

Genetische Diagnostik hereditärer Kolonkarzinome

Genetic Diagnostics for Hereditary Colon Cancer

B. H. Brandt

Zusammenfassung: Polyposis und chronisch inflammatorische Darmerkrankungen, die bereits im Alter von 2 bis 5 Jahren beginnen können, prädisponieren für kolorektale Karzinome in der 4. und 5. Lebensdekade. Bei der Polyposis wird eine Mutation in dem Tumorsuppressorgen (TSG) APC (adenomatous polyposis coli gene) in der Lymphozyten-DNA gefunden. Bei der ulcerativen Kolitis tritt meistens eine Mutation im TSG p53 als erster Hinweis auf die Krebsentstehung auf. Das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC), das 5 % aller kolorektalen Karzinome umfasst, wird durch die Inaktivierung in DNA-Reparaturgenen (MMR) hervorgerufen, welche durch eine Instabilität von polymorphen einfachen repetitiven Sequenzen in der DNA nachweisbar ist. Zur Karzinomentstehung müssen zu den Keimbahnmutationen weitere Mutationen in Genen wie ras, DCC, MCC und p53 hinzukommen. Es wurden Labormethoden etabliert, die den Nachweis von Mutationen in TSG und MMR ermöglichen. Man muss dabei die direkte Bestimmung einer Mutation mittels Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotiden von indirekten Methoden wie dem Protein Truncation Assay oder der denaturierenden HPLC unterscheiden. Positive Ergebnisse mit den indirekten Methoden müssen stets durch Sequenzierung bestätigt werden. Alle Methoden sind auf Lymphozyten-DNA und DNA aus Gewebe von Polypen, Adenomen und Karzinomen anwendbar. Patienten mit einer nachgewiesenen Mutation in TSG oder MMR tragen ein hohes Karzinomrisiko, sollten engmaschig kontrolliert werden und eine konsequente Behandlung der Primärerkrankung ist notwendig. Bei Patienten mit einer APC-Mutation wird eine große Variabilität der Zeitspanne bis zum Ausbruch des Karzinoms beobachtet. Aufgrund von Ergebnissen an Mausmodellen, die eine Mutation im APC-analogen Gen der Maus tragen, kann man auf die Existenz von Tumor-modifier Genen auch beim Menschen schließen, die mit den TSG und

MMR kooperieren. Über sie könnte in Zukunft eine individuellere Bestimmung des Karzinomrisikos und auch der Progredienz von bestehenden Karzinomen möglich werden.

Schlüsselwörter: Familiäre kolorektale Karzinome; Tumorsuppressorgene; DNA-Reparaturgene; Tumor-modifier Gene; Mikrosatellitenanalyse; direkte Sequenzierung.

Summary: Polyposis and chronic inflammatory large bowel diseases with its earliest onset at age 2 to 5 are prone for cancer development in the thirties or forties. In polyposis, one allele of the tumor-suppressor gene (TSG) adenomatous polyposis coli gene (APC) is already inactivated in the germ line, whereas in ulcerative colitis the p53 TSG is affected in the inflammatory tissue. Hereditary non-polyposis colorectal cancer, comprising 5 % of all cancer cases, is caused by mutations in mismatch repair genes (MMR) which is detectable by a genetic instability of simple sequence polymorphic DNA stretches. Subsequent mutations have to follow accidentally to develop the complete malignant phenotype: ras, DCC (deleted in colon cancer, Chr. 18q), MCC (mutated in colon cancer, Chr. 5q), and p53 mutations are required for full malignant transformation. Laboratory methods have been established to determine the TSG and MMR mutations. Using direct sequencing methods such as the dideoxy-nucleotides and indirect methods such as the protein truncation assay or denaturing HPLC most of the mutations are detectable. The methods are applicable to DNA from lymphocytes, tissue from polyps, adenomas, and cancer. Patients indicated to harbor TSG or MMR mutations are at high risk, and as a consequence, short-term follow-up and, if detectable, consequent treatment of the primary disease is necessary. In respect to individuals inheriting an APC mutation predisposing to colorectal cancer different outcomes are observed, ranging from early aggressive cancer to disease-free survival. This might be explained by the cooperation of TSGs and MMRs with tumor-modifier genes. Tumor-modifier genes were identified from investigations of the genetic background effects on phenotypic expression in mice carrying a point mutation in the mouse equivalent of the APC gene (APC-MIN) and could provide us with genetic markers with which individuals could be tested for disease susceptibility or tumor progression.

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin- Zentrallaboratorium – der Universität Münster, Albert-Schweitzer-Straße 33, 48149 Münster

Korrespondenz: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Burkhard Hermann Brandt, Diplom-Chemiker, Klinischer Chemiker, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin – Zentrallaboratorium – der Universität Münster, Albert-Schweitzer-Straße 33, 48149 Münster, Deutschland

Fax +49-251-834 7226

E-mail: brandt@uni-muenster.de

Keywords: familial colorectal carcinoma; tumor suppressor gene; DNA-reparation gene; tumor-modifier gene; microsatellite analysis; direct sequencing.

