRNA-Expression der GI-GPx und als Referenz die mRNA-Expression der GADPH.

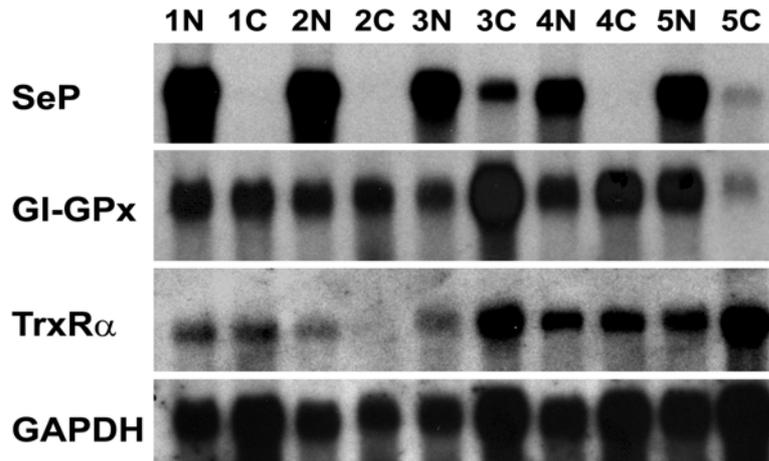


Abb. 4: Northern blot Analyse von 5 Kolonkarzinomgeweben mit korrespondierender Normalschleimhaut (vgl. Tabelle 23). Dargestellt ist die mRNA-Expression der GI-GPx, TrxR α und der GAPDH. SeP = SelenoproteinP (vgl. 1.5.5 C). N= Normalschleimhaut; C= Tumorschleimhaut

Das Gelbild zeigt exemplarisch bei 5 Patienten die mRNA-Expression der GI-GPx in Kolonkarzinomgewebe und korrespondierender Normalschleimhaut. Die densitometrische Auswertung der Northern-blot Analyse an Kolonkarzinomgewebe und korrespondierender Normalschleimhaut ergab für die mRNA-Expression der GI-GPx bei den einzelnen Geweben unterschiedliche Tendenzen. Im Mittel kam es zu einer 1,33 +/- 4,75fachen (-4,9 bis +13,4) Veränderung der mRNA-Expression im Tumorgewebe verglichen mit der Normalmukosa. Abb. 5 gibt die densitometrisch erhobenen Daten wieder. Dabei repräsentieren die Säulen die intraindividuelle Abweichung der mRNA-Expression der GI-GPx im kolorektalen Karzinom im Vergleich zur Normalschleimhaut desselben Patienten.

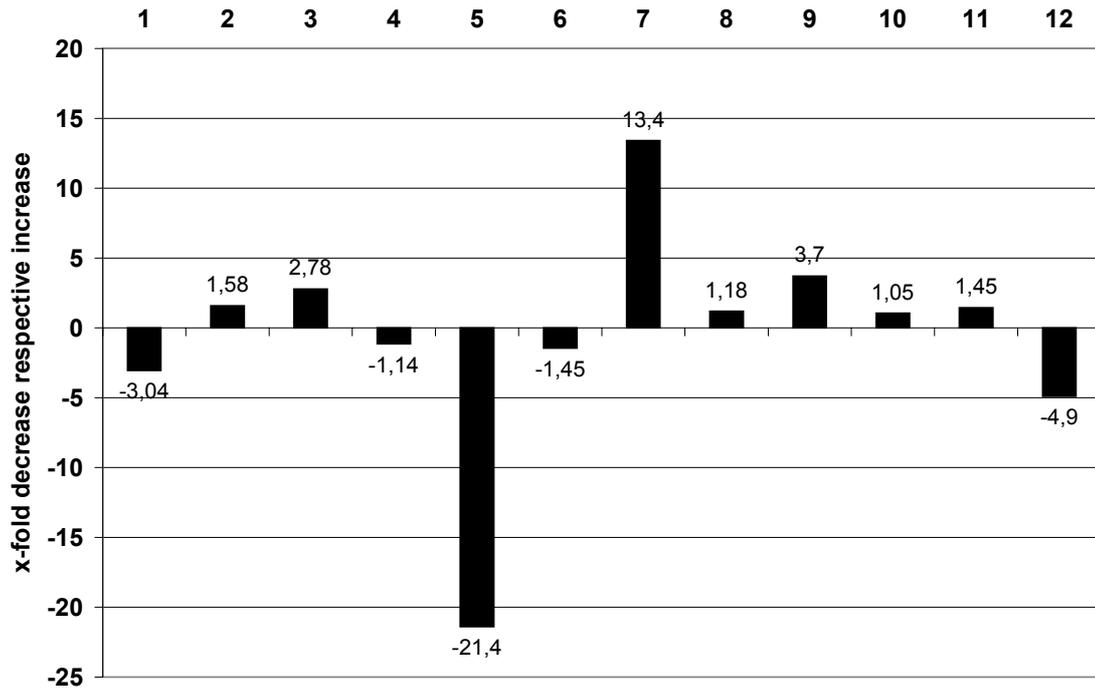


Abb. 5: Densitometrische Auswertung der mRNA-Expression der GI-GPx in Kolorektalkarzinomgewebe im Vergleich zur korrespondierenden Normalschleimhaut. Die Balken stehen für die intraindividuelle Abweichung der GI-GPx-mRNA-Expression im Karzinomgewebe verglichen mit der korrespondierenden Normalschleimhaut desselben Patienten.
5*: bei diesem Patienten konnte im Tumorgewebe keine GI-GPx-mRNA nachgewiesen werden.

3.3 Ergebnisse der Immunhistochemie zur Proteinexpression der GI-GPx in kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu korrespondierender gesunder Kolonschleimhaut

Die densitometrisch erhobenen Daten zur mRNA-Expression der GI-GPx im kolorektalen Karzinom verglichen mit Normalmukosa wurden auch immunhistochemisch bestätigt. Beispielhaft sind die Ergebnisse bei Patient 3 und 5 (3, 5) in Abb. 6 dargestellt.

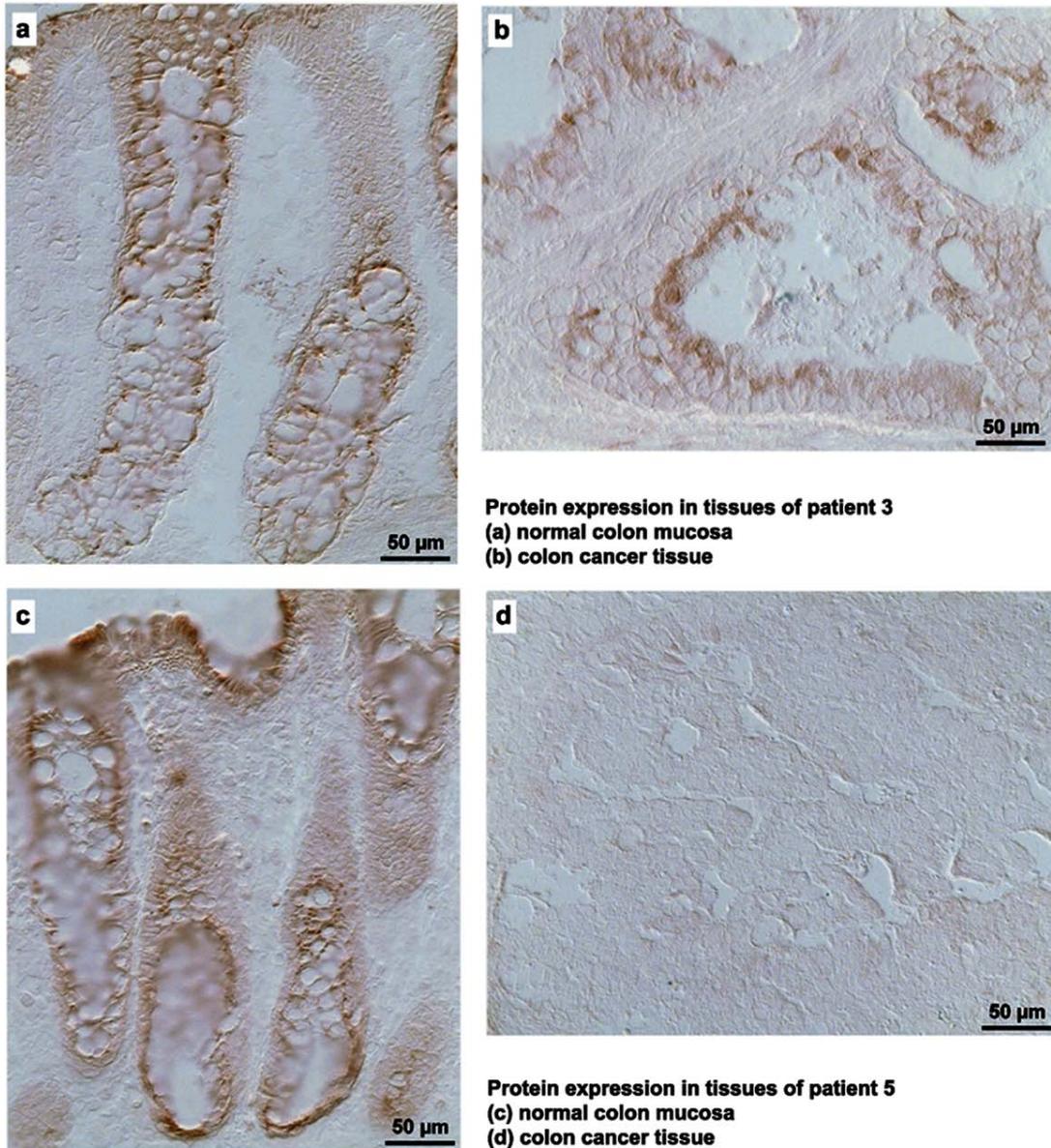


Abb. 6: Immunhistochemische Untersuchung der GI-GPx-Proteinexpression an kolorektalem Karzinom und korrespondierender Normalmukosa bei P3 und P5.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Florian et al. wurden immunhistochemische Untersuchungen an Kolonkarzinomgeweben hinsichtlich der Verteilung der GI-GPx im Normal- und Tumorgewebe durchgeführt. Es zeigte sich in kolorektalen Adenomen eine Expressionssteigerung des GI-GPx-Proteins mit einer charakteristischen perinukleären Anordnung. Intranukleär war kein Signal zu erhalten. Bei kolorektalen Karzinomen war das GI-GPx-Signal eher diffus über das gesamte Zytoplasma verteilt und mässig ausgeprägt.

