

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Höfler)

**Molekular- und tumorbiologische Untersuchungen zum Beitrag
von E-Cadherin-Mutationen zur Apoptose beim diffusen
Magenkarzinom**

Elena Wallner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Höfler
2. Univ.-Prof. Dr. Th. Meitinger

Die Dissertation wurde am 30.08.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.06.2005 angenommen.

Zusammenfassung

Bei der Entstehung von Krebszellen spielen Veränderungen in der zellulären Regulation eine große Rolle. Sie können zu einem abnormen Verhalten der tumorösen Zellen hinsichtlich der Zell-Zell-Adhäsion, sowie auch einer fehlenden Apoptose entarteter Zellen führen. Beim diffusen Magenkarzinom spielen dabei v.a. das Zelladhäsionsmolekül E(epitheliales)-Cadherin und der Apoptoseregulator p53 eine Rolle. Mutationen im E-Cadherin-Gen können das Verhalten der Zellen bei Zelladhäsion, Motilität und Überlebensfähigkeit beeinflussen. Im Rahmen der hier vorgestellten Dissertation wurde eine Mutationsanalyse von p53 und eine Expressions- und Lokalisationsanalyse von E-Cadherin, von dem Apoptose-relevanten Gen p53, dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 und dem Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt und der Einfluss von tumor-assoziierten E-Cadherin-Mutationen in Bezug auf das Überleben von Tumorzellen diffuser Magenkarzinome untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit erfolgte zum einen die Expressions- und Lokalisationsanalyse von E-Cadherin, p53, Bcl-2 und Ki-67 durch immunhistochemische Anfärbung und zum anderen wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Mutationen des Apoptose-assoziierten Gens p53 und Mutationen von E-Cadherin in Magenkarzinomen vorliegt.

Dazu wurde zuerst aus histologischen Schnitten diffuser Magenkarzinome von 8 Patienten ohne und von 16 Patienten mit somatischen E-Cadherin-Mutationen aus den Tumorzellen DNA isoliert und eine DNA-Mutationsanalyse von Exon 5 bis Exon 8 des p53-Gens mittels denaturierender Hoch-Druck-Flüssigkeits-Chromatographie (DHPLC) in Verbindung mit direkter Sequenzierung durchgeführt. Als Ergebnis wurde jeweils eine Mutation im p53-Gen bei den Tumoren mit E-Cadherin-Wildtyp und eine bei den Tumoren mit E-Cadherin-Mutation detektiert.

An den Schnitten der 24 Magenkarzinome wurden anschließend immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt, um die Akkumulation von p53 im Kern, die Expression von Bcl-2 und Ki-67, sowie die Lokalisation von E-Cadherin sichtbar zu machen.

Bei der immunhistochemischen Färbung von p53 zeigte sich eine Akkumulation bei 5 der 8 Tumoren ohne E-Cadherin-Mutation und bei 3 der 16 Tumoren mit E-Cadherin-Mutation. Bei Bcl-2 kam es zu einer vermehrten Anfärbung von Tumoren ohne E-Cadherin-Mutation und bei Ki-67 konnte kein Zusammenhang zwischen den Ki-67 positiv angefärbte Tumoren und dem Mutationsstatus von E-Cadherin gezeigt werden.

Die Ergebnisse des tumorbiologischen Teils zeigen, dass abhängig vom E-Cadherin-Mutationsstatus die Akkumulation von p53 signifikant verändert ist, jedoch keine Korrelation zwischen p53-Mutations-Status, E-Cadherin-Mutationsstatus und der Ki-67-Expressionsstärke existiert. E-Cadherin-Mutationen und p53-Mutationen spielen eine große Rolle für die Apoptose und Proliferation von Tumorzellen, es gibt aber zusätzlich noch eine Vielzahl an genetischen und epigenetischen Mechanismen, die in die Tumorentstehung involviert sind, aber noch nicht vollständig analysiert werden konnten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Wachstumsverhalten von stabil transfizierten E-Cadherin exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen untersucht. Als Zellpopulation wurden dabei MDA-MB-435S Karzinomzellen verwendet. Ein Klon dieser Zellen exprimierte Wildtyp-E-Cadherin, weitere Klone exprimierten mutiertes E-Cadherin (3 Varianten: Deletion in Exon 8, Deletion in Exon 9 und Punktmutation in Exon 8). Als Kontrolle wurde die korrespondierende parentale untransfizierte Linie eingesetzt. Die Zelllinien wurden externen Stimuli wie Chemotherapeutika (5-FU, Cisplatin und Etoposid) unterzogen und dann das Wachstumsverhalten der Zellen der jeweiligen Gruppe analysiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen des zweiten Teils der Arbeit zeigen, dass die Zellwachstumsrate der Wildtyp-E-Cadherin-Linie niedriger ist als die der korrespondierenden parentalen untransfizierten Linie. Ferner beeinflussen die Mutationen in Exon 8 und 9 die wachstumshemmende Funktion von E-Cadherin negativ. Bei der Zugabe von Cisplatin zeigte sich insbesondere, dass die Sensitivität der Wildtyp-E-Cadherin-Zellen und der Zellen mit mutiertem E-Cadherin gegenüber der korrespondierenden parentalen untransfizierten Zelllinie signifikant erniedrigt ist. Hingegen zeigte sich bei allen untersuchten Zellpopulationen eine vergleichbare Sensitivität gegenüber 5-FU und Etoposid.