Das hereditäre Kolonkarzinom und familiäre Krebs syndrome mit Beteiligung des Kolons

Kolorektale Karzinome stellen in der Bundesrepublik bei Frauen die zweithäufigste und bei Männern die dritthäufigste Krebserkrankung. Seit Mitte der 80er Jahre ist kein weiterer Anstieg der Neuerkrankungen zu verzeichnen; die altersstandardisierte Mortalitätsrate ist sogar leicht rückläufig. Die Risikofaktoren für das kolorektale Karzinom sind im wesentlichen in der Ernährung zu finden. Bei vorsichtiger Schätzung könnte man sagen, dass 5/6–3/4 der Karzinome sporadisch und 1/6–1/4 familiär gehäuft auftreten. Daneben gibt es auch Darmerkrankungen, die das Risiko erhöhen, wie die chronisch-entzündlichen Erkrankungen der Darmschleimhaut (Colitis Ulcerosa, M. Crohn). Man kann heute davon ausgehen, dass eine monogenetische Prädisposition in ca. 6 bis 7 % der kolorektalen Karzinome vorliegt. Ein kleinerer Teil der erblichen Karzinome (ca. 1 %) manifestiert sich dabei in Form von Adenomen (familiäre adenomatöse Polyposis coli, FAP). Sie geht oftmals mit mehr als 100 Polypen einher, die meistens in der zweiten Lebensdekade auftreten. Es kann auch zu einer milderer Form mit einer geringeren Anzahl flacher Adenome kommen. Die unbehandelte Polyposis führt in 100 % der Fälle zum Karzinom.

In etwa 5 % aller kolorektalen Karzinome sind auf eine Prädisposition zurückzuführen, die nicht mit der Bildung von Polypen einher geht. In diesen Familien mit hereditärem nicht-polypösem Kolonkarzinom (HNPCC, Lynch Syndrom) liegt das früheste Erkrankungs-

alters bei 45 Jahren, es werden aber auch Einzelfälle in den frühen Zwanzigern gefunden. Da Symptome als Kriterien fehlen, werden in der Praxis die HNPCC-Familien am ehesten unter denen gefunden, die anamnestisch die sogenannten Amsterdam-Kriterien der Internationalen Kollaborationsgruppe für HNPCC erfüllen. Diese sollten dann einer molekularen Diagnostik zugeführt werden. Die Kriterien besagen, dass die Familie mindestens drei Verwandte mit kolorektalem Karzinom umfassen sollte, von denen einer der Verwandte 1. Grades der beiden anderen sein sollte. Zusätzlich muß das kolorektale Karzinom über zwei Generationen gefunden worden sein, wobei ein Betroffener bei der Diagnose jünger als 50 Jahren gewesen sein sollte. Die FAP sollte außerdem klinisch ausgeschlossen werden.

Da das Lebenszeitrisko eines Menschen für ein kolorektales Karzinom von 2 auf 6 % steigt, wenn er einen erkrankten Verwandten ersten Grades hat, und sogar auf 17 %, wenn zwei Betroffene in der Familie sind, kann man davon ausgehen, dass es niedrig penetrante prädisponierende Gene für das kolorektale Karzinom geben muß. Dazu kommt, dass das kolorektale Karzinom eine Manifestation anderer familiärer Krebs syndrome, z.B. des familiären Mammakarzinoms aufgrund einer BRCA1-Mutation sein kann. Tabelle 1 stellt die verschiedenen Risikogruppen nach dem Erscheinungsbild ihrer klinischen Erstmanifestation dar.

Die Grundlagen der molekularen Diagnostik hereditärer kolorektaler Karzinome

Sensitive und spezifische Verfahren basierend auf modernen Technologien, wie Fluoreszenzfarbstoffchemie, Laseroptik, Nanoliter-Kapillarelektrophorese und Computerelektronik ermöglichen die Bereitstellung von Parametern der Genom-(DNA) und Transkriptomebene

Tabelle 1 Kolonkarzinom-Prädispositionen

Syndrom	Beginn der Erkrankung (Lebensalter)	Begleiterkrankungen	Kolonkarzinom-Inzidenz
• Polyposis			
fam. adenomatös	> 10	Hepatocelluläres Adenom	90–100 %
Gardner Syndrom	< 10	Osteom, Soft Tissue Sarkom	?
Oldfield Syndrom	< 10	multiple sebaceuse Zysten	?
Turcot Syndrom	< 10	Medulloblastom, Gliom	?
juvenile	< 10		1 %
Peutz-Jeghers Syndrom	> 10	extracolische Polypen	1–10 %
• Colitis Ulcerosa	< 20	Leber Metastasen	> 5 %
• Fam. cancer syndromes (e. g. BRCA1 mutation)		Mammakarzinom, Schilddrüsenkarzinom	
• Hereditäres Nicht-polypöses Kolonkarzinom (HNPCC)	> 45	Endometriumkarzinom	≈ 80 %

(mRNA) über die Forschung hinaus für die klinische molekulare Diagnostik. Damit wurde eine Prädispositionsdiagnostik für Kolorektale Karzinome möglich, die dem behandelnden Arzt in der Entscheidung über Beratung, weitere Beobachtung und Behandlung des Patienten wichtige Hilfen geben.

Die molekulare Diagnostik von Tumoren geht davon aus, dass maligne Tumoren auf genetische Evolution, auch Mutagenese genannt, durchlaufen. Die Mutationen, die zur Entstehung und Ausbreitung eines malignen Tumors führen, müssen dabei in Genen auftreten, die das Wachstum, die Differenzierung und den Tod der Zellen in den Geweben des menschlichen Körpers maßgeblich bestimmen. In der molekularen Diagnostik von Kolorektalen Karzinomen sind prinzipiell dabei zwei Gruppen von Genen von Bedeutung [1]:

- a) die rezessiven Tumorsuppressorgene, bei deren die Mutation zu einem Wegfall eines Wachstumsstoppsignals führt und
- b) und die Gruppe der Mutatorgene, die sich genetisch rezessiv wie die Suppressorgene verhalten. Hier führt die Mutation zu einem Funktionsverlust eines Proteins, das die Integrität der genomischen DNA nach der Replikation sicherstellt.