3.4 Ergebnisse der Untersuchungen zum Auftreten genetischer Alterationen im GI-GPx Gen während der kolorektalen Karzinogenese

3.4.1 Ergebnisse der Sequenzierung des GI-GPx Gens

3.4.1.1 Übersicht über die Anzahl der Karzinome, in denen eine erfolgreiche Amplifikation und Sequenzierung des GI-GPx Gens gelang.

Die Amplifikation des GI-GPx Gens erfolgte in 4 überlappenden Abschnitten (Abschnitte GI-GPx 1.1; GI-GPx 1.2; GI-GPx 2.1; GI-GPx 2.2: vgl. Abb. 2). Von insgesamt 73 untersuchten Karzinomen gelang die Amplifikation und Sequenzierung der kompletten kodierenden Sequenz bei 63 Karzinomen (50 Paraffingewebe, 13 Kryogewebe). Von den übrigen Karzinomen war die Amplifikation und Sequenzierung nur einzelner Abschnitte möglich (vgl. Tabelle 24).

<i>Exonabschnitt</i>	GI-GPx 1.1	GI-GPx 1.2	GI-GPx 2.1	GI-GPx 2.2
	69	65	65	64
<i>Exon</i>	GI-GPx 1		GI-GPx 2	
	64		63	
<i>Gen</i>	GI-GPx			
	63			

Tabelle 24: Übersicht über die Anzahl der Karzinome, in denen von den insgesamt 74 untersuchten Kolonkarzinomgeweben eine erfolgreiche Sequenzierung der einzelnen Exonabschnitte, der beiden Exons bzw. des gesamten GI-GPx-Gens gelang.

Exonabschnitt: nur das jeweilige Teilexon konnte erfolgreich sequenziert werden

Exon: nur das GI-GPx Exon 1 bzw. Exon 2 konnte erfolgreich sequenziert werden

Gen: das gesamte GI-GPx Gen konnte erfolgreich sequenziert werden

3.4.1.2 Im Rahmen der Kolonkarzinogenese treten keine Mutationen im GI-GPx Gen auf.

Die Sequenzanalyse der untersuchten Kolonkarzinome ergab keine Mutationen im GI-GPx Gen. Somit erscheinen die beobachteten Expressionveränderungen der GI-GPx in Kolonkarzinomen bzw. in Adenomen im Vergleich zu korrespondierender normaler Kolonschleimhaut nicht durch Mutationen bedingt.

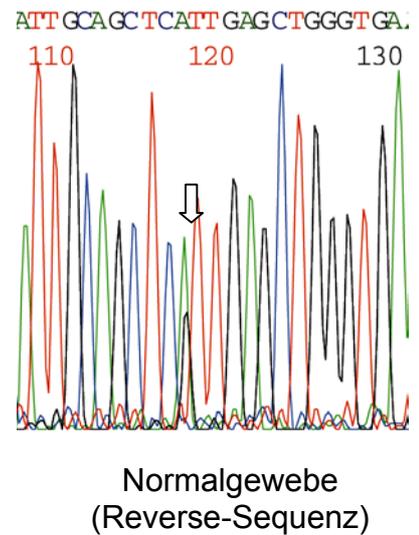
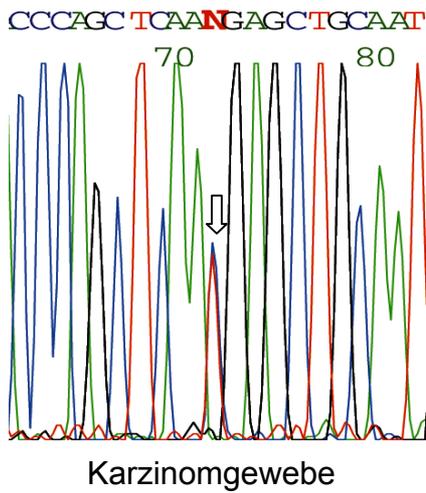
Bei den durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen wurden jedoch drei Polymorphismen gefunden, die bisher nicht beschrieben waren. Diese Polymorphismen wurden sowohl im Tumorgewebe, als auch in der korrespondierenden Normalschleimhaut nachgewiesen. Sie sind im folgenden charakterisiert.

3.4.1.3 Polymorphismus im Exon 1 des GI-GPx Gens

Im Exon 1 des GI-GPx Gens wurde ein Polymorphismus im Codon 51 (AAC→AAT) nachgewiesen. Dieser Polymorphismus führt jedoch nicht zu einem Aminosäureaustausch (Asparaginsäure).

DNA	CAG CTC AAC GAG CTG	bekannte Sequenz
Protein	Gln Leu Asn Gln Leu	

DNA	CAG CTC AAT GAG CTG	Polymorphismus
Protein	Gln Leu Asn Gln Leu	

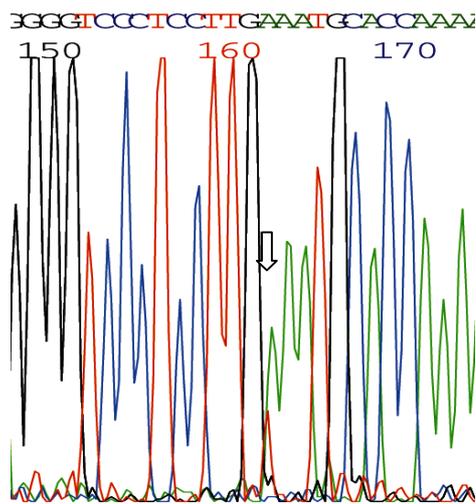


3.4.1.4 Polymorphismus im Intron 1 des GI-GPx-Gens

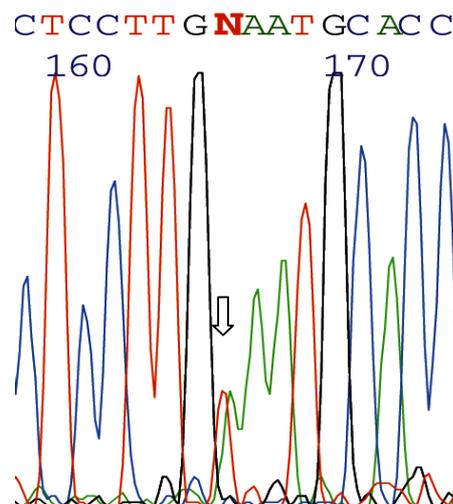
Im Intron 1 des GI-GPx Gens wurde ein weiterer Polymorphismus identifiziert. Hierbei handelt es sich um einen **TAA**→**AAA** Polymorphismus 19 bp 3' zum Exon 1. Interessanterweise wurde die Position dieses Polymorphismus bereits beschrieben, die Art des Basenaustausches jedoch nicht näher charakterisiert (Chu et al., Genomics 1996).

DNA: TCC TTG **TAA** TGC ACC bekannte Sequenz

DNA: TCC TTG **AAA** TGC ACC bekannter Polymorphismus



Karzinomgewebe



Normalgewebe

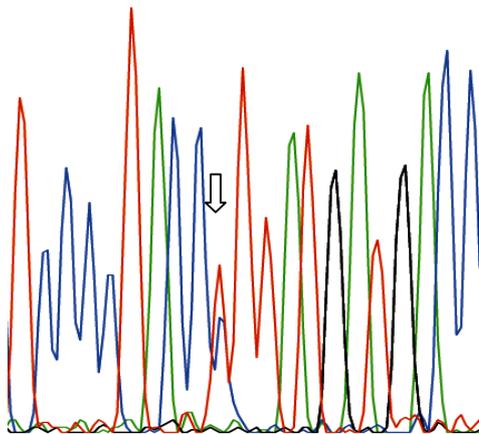
3.4.1.5 Polymorphismus im Exon 2 des GI-GPx Gens

Im Codon 103 des GI-GPx Gens fand sich ein weiterer, bislang unbekannter Polymorphismus. Hierbei handelt es sich um einen CCT→CTT Basenaustausch, der zum Austausch der hydrophilen Aminosäure Prolin gegen die aliphatische Aminosäure Leucin führt.

DNA: CCC TAC **CCT** TAT GAT bekannte Sequenz
 Protein: Pro Tyr **Pro** Tyr Asp

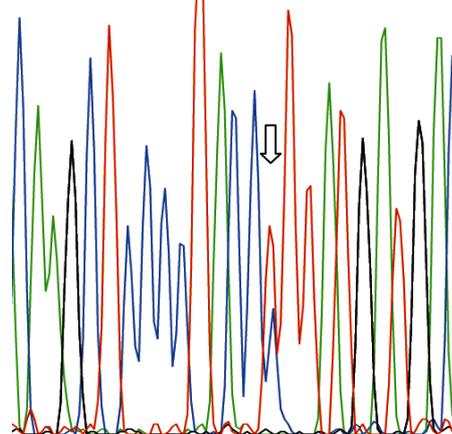
DNA: CCC TAC **CTT** TAT GAT Polymorphismus
 Protein: Pro Tyr **Leu** Tyr Asp

TCCCCCTACCNITATGATGACC
 180 190



Karzinomgewebe

CAGCTCCCCCTACCTTTATGATGAC
 170 180 190



Normalgewebe

Die gefundenen Polymorphismen, ihre Lokalisation und ihre Auswirkung bzgl. eines Aminosäureaustausches stellt Tabelle ... zusammen.

	<i>GI-GPx Exon 1</i>	<i>GI-GPx Intron 1</i>	<i>GI-GPx Exon 2</i>
Position	Codon 51	19 bp 3' von Exon 1	Codon 103
Polymorphismus	AAC → AAT	TAA → AAA	CCT → CTT
Aminosäureaustausch	stumm	-	Prolin → Leucin

Tabelle 25: Darstellung der bei der Untersuchung von 74 Kolonkarzinomgeweben gefundenen Polymorphismen hinsichtlich ihrer Position, Art und Auswirkung auf die codierte Aminosäure.