Die Expression und/oder Mutation von E-Cadherin beeinflusst nach diesen Resultaten sowohl die Proliferationsrate als auch die Chemosensitivität von Tumorzellen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Inhaltsverzeichnis	4
Kapitel 1 Einleitung	6
1.1 Maligne Magentumoren	6
1.1.1 Epidemiologie	6
1.1.2 Ätiologie.....	7
1.1.3 Risikofaktoren und Präkanzerosen	8
1.1.4 Lokalisation und Einteilung/Klassifikation.....	11
1.1.5 Invasivität und Metastasierung	12
1.1.6 Prognosefaktoren und Therapie	13
1.1.7 Apoptose-relevante Gene	15
1.1.8 Proliferationsmarker.....	20
1.2 E-Cadherin	20
1.2.1 Struktur und Funktion von E-Cadherin	21
1.2.2 E-Cadherin-Mutationen.....	22
1.2.3 Die Rolle von E-Cadherin bei der Apoptose.....	23
1.3 Problemstellung.....	24
Kapitel 2 Material und Methoden.....	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Verwendete Geräte.....	26
2.1.2 Allgemeine Chemikalien, Lösungsmittel und Puffer	27
2.1.3 Kommerzielle Komplettsysteme.....	27
2.1.4 Eukaryotische Zelllinie	28
2.1.5 Reagenzien und Medien für eukaryotische Zellkultur.....	28
2.1.6 Reagenzien und Materialien für Protein- und Immunhistochemie	28
2.1.7 Enzyme und Oligonukleotide für die Amplifikation für Exon 5-8 von p53.....	28
2.1.8 Verbrauchsmaterial.....	29

2.2	Methoden	30
2.2.1	Allgemein benötigte Lösungen und Medien	30
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.3	Zellbiologische Methoden	40
2.2.4	Immunhistochemische Methoden	43
Kapitel 3	Ergebnisse	48
3.1	Untersuchungen diffuser Magenkarzinome an histologischen Schnitten.....	48
3.1.1	Auswahl des Tumormaterials/Apoptoseuntersuchungen	48
3.1.2	p53-Mutationsanalyse.....	50
3.1.3	Immunhistochemische Untersuchungen von p53 und Bcl-2.....	54
3.1.4	Immunhistochemische Untersuchung von Ki-67	56
3.1.5	Immunhistochemische Untersuchung des E-Cadherinstatus	57
3.2	Zellbiologische Untersuchungen mit dem Zellproliferationsassay XTT.....	60
3.2.1	Korrelation zwischen E-Cadherinstatus und Wachstumsverhalten.....	60
3.2.2	E-Cadherin-Mutationen und die Bedeutung für ihre Chemotherapeutika-Sensitivität	61
3.3	Statistische Auswertung.....	63
3.4	Eigene Publikationen	64
Kapitel 4	Diskussion.....	65
4.1	Tumorbiologische Untersuchungen	65
4.1.1	p53-Mutationsanalyse.....	66
4.1.2	Immunhistochemische Untersuchung des p53-Proteins	67
4.1.3	Immunhistochemische Untersuchungen des Bcl-2-Proteins	68
4.1.4	Immunhistochemische Untersuchungen des E-Cadherinproteins	69
4.1.5	Apoptose und Homöostaseregulation	70
4.2	Untersuchungen von E-Cadherin für die Zellproliferation und Chemosensitivität	71
4.2.1	Zellbiologische Untersuchungen von E-Cadherin	71
4.2.2	Chemotherapeutika-Response	73
4.3	Ausblick	74
	Abkürzungsverzeichnis	76
	Abbildungsverzeichnis	78
	Tabellenverzeichnis	80
	Literaturverzeichnis.....	81
	Vielen Dank	93