Die Gene können bereits im Genom der Keimzellen mutiert sein oder spontan im differenzierten Organewebe zu jeder Zeit im Leben eines Menschen entstehen. Die Keimbahnmutationen sind vererbbar (hereditär) und bleiben auf die rezessiven Suppressor- und Mutatorgene beschränkt. Das liegt daran, dass die Ausprägung des Phänotyps bei beiden Gengruppen auf einem Funktionsverlust beruht und sich daher erst auswirken, wenn beide Gene (Allele) im diploiden Chromosomensatz des Menschen mutiert sind.

Im Folgenden wird die Bedeutung dieser Gene für die Entstehung und den Nachweis einer Prädisposition eines kolorektalen Karzinoms weiter ausgeführt.

Mutationen in Tumorsuppressorgen sind die Ursache für die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) – einer monogenetischen Tumorerkrankung

Die FAP wird durch eine Mutation im APC-Gen („adenomatous polyposis coli gene“) auf dem Chromosom 5q autosomal dominant vererbt [2]. Die geschätzte Penetranz für ein Adenom bei Genträgerschaft beträgt 90 %. Das APC-Gen ist ein Tumorsuppressorgen. Die über 700 beschriebenen Mutationen führen in der Mehrzahl zu einem Abbruch der Proteinkette und damit zum Funktionsverlust. Die meisten Familien haben isolierte und bestimmte Mutationen des APC-Gens. Die Identifizierung einer APC-Mutation mit molekularen Methoden ist sehr aufwendig, eröffnet aber die Möglichkeit, Mutationsträger frühzeitig zu erkennen und damit lebenslang den Ausbruch des Karzinoms zu verhindern. Nicht betroffenen Familienangehörigen können nach dem Gentest weitere und wiederkehrende invasive Untersuchungen erspart werden. Einschränkend muss man sagen, dass die APC-Genuntersuchung nicht in allen APC-Familien erfolgreich (informativ) ist, was in ein-

zelnen Fällen zur Unterschätzung des Karzinomrisikos führen kann. Bis zu 30 % der Fälle mit Polyposis haben allerdings eine de novo Mutation des Gens in der Keimbahn ohne eine bisherige familiäre Häufung. Diese Mutation kann weitervererbt werden und eine neue Kolorektalkarzinomfamilie entstehen lassen. Daneben wird eine APC-Genmutation auch in der DNA von sporadischen Karzinomen gefunden und zeigt damit, dass sie ein Glied in der Kette von Mutationen bei der Entstehung des kolorektalen Karzinoms darstellt.

Mit der Entdeckung des Suppressorgens APC konnte erstmals eine vollständige Mutationssequenz in der Entwicklung eines sporadischen Karzinoms von der Normalzelle über die benigne Wucherung, dem Adenom, bis zum metastasierenden Karzinom aufgeklärt werden [2]. Es hat sich dabei die Annahme von Nowell bestätigt, dass 6 bis 7 Mutationen notwendig sind, damit das Vollbild des malignen Phänotyps sich ausbilden kann [3]. Man rückt heute allerdings wieder davon ab, dass ausschließlich eine lineare Folge bestimmter Mutationen zur Entstehung eines Malignoms führt.

Mutatorgene fördern die Entstehung des hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinoms (HNPCC)

Die zweite Gruppe von Genen, über die Mutationen vererbt werden, stellen Mutatorgene dar [4]. Mutatorgene kodieren für Proteine des DNA-Reparaturapparates. Am häufigsten von Mutationen betroffen sind die Mismatch-Repair-Gene (MMR), die bei der Replikation überhängend eingebaute einzelne Basen wieder entfernen [5]. Bleibt die Entfernung dieser Fehlbasenpaarungen, die in jedem Zellzyklus entstehen, aus, häufen sich Einzelbaseninsertionen (Punktmutationen) in den Nachkommenzellen an. Die MMRs sind aber auch oft in spontanen Malignomen defekt, besonders häufig in Kolonkarzinomen.

Der Defekt der MMRs macht sich besonders an Gensequenzen bemerkbar, die repetitive Basenfolgen enthalten. Die repetitiven Sequenzen der sogenannten „simple sequence repeats“ (SSRs) bestehen aus 1 bis 6 Basenwiederholungen, sie kommen etwa 100 000 Mal im menschlichen Genom vor und werden besonders häufig von Fehlbasenpaarungen betroffen, die im Nachhinein wieder entfernt werden müssen (Abb. 1). Der Funktionsverlust eines Reparaturgens führt, anders als bei den Suppressorgen, die direkt den Zellzyklus kontrollieren, zu einer Anhäufung von Mutationen in einer unbestimmten Anzahl von Genen der Zellen. Zellklone, deren weitere Mutationen mitosehemmende Suppressorgene inaktivieren oder proliferationssteigernde Onkogene aktivieren, werden die anderen Zellen dieses Organbereiches überwuchern und den Stammklon des Tumors bilden („clonal dominance“). Die hohe Mitosehäufigkeit dieses Zellklones führt unweigerlich zu einer weiteren Anhäufung von Mutationen und damit zur weiteren Entartung. Aus Untersuchungen an SSRs in verschiedenen Tumorarten weiß man, dass die Anzahl der Mutationen während der Entwicklung vom organbegrenzten Tumor zur Metastase zunimmt.