3.4.2 Häufigkeit der identifizierten Polymorphismen in den untersuchten Kolonkarzinomgeweben

Der Polymorphismus im GI-GPx Exon 1 konnte bei der Sequenzierung des Exonteilabschnitts GI-GPx 1.2 identifiziert werden. Die Sequenzierung dieses Exonteilbereichs gelang bei insgesamt 65 Proben (vgl. Tabelle 21). Der Basenaustausch AAC→AAT des Codon 51 wurde dabei in nur einer Karzinomprobe gefunden (P59, Tabelle 21). Er konnte auch in der korrespondierenden Normalschleimhaut des Patienten nachgewiesen werden. Da dieser Basenaustausch zu keinem Aminosäureaustausch im Protein führt, wurde die Frequenz des Polymorphismus in den Blutproben von gesunden Probanden und Kolonkarzinompatienten nicht weiter untersucht.

Der im Intron 1 des GI-GPx Gens identifizierte Polymorphismus wurde ebenfalls bei der Sequenzierung des Exonteilabschnitts GI-GPx 1.2 gefunden. Hierbei handelt es sich um einen TAA→AAA Polymorphismus 19 bp 3' zum Exon 1. Von den 65 Karzinomen, in denen sich dieser Genabschnitt erfolgreich sequenzieren ließ, fand sich der Polymorphismus lediglich in einer Probe (P1, Tabelle 21). Der Basenaustausch konnte auch in der korrespondierenden Normalschleimhaut nachgewiesen werden. Die Frequenz dieses Basenaustausches wurde ebenfalls nicht weiter in Blutproben von gesunden Probanden und Kolonkarzinompatienten untersucht, da es sich um einen Austausch im Intron handelt.

Der dritte gefundene Polymorphismus im Codon 103 des GI-GPx Exon 2 konnte durch Sequenzierung des Exonteilabschnitts GI-GPx 2.1 identifiziert werden. Die erfolgreiche Sequenzierung dieses Abschnitts gelang bei 65 Proben (vgl. Tabelle 21). Der Basenaustausch CCT→CTT führt zum Austausch der hydrophilen Aminosäure Prolin gegen die aliphatische Aminosäure Leucin. Dieser Polymorphismus konnte in zwei Karzinomproben und der jeweils korrespondierenden Normalmukosa nachgewiesen werden (P2 und P12, Tabelle 21). Der in den beiden Paraffingeweben nachgewiesene Polymorphismus ließ sich mit der SNaPshot-PCR-Methode bestätigen. Abb. 7 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

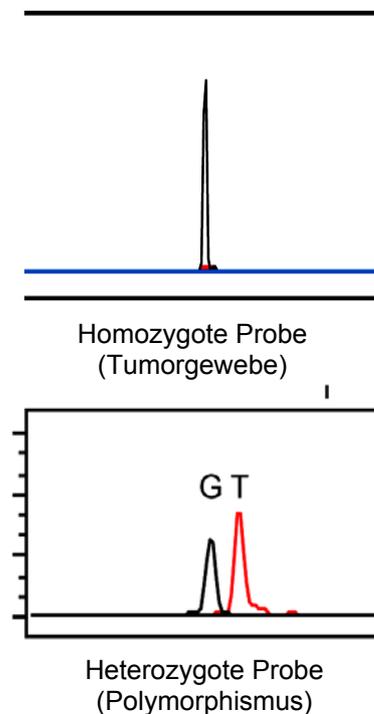


Abb. 7: SNaPshot-Analyse der Proben P2. Der im Karzinomgewebe gefundene heterozygote Polymorphismus (untere Abb.) CCT → CTT (vgl. 3.4.1.5) konnte auch in der korrespondierenden Normalschleimhaut nachgewiesen werden. Die obere Abb. zeigt den homozygoten Genlocus bei einem Tumorgewebe

Die Frequenz dieses Polymorphismus wurde durch die SNaPshot-PCR in insgesamt 372 Blutproben von 187 gesunden Probanden und 185 Kolonkarzinompatienten weiter untersucht (vgl. 3.4.3).

Die Häufigkeit der gefundenen Polymorphismen in den jeweils untersuchten Kolonkarzinomgewebeproben sind in Tabelle 25 zusammengestellt.

	GI-GPx Exon 1	GI-GPx Intron 1	GI-GPx Exon 2
	Codon 51	19Bp 3` von Exon 1	Codon 103
Exonteilabschnitt	GI-GPx 1.2	GI-GPx 1.2	GI-GPx 2.1
Gesamtanzahl	n=65	n=65	n=65
W/W	64 (98,4%)	64 (98,4%)	63 (96,8%)
W/P	1 (1,6%)	1 (1,6%)	2 (3,2%)
P/P	-	-	-

Tabelle 26: Häufigkeit der gefundenen Polymorphismen in den untersuchten Kolonkarzinomgeweben.

Exonteilabschnitt: Bei der Sequenzierung dieses Exonabschnitts (vgl. jeweils Tabelle 24) wurde der Basenaustausch identifiziert.

Gesamtanzahl: Die Anzahl der für das jeweilige Exonteilabschnitt erfolgreich sequenzierten Proben.

W/W: homozygoter Wildtyp; P/P: homozygoter Polymorphismus; W/P: heterozygoter Allel

3.4.3 SNaPshot-Analyse an Blut-DNA zur Häufigkeitsverteilung des gefundenen Pro103Leu Polymorphismus

Insgesamt wurden 372 Blutproben, davon 187 von gesunden Probanden und 185 von Patienten mit einem Kolonkarzinom mittels der sog. SNaPshot Methode (vgl. 2.2.9) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt:

Polymorphismus	Kontrollgruppe	Kolonkarzinompatienten
Pro103Leu	n=187	n=185
W/W	179 (95,7%)	178 (96,2%)
W/P	8 (4,3%)	7 (3,8%)
P/P	-	-

Tabelle 27: Häufigkeit des im GI-GPx Exon 2 gefundenen Polymorphismus (Pro103Leu) bei insgesamt 372 Blutproben (187 von gesunden Probanden, 185 von Kolonkarzinompatienten) mittels der SNaPshot-Methode.

W/W: homozygoter Wildtyp; P/P: homozygoter Polymorphismus; W/P: heterozygoter Polymorphismus

3.4.4 Untersuchungen an Zelllinien

Nach der molekulargenetischen Sequenzanalyse der beiden Exons GI-GPx 1 und 2 an mikrodisseziertem Kolonkarzinomgewebe aus Paraffin- und Kryogewebe, wurden auch Kolonkarzinom-Zelllinien auf das Vorliegen von Mutationen bzw. Polymorphismen untersucht. Hierbei wurden entsprechend

den beiden Tumorentstehungstheorien (vgl. 1.3.3.1; 1.3.3.2) Zelllinien ausgewählt, die den Tumorsuppressor- bzw. Mutator-Pathway repräsentieren. Bei der Untersuchung dieser Zelllinien ergaben sich ebenfalls keinerlei Mutationen. Es waren im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Sequenzierung von Kolonkarzinomproben aus Paraffin- und Kryogewebe auch keine Polymorphismen auffindbar.

Zelllinie	GI-GPx
CaCo2	W/W
Colo 205	W/W
HCT 116	W/W
HCT 15	W/W
LoVo	W/W

Tabelle 28: Pro103Leu-Polymorphismus im GI-GPx Exon 2 in den Kolonkarzinomzelllinien CaCo2, Colo 205, HCT 116, HCT 12 und LoVo. Alle untersuchten Zelllinien zeigten an diesem Locus homozygot das Wildtypallel.

4. Diskussion

In den letzten Jahren haben zahlreiche epidemiologische (Clark, 1993; Dworkin, 1988; Ghadirian, 2000; Jansson, 1985; Russo, 1997; Schrauzer, 1977), tierexperimentelle (El-Bayoumy, 1995; Feng, 1999; Jao, 1996; Nelson, 1996; Soullier, 1981; Yan, 1999) und interventionelle Studien (Clark, 1996) darauf hingewiesen, dass Selen möglicherweise eine protektive Rolle bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen spielt (vgl. 1.5.3).

In diesem Zusammenhang konnte in der kolorektalen Mukosa gesunder Probanden eine hohe Expressionsrate der Selenoproteine SeP und GI-GPx festgestellt werden (Mörk, 1998). Es wurde angenommen, dass diese beiden Selenoproteine durch die Reduktion des oxidativen Stress im Gewebe der Entstehung von Karzinomen entgegenwirken können.

Untersuchungen hinsichtlich der Expression dieser beiden Selenoproteine in kolorektalen Adenomen verglichen mit der korrespondierenden Normalmukosa zeigten, dass es im Adenom für das SeP zu einer Abnahme und für die GI-GPx zu einer Zunahme der Expression kommt (Mörk, 2001).

Auch immunhistochemische Untersuchungen an kolorektalen Adenomen und Karzinomen bezüglich des Expressionsmusters der GI-GPx ergaben bemerkenswerte Ergebnisse. So konnten Florian et al. kürzlich zeigen, dass es in kolorektalen Adenomen sowohl zu einer Steigerung der mRNA-Expression kommt, als auch zu einer Umverteilung des GI-GPx-Proteins in der Zelle: charakteristischerweise ist das Protein perinukleär lokalisiert ohne intranukleäre Signale. In kolorektalen Karzinomen ist das immunhistochemische Signal diffus und weniger intensiv, was für die Verteilung des Proteins über das gesamte Zytoplasma spricht (Florian, 2001).

Der Mechanismus für die gefundenen Veränderungen der mRNA- und Proteinexpression der GI-GPx in kolorektalen Adenomen und Karzinomen ist

bisher nicht bekannt. Genetische Alterationen oder Veränderungen der Transkription könnten beispielsweise ursächlich beteiligt sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die GI-GPx-mRNA-Expression in 11 kolorektalen Karzinomen und einem kolorektalen Adenom untersucht. Es zeigte sich eine variable Expression, anders als die gefundene deutliche Abnahme in kolorektalen Adenomen (Mörk, 2001). Die mRNA-Expression ging dabei konform mit der Proteinexpression in der Zelle. Möglicherweise kommt es bei weiterer Progression des Tumors entlang der Adenom-Karzinom-Sequenz zu einer Reduktion der Gentranskription.