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Maligne Magentumoren

1.1.1 Epidemiologie

Das Magenkarzinom gehört zu den häufigsten bösartigen Tumoren in Deutschland und zählt ferner zu den Tumoren mit schlechter Prognose. Bei deutschen Männern ist das Magenkarzinom der vierthäufigste Tumor nach Lungen-, Kolon- und Prostatakarzinom, bei deutschen Frauen lag es 2002 an sechster Stelle, wobei der häufigste Tumor bei den Frauen nach wie vor das Mammakarzinom ist (einsehbar unter http://www.dkfz-heidelberg.de/epi/Home_d/Programm/AG/Praevent/Krebshom/main/deutsch/frame5.htm; Stand 5.6.2004, wie auch die übrigen statistischen Angaben). Während die Inzidenz- und Mortalitätsraten in den letzten Jahren rückläufig waren, ist demgegenüber eine Zunahme von Adenokarzinomen des gastro-ösophagealen Übergangs (AEG) zu verzeichnen (Stein et al 2000).

Weltweit betrachtet lassen sich beim Magenkarzinom große Unterschiede in den Mortalitätsraten feststellen, was zum Teil durch ethnische Faktoren oder durch Umweltfaktoren bedingt ist. Japan gehört zu den Ländern mit der höchsten Mortalitätsrate von 34,1 (Männer) und 15,0 (Frauen) je 100000 im Gegensatz zu den USA mit einer Rate von 5,2 (Männer) und 2,4 (Frauen) je 100000. Es erkranken demnach Männer doppelt so häufig wie Frauen.

Die Erkrankten sind selten jünger als 40 Jahre, das Häufigkeitsmaximum liegt zwischen dem 60. und dem 80. Lebensjahr.

1.1.2 Ätiologie

Als mögliche Ursachen für die Magenkarzinogenese werden verschiedene Faktoren diskutiert: Darunter fallen neben genetischen Faktoren unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten und die Art der Lebensführung. Die Bedeutung der Ursachen hat sich jedoch in den letzten Jahren verändert, so dass insbesondere mit zunehmendem Ernährungsbewußtsein und der Einführung von Kühlschränken ein Rückgang der Inzidenz zu verzeichnen ist. Das relative Risiko, ein Magenkarzinom zu entwickeln, lässt sich z.B. durch Anti-Oxydantien, die in Obst, Gemüse oder Vitamin E enthalten sind, verringern (Forman 1991a). Ferner ersetzen gekühlte und somit auch meist frische Produkte heute einen Teil der ursprünglich angewandten Konservierungsmethoden wie Pökeln und Salzen, welche mit der Entstehung von Magenkarzinomen in Verbindung gebracht werden (Boeing et al 1991; Negri et al 1990; Ramon et al 1993a; Ramon et al 1993b). So lag die Mortalitätsrate 1955 bei den Männern noch bei ca. 50 % und bei den Frauen bei ca. 30 %, während sie 2002 bei den Männern 6,2 % und bei den Frauen 5,4 % betrug.

Als weitere mögliche Ursache der Magenkarzinogenese wird eine Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* (*H.p.*) (Forman 1991b; Forman et al 1991; Nomura et al 1991; Talley et al 1991) diskutiert.

Die zugrundeliegenden Mechanismen für die Reaktion der Magenschleimhaut auf eine Infektion mit *H.p.* sind noch nicht zur Gänze geklärt, es wird allerdings eine Beeinflussung der Expression von Wachstumsfaktoren und -rezeptoren, eine starke genetische Variabilität verschiedener *H.p.*-Stämme sowie verschiedene Adhärenz- und Virulenzfaktoren wie z.B. *cagA* und *VacA* diskutiert (Blaser 1995; Blaser et al 1995). Kürzlich wurde ferner entdeckt, dass *cagA*-Positivität v.a. bei jüngeren Patienten zu einem höheren Erkrankungsrisiko führen kann (Lawniczak and Starzynska 2002(a); Lawniczak and Starzynska 2002(b)). Die oft lang unentdeckte Entzündung der Magenschleimhaut führt zu einem Anstieg der Zellproliferation und Apoptoserate und es lässt sich nicht sicher ausschließen, dass dadurch DNA-Schäden und Mutationen wie z.B. im p53-Gen ausgelöst werden (Moss 1998). Eine Akkumulation des p53-Proteins wurde in *H.p.* positiven Gastritiden gefunden, während sie nach Eradikation wieder abnahm (Hsu et al 2000). Es konnte andererseits kein Nachweis dafür erbracht werden, dass *H.p.* eine Mutation im p53-Gen fördert (Lawniczak and Starzynska 2002(a)). Das Verständnis der Zusammenhänge von Wirtsfaktoren, Umweltfaktoren und *H.p.*-Infektion sind zur Zeit noch Gegenstand intensiver Forschung (Huang and Hunt 2000; Huang 2000).