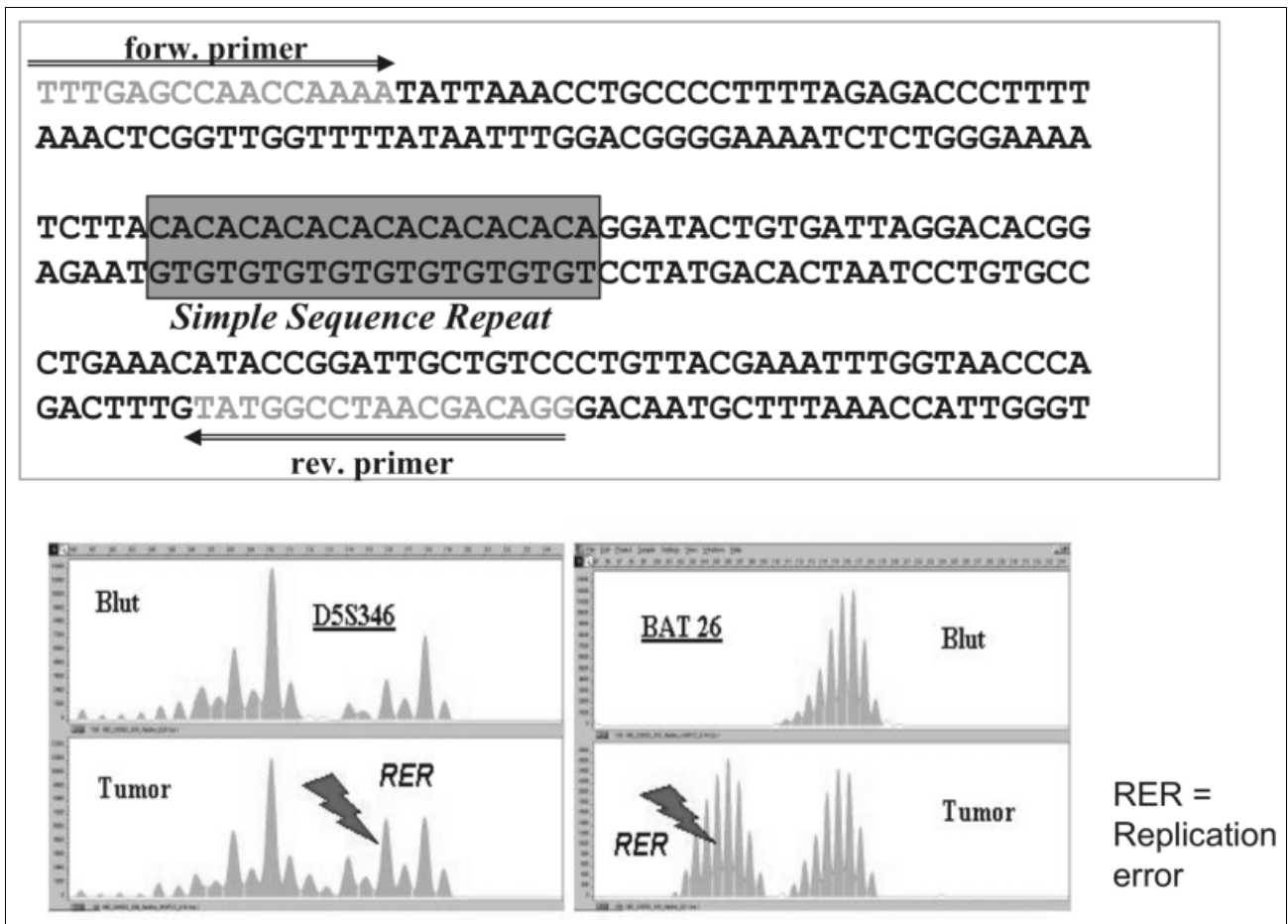


Abbildung 1 Bestimmung einer Mikrosatelliten Instabilität (MSI)

HNPCC ist eine genetisch sehr heterogene Erkrankung. Über eine umfangreiche Analyse dieser SSRs in Familien mit gehäuftem Auftreten von Kolonkarzinomen konnte man 5 MMR-Gene identifizieren (MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, MSH6), die für die Entstehung des nicht-polypösen Kolonkarzinoms (HNPCC) verantwortlich sind [5]. Die genetische Untersuchung beginnt deshalb mit einem Screeningtest im Tumor eines Betroffenen in einer Familie, die die Kriterien erfüllt, oder der einen sehr frühen Krankheitsbeginn aufweist (Abb. 1). Der Test erfasst die Replikationsfehler in der DNA über die Untersuchung der oben schon erwähnten repetitiven Sequenzen (Abb. 1, Tabelle 2). In 95 % der HNPCC Tumoren stellt sich der Replikationsfehler durch eine sogenannte Mikrosatelliteninstabilität (MSI) dar. Diese wird auch in 10 %–15 % der sporadischen kolorektalen Karzinomen angetroffen. Die MSI kann über die Analyse von 5 längenpolymorphen Sequenzen der Patienten-DNA bestimmt werden [6].

Wird ein RER+-Phänotyp gefunden, müssen die in Frage kommenden Reparaturgene entsprechend ihrer Mutationsfrequenz bei HNPCC einzeln sequenziert und so muß die bestimmte Mutation ermittelt werden. Etwa

jeweils 30 % der Fälle sind auf Mutationen in den Genen MSH2 und MLH1 zurückzuführen. Die weiteren Gene PMS1, PMS2 und MSH6 werden nur in wenigen Fällen gefunden und sind deshalb in der Regel nicht Bestandteil des „Routine“-Untersuchungsprogramms. Darüber hinaus wird bei weiteren ca. 30 % keine Mutation in einem dieser Gene gefunden. Das Lebenszeitrisiko für einen Patienten mit einer Mutation liegt für das kolorektale Karzinom bei ca. 80 % und zusätzlich für ein Endometriumkarzinom bei ca. 40 %. Außerdem werden im fortgeschrittenen Alter auch erhöhte Risiken für Magen-, Gallengangs- und uroepitheliale und Ovarialkarzi-

Tabelle 2 Konsensus-Mikrosatellitenmarker für die Bestimmung eines Replication errors (RER+)