Es konnten bei der Sequenzierung des gesamten codierenden Abschnitts des GI-GPx-Gens mit den jeweils angrenzenden Intronarealen keine Mutationen in kolorektalen Karzinomen nachgewiesen werden. Die veränderte Expression der GI-GPx scheint somit nicht auf genetischen Alterationen zu basieren. Ob etwa Mutationen im Promoter, im 3`untranslatierten Bereich des GI-GPx-Gens mit dem für den Seleneinbau essentiellen SECIS-Element oder etwa Veränderungen der Regulationsmechanismen durch Zytokine und Transkriptionsfaktoren für die gefundenen Expressionsmuster der GI-GPx in kolorektalen Adenomen und Karzinomen verantwortlich sind bleibt weiter zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass es entlang der kolorektalen Karzinogenese in kolorektalen Adenomen und Karzinomen zu keiner generellen Reduktion der Selenoproteinexpression und zu keinem kompletten Funktionsverlust kommt. Dies legt eine individuelle Regulation der einzelnen Selenoproteine im Organismus nahe.

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen an Geweben von kolorektalen Karzinomen mit korrespondierender Normalmukosa, sowie an Blutproben von Kolonkarzinompatienten und gesunden Probanden als Kontrollgruppe konnten keine Mutationen im codierenden Abschnitt und den angrenzenden

Intronarealen des GI-GPx-Gens nachgewiesen werden. Es fanden sich aber neue, bisher noch nicht charakterisierte Polymorphismen.

Der Pro103Leu-Polymorphismus im Exon 1 des GI-GPx-Gens erwies sich zwar als selten, führt aber zum Austausch einer hydrophilen Aminosäure gegen eine aliphatische. Die Ladung und dreidimensionale Struktur der neu eingebauten Aminosäure sind somit ebenfalls verschieden, so dass es zu einer Veränderung der Funktion des GI-GPx-Proteins führen könnte. Allerdings zeigten sich hinsichtlich der Häufigkeit des gefundenen Polymorphismus im Karzinom- und Normalgewebe keine Unterschiede, so dass es möglicherweise nicht mit der kolorektalen Karzinogenese in Verbindung steht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mRNA-Expression der GI-GPx in kolorektalen Karzinomen ein variables Muster aufzeigt und dass im GI-GPx-Gen keine Mutationen nachgewiesen werden konnten, die die veränderten Expressionsmuster erklären könnten. Dies legt nahe, dass es während der kolorektalen Karzinogenese zu keiner generellen down-Regulation aller Selenoproteine kommt, sondern dass es wohl individuelle Regulationsmechanismen für die einzelnen Selenoproteine gibt.

Es wurde ein Polymorphismus gefunden, der zum Aminosäureaustausch im Protein führt. Allerdings ist seine Inzidenz bei Patienten mit kolorektalem Karzinom verglichen mit gesunden Probanden der Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht. Somit scheint dieser Polymorphismus keine wesentliche Rolle bei der kolorektalen Karzinogenese zu spielen. Wie Selen bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen seine eingangs erwähnte protektive Wirkung entfaltet bleibt weiterhin unklar.

5. Literaturverzeichnis

Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Jass, J.R., Green, J.S., Lynch, H.A.T., Watson, P., Tallqvist, G., Juhola, M., Sistonen, P., Hamilton, S.R., Kinzler, W., Vogelstein, B., de la Chapelle, A.: Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res.*, 1994; 54(7):1645-1648

Aaltonen, L.A.: Hereditary intestinal cancer. *Cancer Biol.*, 2000; 10(4):289-98

Aaseth, J., Thomassen, Y., Alexander, J., Munthe, E.: In: Selenium in biology and medicine. Avi. Publ. Co., Westport, Conn., 1981; 418

Aebi, S., Fink, D., Gordon, R., et al.: Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. *Clin. Cancer Res.*, 1997; 3:1763-1767

Alexander, J., Watanabe, T., Wu, T.T., Rashid, A., Li, S., Hamilton, S.R.: Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am. J. Pathol.*, 2001; 158 (2):527-535

Allan, C.B., Lacourciere, G.M., Stadtman, T.C.: Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Ann. Rev. Nutr.*, 1999; 19:1-16

Al-Taie, O., Mörk, H., Seufert, J., Treis, H., Jakob, F., Scheurlen, M.: Hereditäres Non-Polyposis kolorektales Karzinom (HNPCC). *Medizinische Klinik*, 2001; 96:529-538 (Nr. 9)

Arner, E.S., Holmgren, A.: Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267(20):6102-9

Arteel, G.E., Mostert, V., Oubrahim, H., Briviba, K., Abel, J., et al.: Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol. Chem.*, 1998; 379:1201-1205

Atkin, W.S., Morson, B.C., Cuzick, J.: Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N. Engl. J. Med.*, 1992; 326(10):658-662

Avissar, N., Slemmon, J.R., Palmer, I.S., Cohen, H.J.: Partial sequence of human plasma glutathione peroxidase and immunologic identification of milk glutathione peroxidase as the plasma enzyme. *J. Nutr.*, 1991; 121:1243-1249

Avissar, N., Finkelstein, J.N., Horowitz, S., Willey, J.C., Coy, E., Frampton, M.W., Watkins, R.H., Khullar, P., Xu, Y.L., Cohen, H.J.: Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung vells. *Am. J. Physiol.*, 1996; 270:L173-L182

Aw, T.Y.: Biliary glutathione promotes the mucosal metabolism of luminal peroxidized lipids by rat small intestine in vivo. *J. Clin. Invest.*, 1994; 1218-1225

Bai, J., Ge, K.Y., Deng, X.J., Wu, S.Z., Wang, S.Q., Xue, A.N., Su, C.Q.: Effects of selenium intake on myocardial necrosis induced by coxsackie viral infection in mice. *Yingyang Yuebao*, 1982; 4:2350

Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B., Williamson, G.: Reduction of thymine hydroperoxide by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and glutathione transferases. *FEBS letters*, 1997; 410:210-212

Beath, O.A., Draize, J.H., Eppson, H.F., Gilbert, C.S., McCreary, O.C.: Certain poisonous plants of Wyoming activated by selenium and their association with respect to soil types. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 1934; 23(2):94-97

Beck, M.A., Shi, Q., Morris, V.C., Levander, O.A.: Rapid genomic evolution of a non-virulent Coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nature Medicine*, 1995; 1:433-436

Beckman, K.B., Ames, B.N.: Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272:19633-19636

Behne, D., Weiss-Novak, C., Kalcklosch, M., Westphal, C., Gessner, H., Kyriakopoulos, A.: Studies on new mammalian selenoproteins. In: Trace elements in man and animals - TEMA 8., Gersdorf: Verlag Media Touristik: 516-524

Behne, D., Kyriakopoulos, A., Kalcklosch, M., et al.: Two new selenoproteins found in the prostatic glandular epithelium and the spermatic nuclei. *Biomed. Environ. Sci.*, 1997; 10:340-345

Behne, D., Pfeifer, H., Rothlein, D., Kyriakopoulos, A.: Cellular and subcellular distribution of selenium and selenoproteins. In: Roussel, A.M., Favier, A., Anderson, R.A. (eds.): Trace elements in man and animals 10: proceedings of the tenth international symposium on trace elements in man and animals. New York: Plenum Press, 2000; 29-33

Bermano, G., Arthur, J.R., Hesketh, J.E.: Selective control of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA stability by selenium supply. *FEBS Lett.*, 1996; 387:157-160

Berry, M.J., Banu, L., Chen, Y.Y., Mandel, S.J., Kieffer, J.D., Harney, J.W., Larsen, P.R.: Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type 1 deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature*, 1991; 353:273-276

Berry, M.J., Banu, L., Harney, J.W., Larsen, P.R.: Functional characterization of eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *The EMBO Journal* 1993; 12 (8):3315-3322

Bertario, L., Russo, A., Sala, P., et al.: Survival of patients with hereditary colorectal cancer: comparison of HNPCC and colorectal cancer in FAP patients with sporadic colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 1999; 80:183-187

Binder, V., Hendriksen, C., Kreiner, S.: Prognosis in Crohn's disease based on results from a regional patient group from the county of Copenhagen. *Gut*, 1985; 26(2):146-150

Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B., Zinoni, F.: Selenocysteine, the 21st amino acid. *Mol. Microbiol.*, 1991; 5:515-520

Böcker, U., Katschinski, B., Leyer, P.: Colitis ulcerosa: Kein erhöhtes Risiko kolorektaler Karzinome? *Z. Gastroenterol.*, 1994; 32: 184-185

Bodmer, W.F., Bailey, C.J., Bodmer, J., Bussey, H.J.R., Elle, A., Gorman, P., Lucibello, F.C., Murday, C.A., Rider, S.H., Scambler, P., Sheer, D., Solomon, E., Spurr, N.K.: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*, 1987; 328:614-619

Böhles, H.: Radikalerkrankungen: Die Bedeutung von Sauerstoffradikalen für die klinische Medizin. In: Kruse-Jarres, J.D. (ed.): Mineralstoffe, Spurenelemente, Vitamine: Risikofaktoren-Messverfahren-Präventivmassnahmen. Kongressband vom 7. Stuttgarter Mineralstoff-Symposium. Schönaich, Papierhaus Mack, 1995; 195-217

Bonelli, L., Martines, H., Conio, M.: Family history of colorectal cancer as a risk factor for benign and malignant tumours of the large bowel. A case control study. *Int. J. Cancer*, 1988; 41(4):513-517

Breen, A.P., Murphy, J.A.: Reaction of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Med.*, 1995; 18:1033-1077

Brigelius-Flohé, R., Aumann, K.D., Blocker, H., Gross, G., Schuckelt, R., Ursini, F., Wingender, E., Flohé, L.: Phospholipid-hydroxyperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA and deduced amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269:7342-7348

Brigelius-Flohé, R.: Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999; 27:951-965

