

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom ist in den westlichen Industrieländern eine der häufigsten Krebserkrankungen. In der Bundesrepublik Deutschland ist es bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Krebstodesursache. Jährlich erkranken hierzulande rund 51 000 Personen, davon 22 800 Männer und 27 700 Frauen. Das Risiko einer kolorektalen Tumorerkrankung steigt deutlich mit dem Alter. Der Häufigkeitsgipfel liegt im 7. und 8. Lebensjahrzehnt. Im Mittel erkranken Männer mit 68 Jahren und Frauen mit 73 Jahren (Krebsatlas Deutschland 2001).

Etwa ein Drittel aller Krebserkrankungen gehen in Deutschland vom Kolon und Rektum aus. Die überwiegende Zahl tritt sporadisch auf. In 20% findet sich eine Familienanamnese hinsichtlich bösartiger Tumorerkrankungen, davon können 5-10 % der kolorektalen Karzinome einer bekannten hereditären Disposition zugeordnet werden. (Aalton et al., 1998; Lynch et al., 1996; Mecklin et al., 1995; Ponz de Leon, 1994; Westlake 1991). Es handelt sich bei den genetisch bedingten bösartigen Tumoren des Kolorektums in der Mehrzahl um das HNPCC (URL OMIM HNPCC 1-7; hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom oder Lynch-Syndrom). Charakteristisch für das HNPCC ist ein relativ junges Erstmanifestationsalter mit durchschnittlich <50 Jahren (Parc et al., 2003; Vasen et al., 1993; Watson et al., 1993). Das FAP-Syndrom (familiäre adenomatöse Polyposis) ist bei etwa 1% aller kolorektalen Karzinom-erkrankungen zu finden (Bisgaard et al., 1994; Järvinen et al., 1992). Deutlich seltener sind die hamartomatösen Polyposissyndrome.

1.2 Ätiologie des kolorektalen Karzinoms

Die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms ist multifaktoriell. Für 90% der kolorektalen Karzinome werden Umwelteinflüsse, wie Ernährung und Bewegung verantwortlich

gemacht. Bei den hereditären Dispositionen können Einflüsse aus der Umwelt das Risiko zu erkranken potenzieren (Fernandez et al., 2004; Senesse et al., 2002).

Ein deutlicher protektiver Effekt scheint mit einem häufigen Konsum von Früchten und Gemüse verbunden. Von 20 Fall-Kontroll-Studien (Übersicht in Steinmetz et al., 1996) zeigte die Mehrheit eine inverse Korrelation zwischen dem Verzehr von Obst und Gemüse und dem Risiko, an kolorektalen Karzinom zu erkranken. Auch die postmenopausale Hormonsubstitution sowie die Einnahme oraler Kontrazeptiva werden als mögliche protektive Faktoren diskutiert (Calle et al., 1995; Fernandez et al., 1996; Newcomb und Storer 1995). Außerdem soll die physische Aktivität bei der Entstehung der Tumoren eine Rolle spielen. So wurde in mehreren Studien ein erhöhtes Darmkrebsrisiko bei Menschen in Berufen mit vorwiegend sitzenden Tätigkeiten beobachtet (Gerhards-son De Verdier et al., 1990; Whittemore et al., 1990).

1.3 Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

Kolorektale Karzinome entwickeln sich über verschiedene histologische Stadien. Es wird heute davon ausgegangen, daß die meisten kolorektalen Karzinome aus einem Adenom hervorgehen (Adenom-Karzinom-Sequenz).

Die Entwicklung zum Karzinom kann durch Chromosomen- oder Mikrosatelliteninstabilität hervorgerufen werden. Chromosomeninstabilität findet sich bei 70-80% der Tumoren und ist charakterisiert durch Aneuploidie, vielfache chromosomale Rearrangements und eine Akkumulation somatischer Mutationen in Onkogenen wie K-ras und Tumorsuppressorgenen wie TP53 und APC (adenomatous polyposis coli) (Lengauer et al., 1997). 15% der Tumoren zeigen Mikrosatelliteninstabilität und sind gekennzeichnet durch Diploidie, zwei oder mehr Subklone und einem defekten Fehlpaarungsreparaturmechanismus (Young et al., 2001).