Marker	Gen	Polymorphismus
BAT 25	c-kit	ttt
BAT 26	hMSH2	aaa
D17S250	MFD15	(CA)n
D5S346	APC	(CA)n
D2S123	–	(CA)n

nome beobachtet. Träger einer HNPCC-assoziierten Mutation sollten ab dem 20. Lebensjahr 1- bis 2-jährlich koloskopiert werden und weibliche Träger darüber hinaus gynäkologisch engmaschig kontrolliert werden. Es hat sich gezeigt, dass eine regelmäßige koloskopische Kontrolle die 10-Jahresinzidenzrate für ein kolorektales Karzinom um 50 % senkt [7]. Außerdem wurde auch die Prognose der Patienten verbessert. Für die Prognose extrakolischer Manifestationen liegen bislang keine Verlaufsdaten vor. Neben dem verbesserten klinischen Management für Genträger und dem Vorteil, dass nicht betroffenen Familienangehörigen wiederkehrende invasive Untersuchungen erspart werden können, beschränkt die große genetische Heterogenität der Erkrankung den klinischen Einsatz der molekularen Diagnostik.

Die Penetranz erblicher Kolonkarzinome wird durch Folgemutationen und Tumor-modifier Gene beeinflusst

Etliche Gendefekte zeigen eine inkomplette Penetranz, d. h. sie führen erst nach Lebensdekaden zum manifesten Tumor oder auch gar nicht. Während z. B. eine RB1-Mutation innerhalb der ersten 3 Lebensjahre zum Retinoblastom führt, beträgt die Zeitspanne bis zur Kolonkarzinomdiagnose bei einer APC-Mutation u. U. 30 Jahre. Die Gründe für eine inkomplette Penetranz sind vielfältig. Zum einen haben wir schon beim hereditären Kolonkarzinom gesehen, dass weitere Mutationen (ras, DCC, MCC, p53 [2], notwendig sind, damit ein maligner Tumor entstehen kann.

Die häufigste Ursache für eine inkomplette Penetranz könnte der Einfluss von sogenannten Tumor-modifier Genen sein, wie sich aus Experimenten an der Maus abschätzen lässt [8]. Diese Gene können allerdings auch hereditäre Faktoren für die Entstehung oder auch Vermeidung eines spontanen Tumors sein. D. h. es existiert eine Vielzahl von niedrig-penetranten Genen, die die Anfälligkeit oder auch Resistenz gegenüber Umwelt bedingten Krebs bestimmen.

Bei dem durch eine APC-Mutation verursachten Kolonkarzinom beobachtet man Fälle mit aggressivem Wachstum in den frühen Lebensjahren und daneben solche, die in ihrem gesamten Leben kein Karzinom entwickeln. Mit Hilfe von Mausmodellen, die sehr viel kürzere Generationszeiten haben als Menschen, konnte man die Kopplung einer großen Anzahl von verschiedenen Modifier-Loci mit einer gesteigerten Tumoranfälligkeit aufzeigen. Die Modifier-Gene können mit bekannten Suppressorgen wie APC oder p53 kooperieren oder in deren Wirkungsmechanismus eingreifen. Ein erstes Gen, das als Kandidat für die Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen des FAP assoziierten Kolonkarzinoms verantwortlich sein könnte, konnte kürzlich charakterisiert werden. Es handelt sich um einen Polymorphismus des Phospholipase A2-Gens (PLA2G2), der in der Karzinom-anfälligen Maus einen Kettenab-

bruch des PLA2G2-Proteins hervorruft. Experimente an transgenen Mäusen zeigten, dass die Rekonstruktion des funktionellen Allels mit intaktem PLA2G2 die Tiere Karzinom-resistent machte. Es gibt bereits klinische Studien, die zeigen, dass nicht-steroidale anti-inflammatorische Therapeutika [9], die den Arachidonsäure-Stoffwechsel beeinflussen, einen negativen Effekt auf das Wachstum von Tumoren mit einer APC-Mutation haben. Die Suche nach vergleichbaren Polymorphismen beim Menschen wird uns neue Erkenntnisse darüber bringen, welchen Einfluss geringfügige Veränderungen der Expression oder der Aktivität eines bestimmten Gens auf die Krebsentstehung und -progression haben. Möglicherweise werden diese Gene als Zielsequenzen für neue Therapieansätze genutzt werden und einen Ansatz für die Krebsprävention darstellen.

Mutationen in Tumorsuppressorgenen in chronisch inflammatorischen Darmerkrankungen führen zur Karzinombildung

Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED, Colitis ulcerosa, M. Crohn) tragen ebenfalls ein erhöhtes Karzinomrisiko. Etwa 0,5 % aller kolorektalen Karzinome sind auf eine CED zurückzuführen. Die kumulative Inzidenz für ein kolorektales Karzinom liegt bei 5 % in 15 Jahren. Das Risiko korreliert mit dem Ausmaß der Kolonbeteiligung und der Dauer der Erkrankung. Anders als die erblichen und sporadischen kolorektalen Karzinome entstehen die CED-assoziierten Tumore über eine Dysplasie-Karzinom-Sequenz. Ein manifestes Karzinom zeigt sich dabei in der endoskopisch gewonnenen Biopsie durch eine chromosomale Instabilität, erkennbar als Aneuploidie des Zellkernes. Verantwortlich für diese chromosomale Instabilität sind Mutationen in Tumorsuppressorgenen. Am häufigsten werden dabei Mutationen im p53-Gen gefunden [10, 11]. Mit Hilfe der molekularen Diagnostik kann deshalb frühzeitig über diesen Gendefekt im dysplastischen Gewebe der Übergang in das Karzinom erkannt werden. Inwieweit der Nachweis solcher Mutationen in der DNA, die aus dem Stuhl oder endoskopisch erzeugter Darmspülflüssigkeit gewonnen wurde, die Früherkennung verbessert, wird weiterhin in Studien untersucht.