1.1.3 Risikofaktoren und Präkanzerosen

Eine der besten Methoden zur Abschätzung von Faktoren für das Risiko eines Patienten, an einem malignen Magentumor zu erkranken, ist die Kenntnis seiner medizinischen Vorgeschichte.

Als *präkanzeröse Läsionen* gelten Adenome der Magenschleimhaut, die in ein Magenkarzinom übergehen und mit unterschiedlichen Dysplasiegraden auftreten können. Demgegenüber stehen die *präkanzerösen Konditionen*, die zu einer Transformation in ein Magenkarzinom führen können. Dazu gehören die chronisch atrophische Gastritis Typ B (Pangastritis), die chronisch atrophische Gastritis A (perniziöse Anämie), der M. Ménétrier (Riesenfaltengastritis), die intestinale Metaplasie, sowie der Zustand nach Magenresektion. Beim Zustand nach Magenresektion sind vor allem die Zeitspanne (insbesondere > 20 Jahre) sowie die Art der Operation von Bedeutung. Zusätzlich spielt auch die Möglichkeit der Besiedelung mit *H.p.* eine Rolle. Auch wurde beobachtet, dass die Rate der in Folge der Gastrektomie entstandenen Tumoren in Billroth II operierten Mägen geringer ist als in Billroth I operierten, da im letzteren Fall ein geringer Reflux von Galleflüssigkeit stattfindet, der mit der Kolonisation von *H.p.* interferiert (Kato et al 2003).

Genetische Faktoren

Obwohl die meisten Tumoren sporadisch entstehen, gibt es beim Magenkarzinom auch hereditäre Formen. Dazu gehören das hereditäre diffuse Magenkarzinom (HDGC) mit einer Keimbahnmutation im E-Cadherin-Gen (Gayther et al 1998; Guilford et al 1998; Keller et al 1999; Richards et al 1999), das gastrointestinale Polyposis-Syndrom sowie das Vorhandensein der Blutgruppe A. Während das HDGC allein auf der genetischen Komponente beruht, kann sich das Bakterium *H.p.* besonders an das Blutgruppenantigen der Gruppe A - im Gegensatz zur Blutgruppe 0- anheften und so zu chronischen Entzündungen führen (Gonzales Flores PA et al 2000). Auf der Grundlage dieser Entzündungen können dann Dysplasien und maligne Entartungen entstehen, wie bereits weiter oben beschrieben wurde. Neben den oben genannten genetischen Prädispositionen sind noch die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das Peutz-Jeghers Syndrom und die Cowden Erkrankung als Syndrome zu nennen, die zu einem erhöhten Risiko führen, an einem Magenkarzinom zu erkranken (Bevan and Houlston 1999).

Molekulargenetische Aspekte

Die Karzinogenese auf molekularer Ebene wird heute so erklärt, dass durch viele verschiedene Ereignisse wie Mutationen und Allelverlust (LOH - *loss of heterozygosity*) Onkogene entstehen oder Tumorsuppressorgene - durch Verlust oder Mutation- außer Kraft gesetzt werden und somit die normale Zellregulation gestört ist. Es existiert eine Fülle an genetischen Aberrationen, die für die Entstehung von Karzinomen verantwortlich sein können (Abbildung 1).