Bronner, C.E., Baker, S.M., Morrison, P.T., Warren, G., Smith, L.G., Lescoe, M.K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblum, A., Tannergard, P., Bollag, R.J., Godwin, A.R., Ward, D.C., Nordenskjold, M., Fishel, R., Kolodner, R., Liskay, R.M.: Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 1994; 368:258-261

Bubb, V.J., Curtis, L.J., Cunningham, C. et al.: Microsatellite instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene*, 1996; 12:2641-2649

Burk, R.F., Lawrence, R.A., Lane, J.M.: Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat due to paraquat and diquat: effect of selenium deficiency. *J. Clin. Invest.*, 1980; 65:1024-1031

Burk, R., Hill, K.E.: Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *J. Nutr.*, 1994; 124:1891-1897

Burk, R.F., Hill, K.E., Awad, J.A., Morrow, J.D., Kato, T., Cockell, K.A., Lyons, P.R.: Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology*, 1995; 21:561-569

Burk, R.F., Hill, K.E., Awad, J.A., Morrow, J.D., Lyons, P.R.: Liver and kidney necrosis in selenium-deficient rats depleted of glutathione. *Lab. Invest.*, 1995; 72:723-730

Bussey, H.J.R.: Familial polyposis coli, family study, histopathology, differential diagnosis, and results of treatment. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press, 1975

Carethers, J.M., Chauhan, D.P., Fink, D., et al.: Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluoracil. *Gastroenterology*, 1999; 117:123-131

- Cerutti, P.: Pro-oxidant states and tumor promotion. *Science*, 1985; 221:375-381
- Chambers, I., Frampton, J., Godfarb, P., Affara, N., McBain, W., Harrison, P.R.: The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the "termination"codon TGA. *EMBO J.*, 1986; 5:1221-1227
- Chen, W., Chen, J.Y., Liu, J.M., et al.: Microsatellite instability in sporadic-colon-cancer patients with and without liver metastases. *Int. J. Cancer*, 1997; 74:470-474
- Chomczynski P.: A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 1993; 15:532-535
- Christensen, M.J., Burgener, K.W.: Dietary selenium stabilizes glutathione peroxidase mRNA in rat liver. *J. Nutr.*, 1992; 122:1620-1626
- Chu, F.F., Doroshov, J.H., Esworthy, R.S.: Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.*, 1992; 264:2571-2576
- Chu, F.F., Doroshov, J.H., Esworthy, R.S.: Expression, characterization and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268:2571-2576
- Chu, F.F.: The human glutathione peroxidase genes GPX2, GPX3, and GPX4 map to chromosomes 14, 5, and 19, respectively. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 1994; 66(2):96-98
- Chu, F.F., Esworthy, R.S.: The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995; 323:288-294
- Chu, F.F., de Silva, R., Esworth, R.S., Boteva, K.K., Walters, C.E., Roses, A., Rao, P.N., Pettenati, M.J.: Polymorphism and chromosomal localization of the GI-form of human glutathione peroxidase (GPX2) on 14q24.1 by in situ hybridization. *Genomics*, 1996; 32(2):272-276
- Chu, F.F., Esworthy, R.S., Ho, Y.S., Swiderek, K., Elliot, R.W.: Expression and chromosomal mapping of mouse Gpx2 gene encoding the gastrointestinal form of glutathione peroxidase, GPX-GI. *Biomed. Environ. Sci.*, 1997; 10:156-162
- Chu, F.F., Esworthy, R.S., Lee, L., Wilczynski, S.: Retinoic acid induces Gpx2 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Nutrition*, 1999; 129:1846-1854
- Clark, L.C., Combs, G.F., Turnbull, B.W. Jr., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.A., Kongrad, A., Leshner, J.L., Park, K., Sanders, B.B., Smith, C.L., Richard, T.: For the nutritional prevention of cancer study group: effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. *JAMA*, 1996; 276:1957-1963
- Clark, L.C., Hixson, L.J., Combs, G.F., Reid, M.E., Turnbull, B.W., Sampliner, R.E.: Plasma selenium concentration predicts the prevalence of colorectal adenomatous polyps. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1993; 2(1):41-6

- Combs, H.F. Jr., Combs, S.B.: Chemical aspects of selenium. In: The role of selenium in nutrition. Acad. Press Orlando and London, 1986; 46-52
- Connell, W.R., Talbot, I.C., Harpaz, N., et al.: Clinicopathological characteristics of colorectal carcinoma complicating in ulcerative colitis. *Gut*, 1994; 35(10):1419-1423
- Curran, B., Lenehan, K., Mucahy, H., et al.: Replication error phenotype, clinicopathological variables, and patient outcome in Dukes` B stage 2 (T3,N0,M0) colorectal cancer. *Gut*, 2000; 46:200-204
- Dreher, I., Junod, A.F.: Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer*, 1996;32A(1):30-8. Review.
- Dreher, I., Schütze, N., Baur, A., Hesse, K., Schneider, D., Köhrle, J., Jakob, F.: In: Selenoproteins are expressed in fetal human osteoblast-like cells. *Biochem. and Biophys. Research Communication*, 1998; 245:101-107
- Dworkin, B.M., Rosenthal, W.S., Mittelman, A., Weiss, L., Applebee-Crady, L., Arlin, Z.: Selenium status and the polyp-cancer sequence: a colonoscopically controlled study. *Am. J. Gastroenterol.*, 1988; 83(7):748-51
- Ekbom, A., Helmick, C.G., Zack, M., Adami, H.O.: Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N. Engl. J. Med.*, 1990; 323(318):1228-1233
- Ekbom, A., Helmick, C.G., Zack, M., Adami, H.O.: Increased risk of large-bowel cancer in Crohn`s disease with colonic involvement. *Lancet*, 1990; 323(18):1228-1233
- El-Bayoumy, K., Upadhyaya, P., Chae, Y.H., Sohn, O.S., Rao, C.V., Fiala, E., Reddy, B.S.: Chemoprevention of cancer by organoselenium compounds. *J. Cell Biochem. Suppl.*, 1995; 22:62-100
- Elsaleh, H., Joseph, D., Grieu, F., et al.: Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet*, 2000; 355:1745-1750
- Esworthy, R.S., Swiderek, K.M., Ho, Y.S., Chu, F.F.: Selenium-dependent glutathione peroxidase-GI is a major glutathione peroxidase activity in the mucosal epithelium of rodent intestine. *Biochem. Biophys. Acta*, 1998; 1381:213-226
- Fearon, E.R., Vogelstein, B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990; 61:759-767
- Feeley, K.M., Fullard, J.F., Heneghan, M.A., et al.: Microsatellite instability in sporadic colorectal carcinoma is not an indicator of prognosis. *J. Pathol.*, 1999; 188:14-17
- Fehrenbach, E., Northoff, H.: Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc. Immunol. Rev.*, 2001; 7:66-89
- Feng, Y., Finley, J.W., Davis, C.D., Becker, W.K., Fretland, A.J., Hein, D.W.: Dietary selenium reduces the formation of aberrant crypts in rats administered 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1999; 157(1):36-42

- Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., et al.: The role of DNA mismatch repair on platinum drug resistance. *Cancer Res.*, 1996; 56:4881-4886
- Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R.S., Copeland, N.G., Jenikins, N.A., Garber, J., Kane, M., Kolodner, R.: The human mutator gene homolog MSG 2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 1993; 75:1027-1038
- Flohé, L., Günzler, W., Schock, H.H.: Glutathione peroxidase. A selenoenzyme. *FEBS Lett.*, 1973; 32:132-134
- Florian, S., Winkler, K., Schmehl, K., Jacobasch, G., Kreuzer, O.J., Meyerhof, W., Brigelius-Flohé, R.: Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathion peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radical Research*, 2001; 35:655-663
- Franke, K.W., Potter, V.R.: A new toxicant occurring naturally in certain samples of plant food stuffs. 9. Toxic effects of orally ingested selenium. *J. Nutr.*, 1935; 10:213-221
- Friedman, H.S., Johnson, S.P., Dong, Q. et al.: Methylator resistance mediated by mismatch repair deficiency in a glioblastoma multiforme xenograft. *Cancer Res.*, 1997; 57:2933-2936
- Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Speizer, F.E., Willet, W.C.: A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 1994; 331(25):1669-1674
- Gao, X., Sedgwick, T., Shi, Y.B., Evans, T.: Distingt functions are implicated for the GATA-4, -5, and -6transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 1998; 18:2901-2911
- Ge, K., Xue, A., Bai, J., Wang, S.: Keshan disease - an endemic cardiomyopathy in China. *Virchows Arch.*, 1983; 401,1
- 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):305-313
- Gladyshev, V.N., Jeang, K.T., Stadtman, T.C.: Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93:6146-6151
- Gibson, R.S., Zimmerman, T., Albrecht, S., Lauschke, H., Ludwig, K.: Reaktive Sauerstoffspezies in der Pathogenese gastrointestinaler Tumore. *Med. Klinik (Suppl 1)*, 1995; 90:15-18
- Greenstein, A.J., Sachar, D.A., Smith, H., Janowitz, H.D., Aufses, A.H.: Comparison of cancer risk in Crohn`s disease and ulcerative colitis. *Cancer*, 1981; 48(12):2742-2745
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., Sargeant, L., Krapchom K., Wolff, E., Burt, R., Hughes, J.P., Warrington, J., McPherson, J., Wasmuth, J., LePaslier, D., Abderrahim, H., Cohen, D., Leppert, M., White, R.: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 1991; 66(3):589-600