Tabelle 3 gibt zum Abschluss dieses Abschnitts eine Übersicht über die molekular-diagnostischen Möglichkeiten.

Methoden der Molekularen Diagnostik für die Erkennung eines Risikos für ein kolorektales Karzinoms

Eine rasante Entwicklung hat zweifelsohne die Diagnostik der Nukleinsäuren (DNA, RNA) durch die Erfindung der Polymerasekettenreaktion (PCR) genommen. Jahrzehntelang auf die reine Zytogenetik beschränkt,

Tabelle 3 Molekular-diagnostische Untersuchungen für die Risikoeinschätzung eines kolorektalen Karzinoms

Krankheitsbild/ Symptome/Anamnese	Polyposis coli	Familie erfüllt Amster- dam-Kriterien	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
Untersuchungsmaterial	Leukozyten	Tumorgewebe eines Patienten, Leukozyten der Familienangehörigen	Biopsiematerial, Faeces, Kolonlavenflüssigkeit
Untersuchungsmethoden	Mutationsanalyse APC-Gens	Mikrosatellitenanalyse des Primärtumors, Sequen- zierung von Mutatorgenen (MLH2, MSH1)	Mutationsscreening p53-Gen; Mutationssanalyse p53-Gen
Konsequenzen	Engmaschige koloskopische Kontrollen, Kolonteilresektionen, Früherkennung eines Karzinoms, Chemoprävention		

konnten ab 1988 Gendefekte geringen Ausmaßes bis hin zum Austausch einer Base durch die PCR nachgewiesen werden. Die PCR erlaubt die exponentielle Vermehrung kurzer DNA-Sequenzen und kann damit aufwendige Arbeitsschritte der Vermehrung der Ziel-DNA in Mikroorganismen ersetzen. Sie ist damit zur Basismethode geworden, auf die andere Verfahren aufbauen.

Da die für hereditäre kolorektale Karzinome wichtigen Gene sehr lang sind, entsteht hier ein relativ großer analytischer Aufwand. Der Einsatz von Sequenzierungsmethoden basierend auf dem Kettenabbruch-Prinzip nach Sanger stellt das direkte und schnellste definitive Verfahren der Mutationsanalyse dar (Abb. 2). Bei dieser Methode wird die Sequenz eines mittels PCR erzeugten DNA-Fragments unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt an Didesoxynukleotide in einem weiteren PCR-Ansatz (Cycle-Sequencing) bestimmt. Dabei werden in einem Sequenzierungslauf die vier verschiedenen Nukleotidbasen über vier Fluoreszenzemissionen identifiziert (Abb. 2B). Eine gentechnologisch modifizierte Taq-Polymerase sorgt für eine nahezu gleiche Einbaueffizienz der verschiedenen Didesoxynukleotidderivate. Die Trennung erfolgt über Multikanal-Kapillarelektrophorese, so dass maximal 96 Sequenzen mit bis zu 700 Basen parallel bestimmt werden können (Abb. 2A). Leistungsfähige Rechner- und Programmsysteme erleichtern nach dem Trennlauf den Sequenzvergleich mit der Wildtypsequenz (Abb. 2, 3). Sind in einem Labor die genannten apparativen Voraussetzungen nicht gegeben, so wird ein zweistufiges Vorgehen gewählt. Um die Anzahl der Sequenzierungen klein zu halten, können Screeningtest wie die Heteroduplexanalyse, auch automatisierbar als denaturierende HPLC (DHPLC), die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) und die Single Strand Conformational Analysis (SSCP) durchgeführt werden. Der Anwender muss allerdings berücksichtigen, dass diese Methoden nicht zwangsläufig alle Mutationen erfassen und eine Bestätigung der Mutationen über Sequenzierung immer erfolgen muss.

Ein weit verbreitetes Verfahren zur Bestimmung von Translationsterminationsmutationen im APC-Gen, die zu einem verkürzten nicht funktionsfähigen Protein füh-

ren, ist der sogenannte Protein Truncation Assay. Dieser Test kann auf DNA oder RNA gleichermaßen angewendet werden. Die DNA oder cDNA wird dabei in einer PCR mit einem Primer amplifiziert, der eine Promotorenbindungsstelle für virale RNA-Polymerase und Translationsrelevante Bindungsstellen enthält. *In vitro* kann nun das PCR-Produkt in RNA umgeschrieben und anschließend in Peptidsequenz übersetzt werden. Die Peptide werden auf einem Gel entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und so verkürzte Peptide detektierbar gemacht.

Die Kapillarelektrophorese kann neben der Sequenzierung auch für die Längenbestimmung von PCR-Produkten eingesetzt werden (Abb. 1). In dieser Fragmentanalyse werden fluoreszenz-markierte Primer eingesetzt, über die Fragmente im Kapillarsystem identifiziert werden können. Diese Verfahren findet wie schon erwähnt Anwendung bei der Bestimmung des für das HNPCC charakteristischen RER+-Phänotyps über Marker mit einem Längenpolymorphismus (Abb. 1). Bis zu drei PCR-Reaktionen können dabei in einem Reaktionsgefäß ablaufen und parallel analysiert werden. Ein RER+-Phänotyp macht sich dabei durch eine Vervielfältigung der Allele (Abb. 1) der ansonsten biallelischen Marker bemerkbar.

Ist eine Mutation bei einem Patienten nachgewiesen worden, kann die DNA der Familienangehörigen durch präzise PCR-Verfahren darauf untersucht werden.