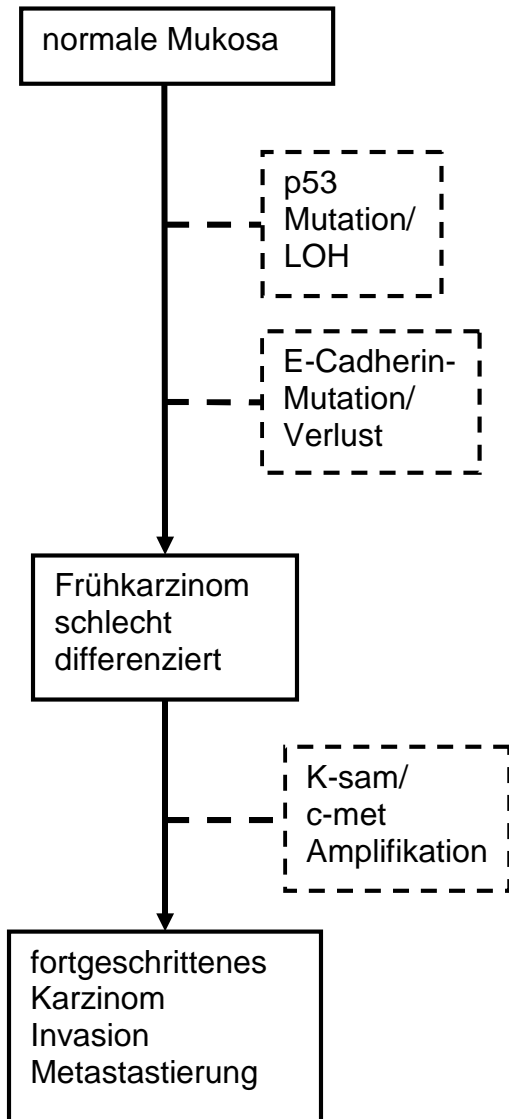
Dazu zählen Proto-Onkogene, die für Tyrosinkinase kodieren (z.B. *c-erbB2*) sowie Gene, die für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren kodieren (Epidermal Growth Factor-Rezeptor). Desweiteren zählen dazu Faktoren, die in die intrazelluläre Signaltransduktion involviert sind wie *K-ras*, sowie Transkriptionsfaktoren (*c-fos*, *c-jun*), Tumorsuppressorgene (*p53*, APC, *bcl-2*) und die Vielzahl genetischer Instabilitäten.

Es wird postuliert, dass intestinale (differenzierte) und diffuse (weniger differenzierte) Magentumoren anhand bestimmter Moleküle und tumorspezifischer Gene voneinander unterschieden werden können (Tahara 1993; Tahara 1995).

Dazu zählen die Mutation und Verlust von E-Cadherin/ β -Catenin und die Mutation und Verlust von *p53*, wobei *p53* bei diffusen Magenkarzinomen eher früh verändert wird und der intestinale Typ keine E-Cadherin-Mutationen zeigt (Tahara 1993; Tahara 1998; Tahara et al 1996; Tahara et al 1999). Die E-Cadherin-Mutationen in diffusen Magenkarzinomen wurden erstmals in den Instituten für Pathologie der TU München und des GSF Forschungszentrums in Neuherberg von der Arbeitsgruppe von Herrn PD. Dr. K.-F. Becker und Herrn Prof. Dr. H. Höfler (Becker et al 1994) beschrieben.

Diffuser Typ

Verlauf: Genetische
Veränderungen:



Intestinaler Typ

Verlauf: Genetische
Veränderungen:

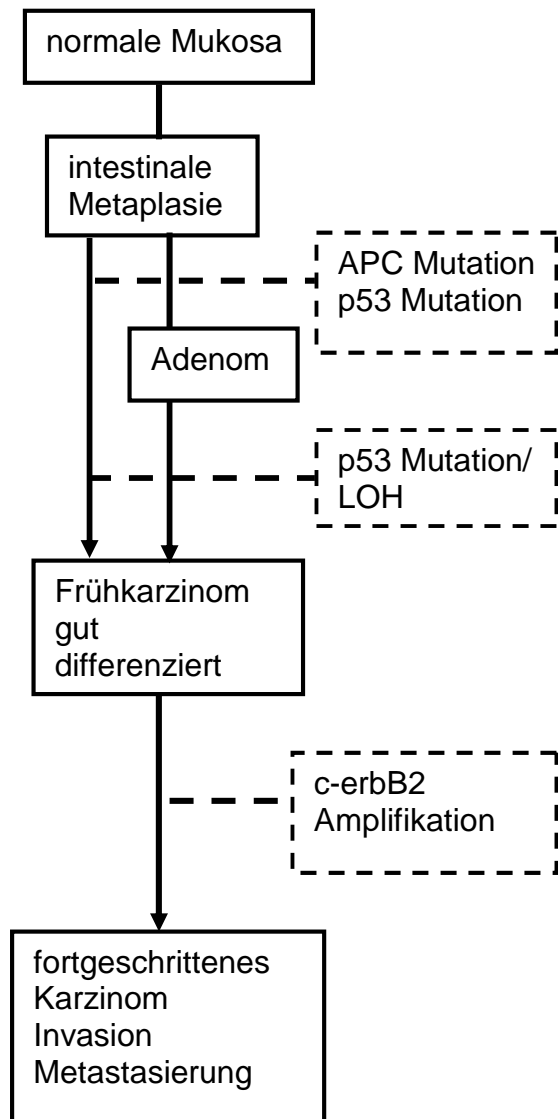


Abbildung 1: Genetische Veränderungen bei Magenkarzinomen (Tahara 2000, modifiziert). Auf dem Weg von normaler Mukosa zum Karzinom finden verschiedene genetische Veränderungen statt, die jedoch bei diffusem und intestinalem Typ in Art und Zeitpunkt unterscheiden. Der Fortschritt der Karzinomentstehung erfolgt beim diffusen Typ über ein Frühkarzinom zum fortgeschrittenen Karzinom, während das Magenkarzinom vom intestinalen Typ über eine intestinale Metaplasie und/oder Adenom entsteht.