- Groden, J., Gelbert, L., Thliveris, A., Nelson, L., Robertson, M., Joslyn, G., Samowitz, W., Spirio, L., Carlson, M., Burt, R.: Mutational analysis of patients with adenomatous polyposis: identical inactivating mutations in unrelated individuals. *Am. J. Hum. Genet.*, 1993; 52(2):263-272
- Gryfe, R., Kim, H., Hsieh, E.T., et al.: Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2000; 342:69-77
- Guidoboni, M., Gafa, R., Viel, A., Doglioni, C., Russo, A., Santini, A., DeTin, L, Macri, E., Lanza, G., Boiocchi, M.: Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am. J. Pathol.*, 2001; 159(1):297-304
- Guillem, J.G., Forde, K.A., Treat, M.R., Neugut, A.I., O`Toole, K.M., Diamond, B.E.: Colonoscopic screening for neoplasms in asymptomatic first degree relatives of colon cancer patients. A controlled prospective study. *Dis. Colon Rectum.*, 1992; 35(6):523-529
- Guillem, J.G., Bastar, A.L., Ng, J., Huhn, J.L., Cohen, A.M.: Clustering of colorectal cancer in families of probands under 40 years of age. *Dis. Colon Rectum*, 1996; 39(9):1004-1007
- Guimaraes, M.J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B.G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkns, N.A., Ferrick, D.A., Kastelein, R.A., Bazan, J.Z., Zlotnik, A.: Identifikation of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93 (26):15086-15091
- Gupta, S., Narang, R., Krshinaswami, K., Yadav, S.: Plasma selenium levels in cancer patients. *Indian J. Cancer*, 1994; 31:192-197
- Guyton, K.Z., Kensler, T.W.: Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br. Med. Bull.*, 1994; 49:523-544
- Gyde, S.N., Prior, P., Allan, R.N., et al.: Colorectal cancer in ulcerative colitis: a cohort study of primary referrals from three centers. *Gut*, 1988; 29(2):206-217
- Halliwell, B.: Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, 1994; 52:253-265
- Hanford, H.: Disseminated polyps of the large intestine becoming malignant. *Trans. Pathol. Soc. London*, 1890; 41:133-137
- Harrison, I., Littlejohn, D., Fell, G.S.: Distribution of selenium in human blood plasma and serum. *Analyst*, 1996; 121(2):189-194
- Hathcock, J.N.: Vitamins and minerals: efficacy and safety. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997; 66:427-437
- Heider, J., Baron, C., Böck, A.: Coding from a distance: dissection of the mRNA determinants required for the incorporation of selenocysteine into protein. *EMBO J.*, 1992; 11:3759-3766

Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Hoglund, P., Jarvinen, H., Kristo, P., Pelin, K., Ridanpaa, M., Salovaara, R., Toro, T., Bodmer, W., Olschwang, S., Olsen, A.S., Stratton, M.R., de la Chapelle, A., Aaltonen, L.A.: A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 1998; 391(6663):184-187

Hemminki, A., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Aaltonen, L.A., Joensuu, H.: Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology*, 2000; 119:921-928

Herfarth, C., Heuschen, G., Heuschen, U.A.: Die maligne Entartung im Verlauf der Colitis ulcerosa und ihre chirurgischen Implikationen. *Chirurg*, 1998; 69:1020-1027

Herman, J.G., Umar, A., Polyak, K., Graff, F.R., Ahuja, N., Issa, J.P., Markowitz, S., Willson, J.K., Hamilton, S.R., Kinzler, K.W., Kane, M.F., Kolodner, R.D., Vogelstein, B., Kunkel, T.A., Baylin, S.B.: Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95 (12):6870-6875

Higuchi, R.: Rapid efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. *Amplifications. A forum for PCR users*, 1989 Issue 2. Perkin – Elmer – Cetus Corporation, 1-3

Hill, K.E., Lloyd, R.S., Yang, J.G., Read, R., Burk, R.F.: The cDNA for rat selenoprotein P contains 10 TGA codons in the open reading frame. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266:10050-10053

Hill, K.E., Lloyd, R.S., Burk, R.F.: Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3'-untranslated region of selenoprotein P mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90:537-541

Hill, K.E., Dasouki, M., Phillips, J.A., Burk, R.F.: Human selenoprotein P gene maps to 5q31. *Genomics*, 1996; 36:550-551

Hill, K.E., Xia, Y., Akesson, B., Boeglin, M.E., Burk, R.F.: SelenoproteinP concentration is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented chinese subjects. *J. Nutr.*, 1996; 126:138-145

Holmgren, N., Björnstedt, M.: Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.*, 1995; 252:199-208

Howe, J.R., Roth, S., Ringold, J.C., Summers, R.W., Jarvinen, H.J., Sistonen, P., Tomlinson, I.P.M., Houlston, R.S., Bevan, S., Mitros, F.A., Stone, E.M., Aaltonen, L.A.: Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science*, 1998; 280:1086-1088

Huang, W., Akesson, B., Svensson, B.G., Schütz, A., Burk, R.F., Skerfving, S.: SelenoproteinP and glutathione peroxidase (EC1.11.1.9) in plasma as indices of selenium status in relation to the intake of fish. *Brit. J. Nutr.*, 1995; 73:455-461

Huang, W., Koralewska-Makar, A., Bauer, B., Akesson, B.: Extracellular glutathione peroxidase and ascorbic acid in aqueous humor and serum of patients operated on for cataract. *Clin. Chim. Acta.*, 1997; 261:117-130

Imlay, J.A., Chin, S.M., Linn, S.: Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 1988; 240:640

Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D., Perucho, M.: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 1993; 10; 363(6429):558-561

Jackson, A.L., Chen, R., Loeb, L.A.: Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95:12468-12473

Jackson, A.L., Loeb, L.A.: The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.* 2001; 477(1-2):7-21.

Jacoby, R.F., Hohman, C., Marshall, D.J., Frich, T.J., Schlack, S., Broda, M., Smutko, J., Elliott, R.W.: Genetic analysis of colon cancer susceptibility in mice. *Genomics*, 1994; 22:381-387

Jacoby, R.F., Marshall, D.J., Kailas, S., Schlack, S., Harms, B. et al.: Genetic instability associated with adenoma-to-carcinoma progression in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology*, 1995; 109:73-82

Jakob, F. et al.: In: Selenoproteine im Knochen, Gastrointestinaltrakt und in der Schilddrüse des Menschen. *Med. Klin.*, 1997; 92 (3):24-26

Jansson, B.: Geographic mappings of colorectal cancer rates: a retrospect of studies 1974-1984. *Cancer Prevention and Detection*, 1985; 8:341-348

Jao, S.W., Shen, K.L., Lee, W., Ho, Y.S.: Effect of selenium on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal cancer in rats. *Dis. Colon Rectum*, 1996; 39:628-631

Jenne, D.E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Muller, D., Back, W., Zimmer, M.: Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nature Genet.*, 1998; 18(1):38-44

Joslyn, G., Carlson, M., Thliveris, A., Albertsen, H., Gelbert, L., Samowitz, W., Groden, J., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., Sargeant, L., Krapcho, K., Wolff, E., Burt, R., Hughes, J.P., Warrington, J., McPherson, J., Wasmuth, J., LePaslier, D., Abderrahim, H., Cohen, D., Leppert, M., White, R.: Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell*, 1991; 66(3):601-613

Jungck, M., Friedl, W., Propping, P.: Erblisch bedingte gastrointestinale Tumorerkrankungen. *Der Internist*, 1999; 40:502-512

Kelner, M.J., Bagnell, R.D., Montoya, M.A., Lanham, K.A.: Structural organization of the human gastrointestinal glutathione peroxidase (GPX2) promoter and 3'-nontranscribed region: transcriptional response to exogenous redox agents. *Gene*, 2000; 248:109-116

Keshavarian, A.: Increased levels of luminol-enhanced chemiluminescence by rectal mucosa of patients with colonic neoplasma. *Nutr. Cancer*, 1993; 2:201-205

Kingsley, P.D., Whitin, J.C., Cohen, H.J., Palis, J.: Developmental expression of extracellular glutathione peroxidase suggest antioxidant roles in deciduum, visceral yolk sac, and skin. *Mol. Reprod. Dev.*, 1998; 49:343-355

Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Su, L.K., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hedge, P., McKechnie, D., Finniear, R., Mrkham, A., Groffen, J., Bogushki, M.S., Altschul, S.F., Forri, A., Anod, H., Miyoshi, Y., Miki, Y., Nishisho, I., Nakamura, Y.: Identification of FAP locus genes on chromosome 5q21. *Science*, 1991; 253:661-665

Köhrle, J.: Selen- und Iodversorgung-Endokrinologische Zusammenhänge. In: Kruse-Jarres, J.D. (ed.): Mineralstoffe, Spurenelemente, Vitamine: Risikofaktoren-Meßverfahren-Präventivmaßnahmen. Kongreßband vom 7. Stuttgarter Mineralstoff-Symposium. Schönaich, Papierhaus Mack 1995; pp. 61-105

Knudson, A.G.J.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971; 68:820-823

Kryukov, G.V., Kryukov, V.M., Gladyshev, V.N.: New mammalian selenocysteine-containing proteins identified with an algorithm that searches for selenocysteine insertion sequence elements. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274:33888-33897

Kullmann, F., Bocker, T., Schölmerich, J., Rüschoff, J.: Mikrosatelliteninstabilität - ein neuer Aspekt in der Genetik und Molekularbiologie von HNPCC und sporadischen kolorektalen Tumoren. *Z. Gastroenterologie*, 1996; 34:813-822

Kune, G.A., Kune, S., Watson, L.F.: The role of heredity in the etiology of large bowel cancer: data from the Melbourne colorectal cancer study. *World J. Surg.*, 1989; 13(1):124-129

Langhoz, E., Munkholm, P., Davidsen, M., Binder, V.: Colorectal cancer risk and mortality in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 1992; 103:1444-1451

Leach, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., et al.: Mutations of a *nutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*, 1993; 75:1215-1225

Lee, B.J., Rajagopalan, M., Kim, Y.S., You, K.H., Jacobson, K.B., Hatfield, D.: Selenocysteine tRNA (Ser)^{Sec} gene is ubiquitous within the animal kingdom. *Mol. Cell. Biol.*, 1990; 10(5):1940-1949

Leinfelder, W., Zeherlein, E., Mandrand-Berthelot, M.A., Böck, A.: Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature*, 1988; 331:723

Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P., Krol, A.: Novel selenoproteins identified in silico and in vivo by using a conserved RNA structural motif. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274:38147-38154

Lettieri, T., Marra, G., Aquilina, G., Bignami, M., Crompton, N.F., Palombo, F., Jiricny, J.: Effect of hMSH6 cDNA expression on the phenotype of mismatch repair-deficient colon cancer cell line HCT15. *Carcinogenesis*, 1999; 20 (3):373-382

Lothe, R.A., Peltomaki, P., Meling, G.I., et al.: Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res.*, 1993