Dieses relativ neue Verfahren der präzisen Quantifizierung mittels PCR wird Echtzeit-PCR genannt. Die Reproduzierbarkeit der PCR wird dadurch erhöht, dass die Quantifizierung des PCR-Produktes kinetisch gemessen wird. Das Messsignal wird über eine mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Fluoreszenzlöcher (Quencher) markierten Hybridisierungsprobe erzeugt, die als interner Standard fungiert. Mit dem Fortschreiten der PCR-Reaktion wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Dabei werden Emitter und Quencher getrennt und das Fluoreszenzsignal nimmt proportional zur Bildung des PCR-Produktes zu. Alternativ kann auch der Schmelzpunkt eines Hybrides von PCR-Fragment der DNA des Patienten und einer spezifischen Sonde ermittelt wer-

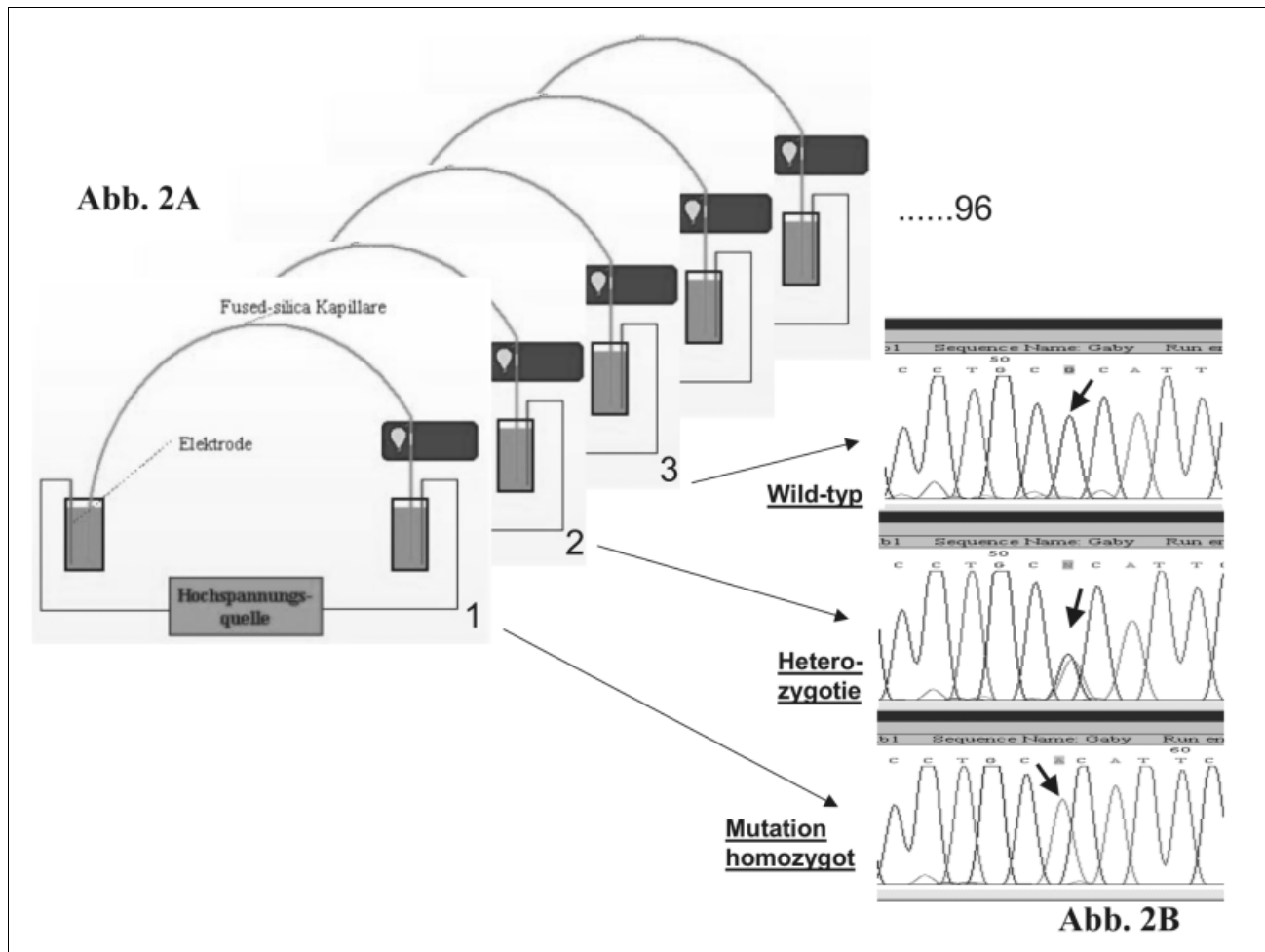


Abbildung 2 Sequenzierung mit Kapillarelektrophorese nach dem Kettenabbruchprinzip und fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden

den. Der Nachweis der Mutation kann darüber geführt werden, dass die Sonde vollständig mit der Wildtyp-Sequenz hybridisiert. Bei Vorliegen einer Mutation wird der Schmelzpunkt von Sonde und Patienten-DNA herabgesetzt. Markiert man das Hybrid aus Sonde und Patienten-DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff für Doppelstrang-DNA und erhöht sich Temperatur schrittweise, kommt es für ein mutiertes DNA-Fragment zu einem Fluoreszenzabfall bei niedrigeren Temperaturen. Dies Verfahren hat sich für den Nachweis bekannter Punktmutationen bewährt.

Ausblick

Die molekulare Diagnostik stellt dem behandelnden Arzt eine Vielzahl von neuen Verfahren zur Verfügung. Der Artikel beschreibt die „harten“ Parameter der molekularen Diagnostik. Die genannten Verfahren sind unter strenger Indikationsstellung klinisch einsetzbar und

stellen so eine erhebliche Verbesserung der Krankenversorgung dar. Allein die Tatsache, dass eine Vielzahl von Familienangehörigen von Patienten mit erblichen kolorektalen Karzinomen wiederkehrende, invasive diagnostische Verfahren erspart bleiben und auf der anderen Seite Gendefektträgern durch engmaschige Kontrollen sogar das Malignom gänzlich erspart bleiben kann, ist eine solche Verbesserung.