1.1.4 Lokalisation und Einteilung/Klassifikation

Der Magen wird in folgende drei anatomische Regionen eingeteilt: das obere Drittel (Kardia und Fundus), das mittlere Drittel (Korpus), sowie das untere Drittel (Antrum und Pylorus). Der Tumor wird dabei der Region mit der größten Tumormasse zugeteilt. Als häufigster Manifestationsort gilt der Antrum- und Korpusbereich. In einer Studie in den USA (Wanebo et al 1993) lagen 31 % der Karzinome im oberen, 14 % im mittleren und 26 % im unteren Drittel. Bei 10 % lag ein Befall des gesamten Magens vor. Es wurde auch beobachtet, dass die kleine Krümmung häufiger betroffen ist als die große. Es liegt jedoch eine Zunahme der Adenokarzinome im proximalen Magen und gastro-ösophagealen Übergang vor, die sich in den letzten Jahren verdoppelt bis verdreifacht hat.

Histopathologisch werden verschiedene Typen unterschieden (Hamilton and Aaltonen 2000):

- Adenokarzinom
 - tubuläres
 - papilläres
 - muzinöses
- Siegelringzellkarzinom
- Adenosquamöses Karzinom
- Plattenepithelkarzinom
- Kleinzelliges Karzinom
- Undifferenziertes Karzinom
- Sonstige

Adenokarzinome sind entweder drüsige Tumorzellverbände in Form von tubulären, azinären oder papillären Strukturen oder als diffus im Gewebe gestreute Herde unterschiedlichster Morphologien.

Im Laufe der Zeit wurden viele Klassifikationen entwickelt, jedoch werden heute zumeist die der Welt Gesundheitsorganisation (WHO) (Hamilton and Aaltonen 2000) und die von Laurén (Laurén 1965) verwendet, welche nachfolgend kurz beschrieben werden. Während die WHO die Tumoren nach ihrem vorherrschenden Erscheinungsbild beschreibt (siehe Auflistung oben), unterteilt Laurén (Laurén 1965) seine Klassifikation in zwei große

Gruppen, nämlich das Magenkarzinom vom intestinalen und diffusen Typ. Etwa 46 % aller Magenkarzinome sind dem intestinalen, 36,5 % dem diffusen Typ zuzurechnen.

Tumoren, die zu gleichen Teilen beide Typen enthalten, werden als Mischtyp (15-20 %) bezeichnet und sollten grundsätzlich dem diffusen Typ zugeordnet werden.

Der intestinale Typ (epidemische Form) entsteht zumeist auf dem Grund einer intestinalen Metaplasie über eine Dysplasie und besteht aus drüsigen Tumorzellen, die alle Differenzierungsgrade aufweisen können. In seiner Gänze weist dieser Tumortyp ein zusammenhängendes Areal auf und breitet sich kontinuierlich aus.

Im Gegensatz dazu besteht das diffuse Magenkarzinom (endemische Form) aus nicht zusammenhängenden Tumorzellen, welche die Magenwand als Einzelzellen oder in kleinen Tumorzellverbänden durchsetzen.

Die endemische Form nimmt in der Häufigkeit nicht wesentlich ab, da hier eher individuelle Faktoren diskutiert werden, während die epidemische Form deutlich von Umwelteinflüssen geprägt wird und abnimmt.

Von chirurgischer Seite besteht hierbei noch das Problem, dass die makroskopisch feststellbare Tumorgrenze vielfach nicht der mikroskopischen entspricht und auch noch weit vom Resektionsrand entfernt Tumorzellen gefunden werden können.

1.1.5 Invasivität und Metastasierung

Die Fähigkeit einer Tumorzelle, sich aus dem Verband mit anderen Tumorzellen zu lösen, erfolgt in drei Schritten (Böcker et al 2001):

1. Werden die interzellulären Kontakte gelöst, damit sich die Zelle(n) lösen kann/können. Eine wichtige Gruppe von Proteinen, die diese interzellulären Kontakte ermöglichen, sind hierbei die Cadherine. Ein wichtiges Zelladhäsionsmolekül für die Metastasierung ist CD44, das vielfach Varianten aufweist. Diese Varianten werden v.a. in Tumoren überexprimiert (Tahara 1995).