Patienten mit Defekten im Fehlpaarungsreparatursystem zeigen Adenome, welche schon zu einem frühen Zeitpunkt einen hohen Grad an Dysplasien aufweisen. Die Entwicklung vom Adenom zum Karzinom vollzieht sich bei den hereditären in wesentlich kürzerer Zeit als bei den sporadischen Tumoren (Mecklin et al., 1986 (2); Vasen et al.

1995). Maligne Entartungen mit defektem Fehlpaarungsreparatursystem entwickeln sich weniger durch Mutationen des TP53-, APC- und K-ras-Gens, wie die chromosomeninstabilen Tumoren, als durch Mutationen des TGF β R2- und des CTNNB1-Gens (Sallahshor et al., 1999). Diese Erkenntnisse unterstützen die Vorstellung, daß chromosomen- und mikrosatelliteninstabile Tumoren über verschiedene genetische Entwicklungswege entstehen.

1.4 Morphologisches Spektrum des kolorektalen Karzinoms

Das Adenokarzinom ist mit 80-85% der häufigste maligne Tumor des Kolons, in 10-15% der Fälle findet man das muzinöse Adenokarzinom, Siegelringzellkarzinome und undifferenzierte Karzinome sind mit 2-3% eher selten.

Beim HNPCC-Syndrom gibt es histomorphologisch keine beweisenden Charakteristika. Viele Tumoren lassen jedoch typische Merkmale erkennen. Häufig sind diese Tumoren schleimbildend, bzw. etwas seltener zeigen sie Siegelringzellen. Bei den nichtmuzinösen Tumoren ist histopathologisch in der Regel eine intratumorale bzw. peritumorale lymphozytäre Entzündungsreaktion erkennbar. Das HNPCC wächst überwiegend verdrängend und hat seltener lymphogene und hämatogene Metastasen (Alexander et al., 2001; Kim et al., 1994; Mecklin et al., 1986 (2)).

1.5 Familiäre Dispositionen kolorektaler Krebserkrankungen

5-10% der hereditären kolorektalen Karzinome lassen sich heute einer genetischen Ursache zuordnen. Den in der Tabelle 1 genannten Krankheitsbildern liegt ein autosomal-dominanter Erbgang zugrunde. Eine familiäre Häufung und ein frühes Erkrankungsalter sind charakteristisch. Knudson postulierte 1971 die 2-Treffer-Hypothese der Karzinogenese, welche eine Erklärung für das erhöhte Tumorrisiko und das frühe Manifestationsalter liefert. Alle autosomal codierenden Gene sind in zwei Kopien vorhanden.

Ein intaktes Allel ist ausreichend, um die normale Funktion der Zelle zu gewährleisten. Erst die Inaktivierung des zweiten Allels führt zum Ausfall der Genfunktion und zur Tumorentstehung. Träger einer Keimbahnmutation in einem Tumorsuppressor-Gen haben damit ein deutlich erhöhtes Risiko für Tumorerkrankungen.

Tab. 1: Autosomal-dominant vererbare gastrointestinale Tumordispositionserkrankungen