Low, S.C., Berry, M.J.: Knowing when not to stop: selenocysteine insertion in eucaryotes. *Trends Biol. Sci.*, 1996; 21:203-208

Lukish, J.R., Muro, K., DeNobile, J., et al.: Prognostic significance of DNA replication errors in young patients with colorectal cancer. *Ann. Surg.*, 1998; 227:51-56

Luschka, H.: Über polypöse Vegetationen der gesamten Dickdarmschleimhaut. *Arch. Pathol. Anat. Phys. Klin. Med.*, 1861; 20:133-142

Maiorino, M., Gregolin, C., Ursini, F.: Phospholipid glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, 1990; 186(47):448-457

Malins, D.C., Polissar, N.L., Gunselman, S.J.: Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to hydroxyl radical-induced DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93:2557-2563

Marchaluk, E., Persson-Moschos, M., Thorling, E.B., Akesson, B.: Variation in selenoprotein P concentration in serum from different european regions. *Europ. J. Clin. Nutr.*, 1995; 49:42-48

Marchesa, P., Lashner, B.A., et al.: The risk of cancer and dysplasia among ulcerative colitis patients with primary sclerosing cholangitis. *Am. J. Gastroenterol.*, 1997; 92(8):1285-1288

Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., et al.: Inactivation of the type 2 TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, 1995; 268:1336-1338

Marsh, D.J., Coulon, V., Lunetta, K.L., et al.: Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum. Mol. Genet.*, 1998; 7:507-515

Martin, G.W., Harney, J.W., Berry, N.J.: Selenocysteine incorporation in eukaryotes: Insights into mechanism and efficiency from sequence, structure, and spacing proximity studies of the type 1 deiodinase SECIS element. *RNA*, 1996; 2:171-182

Michaelis, L.: Zit. In: Chaudiere, J.: Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in living cells. In: Rice. Evans, C.A., Burdon, H. (eds.): *Free radicals damage and its control*. Elsevir, Amsterdam, 1994; 26-66

Mills, G.G.: Hemoglobin catabolism 1. Glutathione peroxidase, and erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.*, 1957; 229:189-197

Mills, G.G.: The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 1959; 234:502-506

Miyaki, M., Konishi, M., Tanaka, K., et al.: Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat. Genet.*, 1997; 17:271-272

Miyakura, Y., Sugano, K., Konishi, F., Ichikawa, A., Maekawa, M., Shitoh, K., Igarashi, S., Kotake, K., Koyama, Y: Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology*, 2001; 121(6):1300-9

Mörk, H., Lex, B., Scheurlen, M., Dreher, I., Schütze, N., Köhrle, J., Jakob, F.: Expression of gastrointestinal selenoproteins: targets for selenium supplementation. *Nutr. Cancer*, 1998; 32:64-70

Mörk, H., Al-Taie, O.H., Bähr, K., Zierer, A., Beck, C., Scheurlen, M., Jakob, F., Köhrle, J.: Nutrition and inverse mRNA expression of the selenocysteine-containing proteins GI-GPX and SeP in colorectal adenomas compared with adjacent normal mucosa. *Cancer*, 2000; 37(1):108-116

Mohr, D., Umeda, Y., Redgrave, T.G., Stocker, R.: Stocker Antioxidant defenses in rat intestine and mesenteric lymph. *Redox Reports*, 1999; 4:79-87

Morin, P.J., Sparks, A.B., Kounek, V., Barker, N., Clervers, H., Vogelstein, B., Kinzler, K.W.: The gatekeeper has many keys dissecting the function of the APC-gene. *Science*, 1997; 257:1787-1790

Motsenbocker, M.A., Tappel, A.L.: A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochem. Biophys. Acta*, 1982; 709:160-165

Mustacich, D., Powis, G.: Thioredoxin reductase. *Biochem. J.*, 2000; 15; 346 Pt 1:1-8

Muth, O.H., Weswig, P.H., Whanger, P., Oldfield, J.E.: Effect of feeding selenium deficient ration to the subhuman primate. *Americ. J. Res.*, 1971; 32:1603-1606

Nelson, R.L., Abcarian, H., Nelson, T.M., Misumi, A., Kako, H., Rizk, S., Sky-Peck, H.: The effect of dietary selenium deficiency on acute colorectal mucosal nucleotoxicity induced by several carcinogens in the rodent. *Am. J. Surg.*, 1996; 172:185-188

Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, N., et al.: Mutations of two PMS homologues in hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 1994; 371:75-80

Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horij, A., Koyama, K., Utsonomiya, J., Baba, S., Hedge, P., Markham, A., Krush, A.J., Peterson, G., Hamilton S.R., Nobert, M.C., Levy, D.B., Bryan, T.M., Preisinger, A.C., Smith, K.J., Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.: Mutations of chromosome 5q21 gene in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 1991; 253:665-669

Nuako, K.W., Ahlquist, D.A., Sanborn, W.J., Mahoney, D.W., Siems, D.M., Zinsmeister, A.R.: Primary sclerosing cholangitis and colorectal carcinoma in patients with ulcerative colitis: a case-control study. *Cancer*, 1998; 82(5):822-826

Offit, K.: Genetic prognostic markers for colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2000; 13; 342(2):124-5

Olschwang, S., Laurent-Puig, P., Groden, J., White, R., Thomas, G.: Germline mutations in the first 14 exons of the adenomatous polyposis coli (APC) gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 1993; 52(2):273-279

Olschwang, S., Serova-Sinilnikova, O.M., Lenoir, G.M., Thomas, G.: PTEN germline mutations in juvenile polyposis coli. *Nature Genet.*, 1998; 18:12-14

Parks, D.A., Bulkley, G.B., Granger, D.N.: Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery*, 1983; 94:415-422

Papadopolous, N., Nicolaidis, N.C., Wie, Y., Ruben, S.M., Carter, K.C., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Fleishmann, R.D., Fraser, C.M., Adams, M.D., Venter, J.C., Hamilton, S.R., Petersen, M., Watson, P., Lynch, H.A.T., Peltomaki, P., Mecklin, J.P., de la Chapelle, A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.: Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*, 1994; 262:1625-1629

Parsons, R., Myeroff, L.L., Liu, B. et al.: Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type 2 receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 1995; 55:5548-5550

Peltomaki, P., Aaltonen, L.A., Sistonen, P., et al.: Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*, 1993; 260:810-812

Percesepe, A., Benatti, P., Roncucci, L., et al.: Survival analysis in families affected by hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 1997; 71:373-376

Persson, P.G., Karlen, P., Bernell, O., et al.: Crohn`s disease and cancer : A population-based cohort study. *Gastroenterology*, 1994; 107(6):1675-1679 790

Persson-Moschos, M., Huang, W., Srikumar, T.S., Akesson, B.: SelenoproteinP in serum as a biomedical marker of selenium status. *Analyst*, 1995; 120:833-836

Perucho, M.: Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem.*, 1996; 377(11):675-84

Peskin, A.V.: Interaction of reactive oxygen species with DNA. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 1997; 62(12):1341-1347

Pinczowski, D., Ekblom, A., Baron, J., Yuen, J., Adami, H.O.: Risk factors for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis. A case-controlled study. *Gastroenterology*, 1994; 107:117-120

Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., et al.: Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, 1997; 275:967-969

Rayman, M.P.: The importance of selenium to human health. *The Lancett*, 2000; 356:233-241

Reddy, B.S., Upadhyaya, P., Simi, B., Rao, C.V.: Evaluation of organoselenium compounds for potential chemoprevention properties in colon carcinogenesis. *Anticancer Res.*, 1994; 14:2509-2514

Reddy, B.S., Rivenson, A., El Bayoumy, K., Upadhyaya, P., Pittman, B., Rao, C.V.: Chemoprevention of colon cancer by organoselenium compounds and impact of high- or low-fat diets. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1997; 98 (7):506-512

Reddy, K., Tappel, A.L.: Effect of dietary selenium and autoxidized lipids on the glutathione peroxidase system of gastrointestinal tract and other tissues in the rat. *J. Nutr.*, 1974; 104:1069-1078

Reiter, R.J.: Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging of brain. *FASEB J.*, 1995; 9:526-533

Rotruck, J.T.A., Pope, L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., et al.: Selenium: Biological role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 1973; 179:588-590

Roveri, A., Casasco, A., Maiorano, M., Dalan, P., Calligaro, A., Ursini, F.: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267:6142-6146

Roveri, A., Maiorino, M., Ursini, F.: Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, 1994; 233:202-212

Rozen, P., Fireman, Z., Figer, A., Legum, C., Ron, E., Lynch, H.T.: Family history of colorectal cancer as a marker of potential malignancy within a screening program. *Cancer*, 1987; 60(2):248-254

Russo, M.W., Murray, S.C., Wurzelmann, J.I., Woosley, J.T., Sandler, R.S.: Plasma selenium levels and the risk of colorectal adenomas. *Nutrition and Cancer*, 1997; 28 (2):125-129

Saiganik, R.I.: The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2001; 20 (5):464-472

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharft, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostabile DNA polymerase. *Science*, 1988; 239:487-491

Saito, Y., Hayashi T., Tanaka, A., Watanabe, Y., Suzuki, M., Saito. E., Takahashik, K.: Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274(5):2866-2871

Samowitz, W.S., Curtin, K., Lin, H.H., Robertson, M.A., Schaffer, D., Nichols, M., Gruenthal, K., Leppert, M.F., Slattery, M.L.: The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology*, 2001; 121(4):830-838

Sandergaard, J.O., Bulow, S., Lynge, E.: Cancer incidence among parents of patients with colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 1991; 47(2):202-206

Sanger, F., Nicklein, S., Coulson, A.R.: DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977; 74:5463-5467

Sankila, R., Aaltonen, L.A., Jarvinen, H.J., Mecklin, J.P.: Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer *Gastroenterology*, 1996; 110:682-687

Sattler, W., Maiorino, M., Stocker, R.: Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and ebselen (PZ51). *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994; 309:214-221

Schrauzer, G.N., White, E.A., Schneider, C.J.: Cancer mortality correlation studies 3: statistical associations with dietary selenium intakes. *Bioinorg. Chem.*, 1977; 7:23-34