Beim diffusen Magenkarzinom konnte gezeigt werden, dass das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin in 50% der Fälle mutiert ist (Becker et al 1994) und darin wird eine mögliche Ursache des verstreuten Tumorwachstums gesehen. Als Transmembranprotein stellt es über die sogenannten Catenine (α , β und γ) die Verbindung zum Aktin-Zytoskelett her. Dabei hängt die Ablösetendenz der Zellen aus ihrem Verband aber noch vom Phosphorylierungszustand der Catenine ab und dieser wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert und es kommt zu einer Phosphorylierung von β -Catenin. Die Zellen

können dann sehr leicht dissoziieren (Hirohashi 1998; Stockinger et al 2001; Tahara 2000).

2. Erfolgt dann ein enzymatischer Umbau des umliegenden Gewebes und der Durchtritt der Zelle(n) durch die Basalmembran. Dieser Vorgang wird durch verschiedene Enzyme, wie Kollagenasen und Hyaluronidasen der Tumorzellen ermöglicht.

Jetzt wandert/wandern die Zelle(n) aktiv mit Hilfe ihrer Aktinfilamente durch die enzymatisch angedauten Gewebsspalten entlang eines Gradienten.

3. Folgt jetzt der Schritt der Metastasierung, die Verschleppung und Neuansiedelung der Tumorzellen entfernt vom Primärherd. Zuerst gelangen die Zellen in Blutgefäße, Lymphgefäße oder Körperhöhlen (Intravasation), um dann in diesen Gefäßen durch Flüssigkeitstransport in das nächste Stromgebiet zu wandern. Hier kann dann durch die Extravasation eine Neuansiedelung erfolgen und man spricht von einer Tochtergeschwulst. Dieser Vorgang ist immunologischen Abwehrmechanismen des Organismus unterworfen, dem die Tumorzellen nur mit hohem Aufwand entkommen. Um den tumoriziden Faktoren des Blutes zu entgehen, umgeben sich die Tumorzellen zum Schutz - durch Aktivierung lokaler Gerinnungsfaktoren- mit einem Embolus. Dadurch kommt es zu einer Anhaftung an der Gefäßwand, durch die die Zellen dann selektiv durchtreten können. Je nach Organ unterscheiden sich die Liganden, an die die Rezeptoren der Zellen (Adhäsionsmoleküle, Lektinrezeptoren) binden, um die Basalmembran zu übertreten und sich anzusiedeln und zu vermehren.

1.1.6 Prognosefaktoren und Therapie

Wie bereits oben erwähnt, ist die Prognose bei Magenkarzinomen, v.a. der weit fortgeschrittenen sehr schlecht. So wird die 5-Jahresüberlebensrate nach Operation bei R_0 Resektion mit nur 45% oder weniger beschrieben. Bei R_1 oder R_2 ist die Überlebensrate nahezu gleich Null (Herold 2001).

Frühkarzinomen mit einem in die Tiefe begrenzten Wachstum wird eine bessere Prognose zu teil, da sich der Tumor auf Mukosa (M-Typ) oder Submukosa (S-Typ) in seinem Wachstum beschränkt.

Der wichtigste Faktor für das Überleben ist daher nach wie vor bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes die Früherkennung und das Resektionsausmaß. Hierunter versteht man den makroskopisch und mikroskopisch im Gesunden resezierten Tumor (R_0).

Je nach Lokalisation erfolgt eine subtotale oder totale Gastrektomie einschließlich Lymphadenektomie in den Abflußgebieten.

Da aber bereits zwei Drittel der Patienten mit Magenkarzinom bei Diagnosestellung lokal fortgeschrittene Tumoren und/oder Fernmetastasen zeigen, ist es notwendig, eine möglichst effektive systemische Therapie anzubieten.

Bei anfangs inoperablen Tumoren bietet sich die Möglichkeit der präoperativen neoadjuvanten Chemotherapie, die zur Tumorverkleinerung und einer möglichen (R₀)-Resektion führen kann. Indikationen zur Chemotherapie sind lokal fortgeschrittene Tumorstadien, keine vorliegende Peritonealkarzinose und ein guter Allgemeinzustand des Patienten. Obwohl das Magenkarzinom zu den weniger chemosensiblen Tumoren gehört, kann trotzdem immer wieder ein Rückgang der Tumormassen erreicht werden, in einigen Fällen sogar der Tumor völlig verschwinden (Remission) (Wilke et al 2001), vor allem dann, wenn die Tumoren lokal bereits weit fortgeschritten sind.