Erkrankung	Definition	Lokalisation	Gen Map OMIM
a) Adenomatöse Polyperkrankungen			
Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP)	> 100 kolorektale Adenome	APC, Chr.5q	5q21-q22
Allelische Varianten:			
Gardner-Syndrom (heute FAP)	> 100 kolorektale Adenome + Osteome + Epidermoidzysten / kutane Fibrome	APC (allelisch zu FAP)	5q21-q22
Attenuierte FAP (AAPC; Hereditary flat adenoma Syndrom)	5-100 Adenome, späterer Beginn des Polypenwachstums	APC (allelisch zu FAP)	5q21-q22
Turcot-Syndrom a) Untergruppe FAP b) Untergruppe HNPCC	adenomatöse Polypen + Hirntumor	a) APC b) DNA-Reparaturgene	7p22; 5q21-q22; 3p21.3
HNPCC 1-7 (Lynch-Syndrom)	multiple syn- oder metachrone CRC u. andere Tumoren familiär gehäuft	DNA-Reparaturgene	2p22-p21; 3p21.3; 2q31-q33; 7p22; 2p16; 3p22; 14q24.3
Muir-Torre-Syndrom	CRC, Talgdrüsentumor + viszeraler Tumor	DNA-Reparaturgene	2p22-p21; 3p21.3

b) Hamartomatöse Polyposen			
Peutz-Jeghers-Syndrom	mind. 2 hamartomatöse Polypen vom Peutz-Jeghers-Typ o. 1 Peutz-Jeghers-Polyp + Hyperpigmentierung der Mundschleimhaut o. 1 Peutz-Jeghers-Polyp bei positiver Familienanamnese	STK11 / LBK 1, Chr.19p	19p13.3
Familiäre Juvenile Polyposis	mind. 5 „juvenile Polypen“ oder 1 „juвениler Polyp“ bei positiver Familienanamnese	MADH4 (auch SMAD4 / DPC genannt), Chr.18q	18q21.1; 10q22.3
Cowden-Syndrom	multiple Hamartome in vielen Geweben, einschließlich Darm	PTEN / MMAC1, Chr. 10q	10q23.31; 10q22.3
Allelische Varianten:			
Bannayan-Zonana-Syndrom (Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndrom)	Makrozephalie + subkutane u. viszerale Lipome und Hämangiome	PTEN	10q23.31
Lhermitte-Duclos-Syndrom	Hamartome der Gliazellen im Cerebellum		10q23.31; 10q22.3
„Hereditary mixed polyposis Syndrom“	hamartöse Polypen (ähnlich, aber nicht identisch mit juvenilen Polypen), Adenome, entzündliche Polypen und Karzinome im Kolon		15q15.3-q22.1

1.5.1 Kolorektale Karzinome mit Fehlpaarungsreparaturdefekten

Etwa 5% der malignen Entartungen im Kolon und Rektum gehören in den westlichen Industrieländern zur Gruppe der HNPCCs. Das HNPCC ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung (Bailey-Wilson et al., 1986). Dabei handelt es sich um eine genetische Disposition. Diese kann zu Kolon-, Dünndarm-, Magen-, Ovar-, Harnblasen- und Endometriumkarzinomen führen, wobei das kolorektale Karzinom am häufigsten auftritt. Die Diagnose eines HNPCCs beruht auf der Erfüllung der Amsterdam-Kriterien I und II (Vasen et al., 1999). Diesem Syndrom liegen Keimbahnmutationen in einem der DNA-Mismatch-Reparatur-Gene (MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, MSH6, TGF β R2, MLH3) zugrunde (Akiyama et al., 1997; Bronner et al., 1994; Fishel et al., 1993; Leach et al., 1993; Lipkin et al., 2000; Markowitz et al., 1995; Nicolaidis et al., 1994; Papadopoulos et al., 1994; Wijnen et al., 1999). Die Gene kodieren für Proteine, welche Basenfehlpaarungen korrigieren, wie sie bei der DNA-Replikation im Zellzyklus entstehen. Bei Proteindefekten treten häufig in den Mikrosatelliten Replikationsfehler auf. Mikrosatelliten sind repetitive, phylogenetisch konservierte Mono-, Di-, Tri- oder Tetranukleotidsequenzen, die über das ganze Genom verteilt vorkommen und sich zwischen 10- und 60-mal wiederholen können (Hearne et al., 1992; Litt et al., 1989; Weber et al., 1989). Fällt das DNA-Mismatch-Reparatur-System aus, kommt es zur Anhäufung von Mutationen besonders im Bereich der Mikrosatelliten, und es entsteht eine Instabilität (Aaltonen et al., 1993; Ionov et al., 1993; Thibodeau et al., 1993; Weber et al., 1993). Sind dabei Proto-Onkogene oder Tumorsuppressor-Gene betroffen, kann es zur malignen Entartung der Zelle kommen.