Wir befinden uns in einer schwierigen Zeit, was die Etablierung neuer Parameter in der Praxis anbelangt. Dieses erfordert in einer Zeit der knappen Kassen sehr viel Kreativität von denen, die die neuen Verfahren nutzen wollen. Ich möchte jedoch den Schluss wagen, dass es langfristig über eine Diagnostik mit wenigen aber effizienten Parametern Kosteneinsparungen im gesamten Gesundheitswesen geben kann, da Erkrankungen früher erkannt werden oder individueller therapiert werden können.

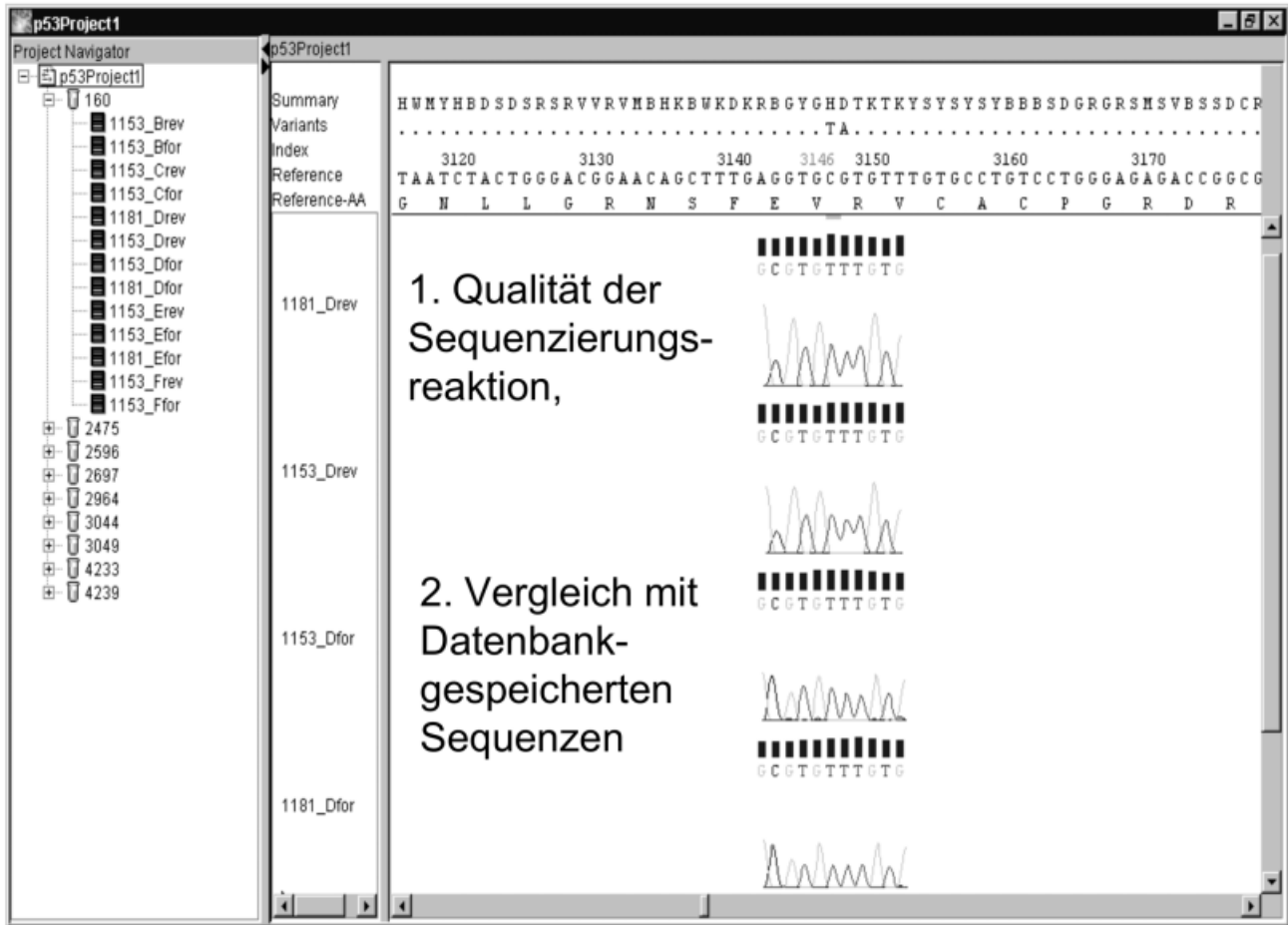


Abbildung 3 Software-unterstützte Mutationsanalyse

Weitere Informationen können auch auf der Internetseite des Verfassers erhalten werden:
<http://www.labor.uni-muenster.de/ag/onkologie/>.

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meinen beiden Mitarbeitern, Frau Dr. Nicola Tidow und Herrn Dr. Hartmut Schmidt, dafür danken, dass sie mir Graphiken überlassen und wertvolle Kommentare gegeben haben.

Literatur

1. Hahahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.
2. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759–67.
3. Nowell, PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23–8.
4. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75:1027–38.
5. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996;2:169–74.
6. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248–57.
7. Jarvinen H, Mecklin JP, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Gastroenterol* 1995;108:1405–11.
8. Balmain A, Nagase H. Cancer resistance genes in mice: models for the study of tumor modifiers. *TIG* 1998;14:139–44.
9. Gwyn K, Sinicrope FA. Chemoprevention of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2002;97:13–21.
10. Hardy RG, Meltzer SJ, Jankowski JA. ABC of colorectal cancer. Molecular basis for risk factors. *BMJ* 2000;321:886–9.
11. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992;70:523–6.