Schrauzer, G.N.: Neuere Entwicklungen aus der Biologie, Biochemie und Medizin. Verlag für Medizin Heidelberg, 1983; 46-52

Schwarz, K., Folz, C.M.: Selenium as an integral part of factor 3 against dietary liver degeneration. *J. Am. Cham. Soc.*, 1957; 79:3292-3293

Sen, C.K., Packer, L.: Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.*, 1996; 10:709-720

Sies, H. (ed.): Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Academic Press, New York, 1991

Sies, H.: Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, 1993; 217:213-219

Sies, H.: Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, 1997; 82(2):291-295

Sies, H., Klotz, L.O., Sharov, V.S., Assmann, A., Briviba, K.: Protection against peroxynitrite by selenoproteins. *Z Naturforsch.*, 1999; 53 (3-4):228-232

Skilafoswske, N.W.: Polyadenoma tractus intestinalis. *Vrac.*, 1881; 2:55-57

Slattery, M.L., Schumacher, M.C., Smith, K.R., West, D.W., Abd-Elghany, N.: Physical activity, diet, and risk of colon cancer in Utah. *Am. J. Epidemiol.*, 1988; 128:989-99

Souza, R.F., Appel, R., Yin, J., et al.: Microsatellite instability in the insulin-like growth factor 2 receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat. Genet.*, 1996; 14:255-257

St. John, D.J., McDermott, F.T., Hopper, J.L., Depney, E.A., Johnson, W.R., Haghes, E.S.: Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. *Ann. Int. Med.*, 1993; 118(10):785-790

Statistisches Bundesamt, Statistisches Jahrbuch 1998 für die Bundesrepublik Deutschland, Stuttgart: Metzler Poeschel, 1999

Steinert, P., Ahrens, M., Gross, G., Flohé, L.: cDNA and deduced polypeptide sequence of a mouse seleoprotein P. *Biofactors*, 1997; 6:311-319

Stella, A., Lonoce, A., Resta, N., Gentile, M., Susca, F., Mareni, C., Brescia, G., Origoni, P., Montero, M.P., Guanti, G.: Familial adenomatous polyposis: identification of a new frameshift mutation of the APC gene in an Italian family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992; 184(3):1357-63

Soullier, B.K., Wilson, P.S., Nigro, N.D.: Effect of selenium on azoxymethane-induced intestinal cancer in rats fed high fat diet. *Cancer Lett.*, 1981; 12(4):343-8.

Sunde, R.A.: Intracellular glutathione peroxidases - structure, regulation, and function. In: Burk, R.F. (ed.): *Selenium in Biology and Human Health*, 1994; Springer-Verlag, New York; 45-77

Sunde, R.A.: Selenium: In: O'Dell, B.L., Sunde, R.A. (eds.): *Handbook of nutritionally essential mineral elements*. New York: Marcel Dekker Inc., 1997; 493-556

Takahashi, K., Avissar, N., Within, J., Cohen, H.: Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987; 256:677-686

Tamura, T., Stadtman, T.C.: A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93:1006-1011

Thibodeau, S.N., Bren, G., Schaid, D.: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, 1993; 260(5109):816-819

Tomlinson, I.P.M., Houston, R.S.: Peutz-Jeghers Syndrom. *J. Med. Genet.*, 1997; 34:1001-1007

Ueda, Y., Matsumoto, K., Endo, K: Evidence of hepatic endogenous hydrogen peroxide in bile of selenium-deficient rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 271 (3):699-702

Ursini, F., Maiorano, M., Gregolin, C.: The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1985.; 839:62-70

Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohé, L.: Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.*, 1995; 252:38-53

Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., Flohé, L.: Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, 1999; submitted

Varesco, L., Gismondi, V., James, R., Robertson, M., Grammatico, P., Groden, J., Casarino, L., De Benedetti, L., Bafico, A., Bertario, L., et al.: Identification of APC gene mutations in Italian adenomatous polyposis coli patients by PCR-SSCP analysis. *Am. J. Hum. Genet.*, 1993; 52(2):280-5

Vinceti, M., Guidetti, D., Pinotti, M., Rovesti, S., Merlin, N., Vasovi, L., Bergomi, M., Vivoli, G.: Amyotrophic lateral sclerosis after long-term exposure to drinking water with high selenium content. *Epidemiology*, 1996; 7(5):529-532

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., et al.: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N. Engl. J. Med.*, 1988; 319:525-532

Vogelstein, B., Kinzler, K.W.: The multistep nature of cancer. *Trends. Genet.*, 1993; 9:138-141

Walczak, R., Westhof, E., Carbon, P., Krol, A.: A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNA's. *RNA* 2, 1996; 367-379

Warthin, A.S.: Heredity with reference to carcinoma. *Arch. Intern. Med.*, 1913; 12:546-555

Watson, P., Lin, K.M., Rodriguez-Bigas, M.A., et al.: Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members. *Cancer*, 1998; 83:259-266

Weitenberg, A.B., Weitzman, S.A., Destrempe, M., Latt, S.A., Stossel, T.P.: Stimulated human phagocytes produce cytogenic changes in cultured mammalian cells. *N. Engl. J. Med.*, 1983; 308:26

Weitzel, F., Ursini, F., Wendel, A.: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochem. Biophys. Acta*, 1990; 1036:88-94

Weitzman, S.A., Stossel, T.P.: Mutation caused by human phagocytes. *Science*, 1981; 212:546

Weitzman, S.A., Gordon, L.I.: Inflammation and cancer: Role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood*, 1990; 76:655-663

Wingler, K., Böcher, M., Flohé, L., Kollmus, H., Brigelius-Flohé, R.: mRNA stability and selenocystein insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur. J. Biochem.*, 1999; 259:149-157

Wingler, K., Müller, C., Schmehl, K., Florian, S., Brigelius-Flohé, R.: Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology*, 2000; 119:420-430

Winnefeld, K.: Selen, Antioxidanzienstatus und Radikale/reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin. In: *Medizinische Klinik*, 1997; Suppl. 3; 92. Jahrgang; Text 3

Winther, J.F., Dreyer, L., Overad, K., Tjonneland, A., Gerhardsson de Verdier, M.: Avoidable cancers in the Nordic countries. Diet, obesity and low physical activity. *APMIS Suppl.*, 1997; 76:100-119

Wolfram, S.: Mechanismen der intestinalen Absorption von Selen. *Med. Klinik*, 1995; 90 (Suppl.): 1-5

Wright, C.M., Dent, O.F., Barker, M., et al.: Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br. J. Surg.*, 2000; 87:1197-1202

Yan, L., Yee, J.A., Li, D., McGuire, M.H., Graef, G.L.: Dietary supplementation of selenomethionine reduces metastasis of melanoma cells in mice. *Anticancer Res.*, 1999; 19(2A):1337-42

Yang, G., Yin, S., Zhou, R., Gu, L., Yan, B., Liu, Y., Liu, Y.: Studies of safe maximal dietary Se-intake in a seleniferous area in China. Part 2: Relation between Se-intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.*, 1989 3(3):123-130

Yoshimura, S., Watanabe, K., Suemizu, H., Onozawa, T., Mizoguchi, J., Tsuda, K., Katta, H., Moriuchi, T.: Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in tar kidney. *J. Biochem.*, 1991; 109:918-923

Yoshimura, A., Suemizu, J., Taniguchi, Y., Arimori, K., Kawabe, N., Moriuchi, T.: The human plasma glutathione peroxidase-encoding gene: organization, sequence and localization to chromosome 5q32. *Gene*, 1994; 145:293-297

Yu, S., Chu, Y., Ging, X., Hou, C: Regional variation of cancer mortality incidence and its relation to selenium levels in China. *Biological Trace Elements Research*, 1985; 7:21-29

Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T.C., Böck, A.: Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986; 83:4650-4654

Danksagung

Mein Dank gilt...

Herrn Prof. Franz Jakob für die freundliche Überlassung des Themas und die Supervision,

Herrn Prof. Michael Scheurlen für die Übernahme des Zweitgutachtens,

Herrn Dr. Oliver Al-Taie für die geduldige und konstruktive Betreuung der Arbeit,

Herrn Drs. Andreas Thalheimer und Tiemo Katzenberger aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg für die Bereitstellung und histopathologische Begutachtung der untersuchten Paraffin- und Kryogewebe,

Herrn Prof. Volker Mostert aus dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene der Universität Düsseldorf für die Überlassung von Normal- und Tumorblutproben,

Frau Dr. Katrin Köhler für die Durchführung der Northern-blots,

den MTAs Alexandra Fleder und Patrizia Seeberger für ihre unermüdliche Hilfe bei der Etablierung und Durchführung der zahlreichen Untersuchungen und Methoden,

Frau Ursula Eußner für die Zusammenarbeit bei der Etablierung der Methoden und der Materialasservierung

den vielen „namenlosen“ Blutspendern, die als gesunde Probanden und Kolonkarzinompatienten (Medizinische Poliklinik der Universität Würzburg und Medizinisches Institut für Umwelthygiene der Universität Düsseldorf) zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben,

den Mitarbeitern des Hormonlabors und der Klinischen Forschergruppe der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg für allen Rat und alle Tat,

sowie meiner Familie für ihre unendliche Geduld und Unterstützung...

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nurcan Üçeyler
Geburtsdatum: 30. August 1976
Geburtsort: Schweinfurt
Familienstand: ledig
Eltern: Sebahaddin Üçeyler
Fatma Üçeyler, geb. Atalay
Geschwister: Vedat Üçeyler geb. 28. Juli 1971
Wohnhaft: Gutenbergstr. 13, 97080 Würzburg

Schulbildung:

September 1983 – Juli 1986: Friedrich-Rückert-Grundschule Schweinfurt
September 1986 – Juli 1996: Olympia-Morata-Gymnasium Schweinfurt
Abitur in den Fächern Mathematik und Latein am 28. Juli 1996

Hochschulausbildung

WS 1996-SS 2002: Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg

Physikum: 28.07.1998

1. Staatsexamen: 31.08.1999

2. Staatsexamen: 05.09.2001

3. Staatsexamen: 20.11.2002

seit 01.01.2003: Ärztin im Praktikum an der Neurologischen Universitätsklinik in Würzburg

Nurcan Üçeyler