Mikrosatelliteninstabilität ist nicht nur beim HNPCC-Syndrom zu finden. Verschiedene Studien zeigen, daß Mikrosatelliteninstabilität auch bei 10-15% der sporadischen kolorektalen Karzinome auftritt (Aaltonen et al., 1993, 1994; Kim et al., 1994; Konishi et al., 1996; Lothe et al., 1993; Samowitz et al., 1995; Senba et al., 1998).

1.6 Wnt-Signalweg und kolorektale Karzinome

Der Wnt-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von bösartigen Tumorerkrankungen. Mehr als 80% der kolorektalen Karzinome zeigen Mutationen bei Komponenten dieses Signalweges. Zu den regulierenden Genen, bei denen Mutationen in malignen Geweben gefunden wurden, zählen das CTNNB1-, APC- und das Axin-Gen. Veränderungen in den korrespondierenden Proteinen resultieren in einer Akkumulation von unphosphoryliertem β -Catenin in der Zelle. Dies führt zur Expression von Onkogenen wie c-myc und cyclin D1 und somit zur Entstehung maligner Tumoren (He et al., 1998; Shtutman et al., 1999; Tetsu et al., 1999).

1.7 Das CTNNB1-Genprodukt (β -Catenin) im Wnt-Signalweg

β -Catenin wurde 1989 zum ersten Mal in der Funktion als Zell-Zell-Adhäsionsprotein im Komplex mit E-Cadherin und Plakoglobin (γ -Catenin) erwähnt (Nagafuchi et al., 1989; Ozawa et al., 1989). Die Entdeckung der Homologie des β -Catenin-Gens und dem Drosophila-Gen Armadillo, welches eine Rolle in der Segment-Polarisation spielt, deutete auf eine weitere Funktion in der Signalübertragung zur Genexpression hin.

1996 wurde die komplette Struktur des auf Chromosom 3p21 lokalisierten CTNNB1-Gens beschrieben (Nollet et al., 1996; Norris et al., 1996). Das Genprodukt β -Catenin ist ein 92 kDa Protein. Es besteht aus ca. 130 Aminosäuren in der aminoterminalen Domäne, 12 sich wiederholenden Sequenzen von je 42 Aminosäuren („armadillo repeats“) und einer ca. 100 Aminosäuren langen carboxyterminalen Domäne.

β -Catenin ist innerhalb des Wnt-Signalweges von zentraler Bedeutung. Die Regulation der Konzentration des freien zytoplasmatischen Proteins spielt eine Rolle bei der Übertragung der WNT-Signale. Die Glykoproteine der Wnt-Protein-Familie aktivieren die Signalkette über die Frizzled Rezeptoren (Bhanot et al., 1996; Wang et al., 1996). Diese sind charakterisiert durch ein Signal-Peptid am N-Terminus, gefolgt von einer cysteinreichen Ligandenbindungsdomäne und einem hydrophilen Linker, denen sich sieben

transmembranale Regionen und ein cytoplasmatischer Abschnitt anschließen (Vinson et al., 1989).

Weitergeleitet wird das Signal über das zytoplasmatische Protein Dishevelled (dvl) (Krasnow et al., 1995; Noordermeer et al., 1994; Semenov and Snyder, 1997; Theisen et al., 1994). Durch Assoziation des dvl-Proteins an einen Multi-Protein-Komplex, der aus Axin1, APC, Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) und β -Catenin besteht, wird die Serin/Threonin-Kinaseaktivität des GSK-3 β -Proteins inhibiert (Behrens et al., 1998; Cook et al., 1996; Kishida et al., 1999; Satoh et al., 2000; Siegfried et al., 1992, 1994). Dadurch kann der zentrale Baustein dieser Signalkette, das freie zytoplasmatische β -Catenin, nicht phosphoryliert werden (Peifer et al., 1994). Das durch Wnt-Signale stabilisierte β -Catenin reichert sich im Zytoplasma an, wo es mit Proteinen der Lymphoid enhancer factor 1 / T cell factor-Familie 4 (LEF1 / TCF4) eine Verbindung eingeht. Der LEF1 bzw. TCF4 / β -Catenin Protein-Komplex tritt in den Nukleus ein und aktiviert die Transkription der Wnt-Zielgene mit LEF1 / TCF4 als DNA-bindende Proteine und β -Catenin als Transaktivator (Behrens et al., 1996; Korinek et al., 1997; Van de Wetering, 1997). Zu den Zielgenen von β -Catenin und dem LEF1 / TCF4 Komplex gehören c-myc, cyclin und matrilysin D1 (He et al., 1998; Shtutman et al., 1999; Tetsu et al., 1999).

In nicht stimulierten Zellen sorgt der Multiproteinkomplex für die Phosphorylierung des β -Catenins (Rubinfeld et al., 1996; Ikeda et al., 1998). Das Protein SCF β -TrCP kann nun an das phosphorylierte β -Catenin binden und es ubiquitinylieren. Ubiquitinierte Proteine werden von Proteosomen, einem hochmolekularen Proteasekomplex, abgebaut (Aberle et al., 1997).

APC scheint eine entscheidende Komponente des Regulationsmechanismus zu sein, da Mutationen im APC mit hohen β -Catenin-Konzentrationen korrelieren. Dies wurde an Darmkrebszellen gezeigt, die ein mutiertes APC-Protein exprimieren. Die hohen zytosolischen Werte von β -Catenin können durch Hinzufügen von Wildtyp APC reduziert werden (Korinek et al., 1997; Munemitsu et al., 1995). Man nimmt an, daß durch die Phosphorylierung des APC-Proteins an der β -Catenin-bindenden Region durch GSK-3 β die Interaktion zwischen den beiden Proteinen reguliert wird (Munemitsu et al., 1996; Rubinfeld et al., 1996). GSK-3 β phosphoryliert außerdem spezifische Serine und Threonine im N-Terminus von β -Catenin. Es wird davon ausgegangen, daß eine Pri-

mingkinase für S45 nötig ist, um die Phosphorylierung von S33, S37 und T41 durch GSK-3 β einzuleiten. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch nicht klar, ob S45 des β -Catenins in Abhängigkeit von GSK-3 β durch die Primingkinase phosphoryliert wird (Amit et al., 2002; Cohen und Frame, 2001; Ding et al., 2000; Harwood, 2001).

Der Casein-Kinase I (CKI) werden verschiedene Funktionen zugeschrieben, unter anderem die der Priming-Kinase (Amit et al., 2002; Liu et al., 2002). Aus den gegenwärtig vorliegenden Arbeiten ist nicht ersichtlich, welcher Subtyp letztendlich für die Initiierung der Phosphorylierung verantwortlich ist.

Untersuchungen mit *Drosophila melanogaster* waren wegweisend bei den Entdeckungen der Signaltransduktionskaskade. Homologe Proteine haben zum Teil andere Namen (GSK-3 β = Zeste White 3; β -Catenin = Armadillo; Wnt = Winless).

Der Stand der heutigen Untersuchungen ist, daß die Wnt-Signale über die Konzentration des zytosolischen β -Catenins reguliert werden. Wie oben beschrieben, wird bei Aktivierung der Signalkaskade durch Wnt-Proteine der Destruktionskomplex inhibiert, und β -Catenin überträgt im Komplex mit TCF1/LEF4 das Wnt-Signal in den Zellkern. Bei Abwesenheit des Wnt-Signals wird β -Catenin ständig zum Abbau durch die Phosphorylierung mittels des Multiproteinkomplexes markiert.

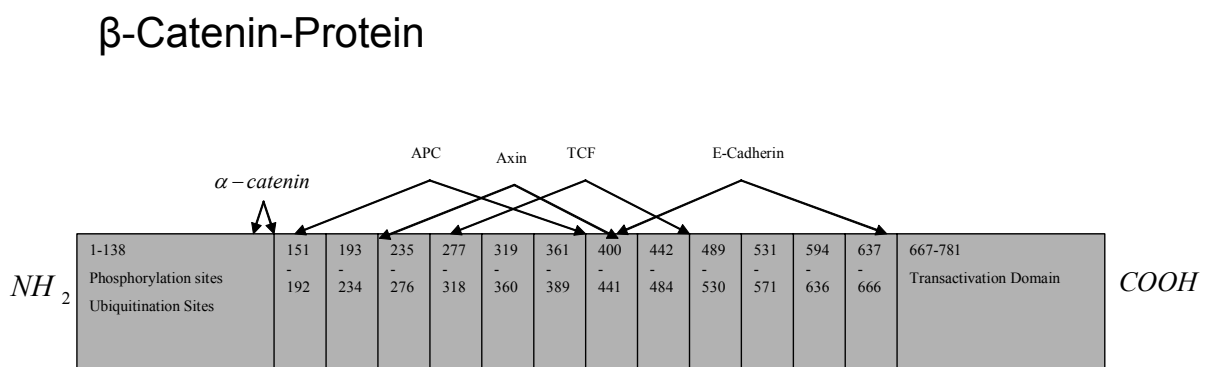


Abb. 1: Schematische Darstellung des β -Catenin-Proteins

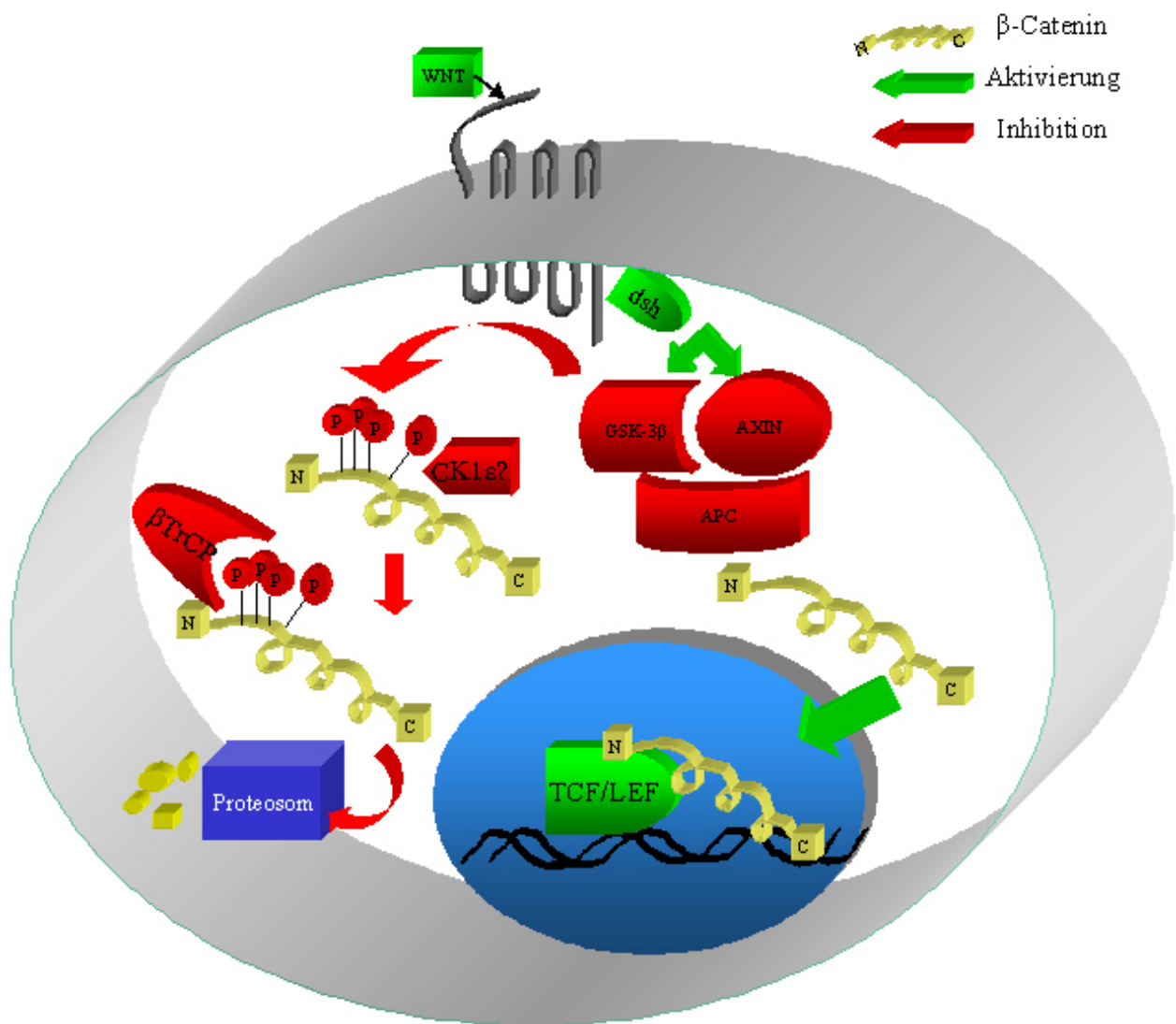


Abb. 2: Schematische Darstellung des Wnt-Signalweges in einer Zelle

2 Fragestellung

Bei mehr als 50% der kolorektalen Karzinome werden Mutationen im CTNNB1-Gen beschrieben. Während Tumoren mit APC-Mutationen im Verlauf der Progression vielfach auch TP53-Mutationen akkumulieren, sind bei kolorektalen Karzinomen mit defekter DNA-Fehlpaarungsreparatur statt APC und TP53 andere Gene alteriert. Es gibt Hinweise darauf, daß das CTNNB1-Gen eines der Zielgene einer gestörten DNA-Fehlpaarungsreparatur sein könnte (Kitaeva et al., 1997; Morin et al., 1997).

Bei immunhistochemischen Untersuchungen zum β -Catenin mit dem Antikörper 14 an verschiedenen soliden Tumoren wurde eine Reduktion des membranösen β -Catenins mit Nachweis einer zytoplasmatischen und nukleären β -Catenin-Expression beschrieben (Hao et al., 2002).

Diese Studie hatte zum Ziel, Unterschiede bei Fehlpaarungsreparatur-suffizienten (FRS) und -insuffizienten (FRI) kolorektalen Tumoren mit Blick auf epidemiologische und morphologische Eigenschaften sowie das β -Catenin-Expressionsverhalten zu analysieren.

Dabei stellten sich folgende Fragen:

1. Gibt es Unterschiede im Expressionsverhalten des β -Catenin-Antikörpers 14 mit der enzymmarkierten Streptavidin-Biotin-Methode und der fluorochromkonjugierten indirekten Methode?
2. Gibt es unterschiedliche Färbemuster der β -Catenin-Antikörper im gesunden kolorektalen Epithel?
3. Unterscheiden sich die hereditären und sporadischen FRS- und FRI-Tumoren hinsichtlich ihrer epidemiologischen und pathologischen Merkmale?
4. Zeigen die hereditären und sporadischen FRI- und FRS-Tumoren unterschiedliche β -Catenin-Expressionsmuster?
5. Gibt es β -Catenin-spezifische Expressionsmuster in kolorektalen Karzinomen?
6. Wie verhalten sich die Expressionsmuster in Primärtumoren zu denen in Lymphknotenmetastasen (LknMx)?