Der postoperative Einsatz von Chemotherapeutika dagegen erklärt sich durch die hohe Rezidivrate von primär (R₀) resezierten Tumoren. Eine Studie aus den USA zeigt, dass durch den postoperativen Einsatz einer Chemotherapie plus Radiochemotherapie die Gesamtüberlebensrate deutlich erhöht wird (MacDonald et al 2001). Mögliche Therapieprotokolle umfassen verschiedene Chemotherapeutika, die zumeist in der Kombination wirksamer sind als in der Einzelgabe.

Es gibt verschiedene Substanzen, zu den wirksamsten gehören Cisplatin, 5-FU und Etoposid. Meistens handelt es sich um eine Kombination dieser Wirkstoffe wie z.B. EFP (Etoposid/5-FU/Cisplatin) oder ELF (Etoposid/Leukovorin/5-FU) (Janunger et al 2001), es kann aber auch eine Monotherapie mit 5-FU erfolgen. Die Kombination ELF wird eher bei kardial stabilen und bei gutem Allgemeinzustand verwendet, während 5-FU, kombiniert mit Leukovorin bei ausgedehnter Metastasierung und schlechtem Allgemeinzustand eingesetzt wird.

In den letzten Jahren gewinnen aber auch zunehmend molekularbiologische Marker an Bedeutung, die bei der Diagnostik und Verlaufskontrolle eingesetzt werden. Viele Tumoren exprimieren eine Vielzahl an Molekülen, um sich primär aus dem Tumorzellverband zu lösen oder weisen Störungen in der Zelladhäsion auf. Meist sind Zellzyklus und interzelluläre Interaktionen so gestört, dass ein geregeltes Zellwachstum nicht mehr stattfinden kann und es zu einer zellulären Dysregulation kommt.

Als möglicherweise prognostisch relevante Faktoren für maligne Magentumoren zeigten sich Bcl-2, p53, E-Cadherin und β -Catenin, sowie das Vorliegen disseminierter Tumorzellen (Becker et al 2000; Yonemura et al 1995).

Für die Therapie von malignen Magentumoren ist es jedoch nicht sinnvoll, alleine anhand von molekularbiologischen Parametern das therapeutische Vorgehen zu planen. Sie sollten vielmehr als ergänzende Parameter dienen.

Die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Gene werden nachfolgend näher diskutiert.

1.1.7 Apoptose-relevante Gene

Die zuerst von JFR Kerr beschriebene Apoptose (Kerr et al 1972) ist ein physiologischer Vorgang und wird durch eine Vielzahl von Faktoren ausgelöst. Dabei handelt es sich um einen programmierten Zelltod. Die Signalübermittlung erfolgt über eine Reihe von Molekülen, die dann letztendlich zum kontrollierten Zelltod führen. Im Gegensatz zur Nekrose kommt es hierbei auch nicht zur Freisetzung intrazellulärer Enzyme und einer nachfolgenden lokalen Entzündungsreaktion.

Durch den programmierten Zelltod werden vom Organismus unbenötigte oder geschädigte Zellen kontrolliert beseitigt und den Phagozytosesystemen zugeführt, ohne zelluläre Enzyme freizusetzen (Hofmann 1999). So wird normalerweise der menschliche Körper vor genetisch veränderten Zellen geschützt. Sind diese Mechanismen jedoch gestört, kommt es zur Krebsentstehung. Der Körper kann dann nicht mehr kontrollieren, welche Zellen in die Apoptose gelenkt werden sollen und genetisch veränderte Zellen können überleben und zu unkontrolliertem Zellwachstum mit Tumorentwicklung führen. Die wichtigsten in die Apoptose involvierten Proteine sollen nun im folgenden näher beschrieben werden.

p53

p53 ist eines der meist erforschten Gene, unter anderem, weil es sehr häufig in mutierter Form in menschlichen und animalen Tumoren zu finden ist (Prives and Hall 1999). Es wurde als erstes als ein zelluläres Protein beschrieben, das an Simian Virus 40 T-Antigen bindet (Lane and Crawford 1979; Linzer and Levine 1979).

Als Tumorsuppressorgen fällt ihm eine zentrale Rolle zu. Mutationen an wichtigen Stellen des Genoms führen zu Fehlregulationen und maligner Entartung. Je nach den Erfordernissen der Zelle führt *p53* entweder zum programmierten Zelltod (Apoptose) oder es zwingt die Zelle zum Wachstumsstop (Bates and Vousden 1999; Hofmann 1999). Die Zellen werden dadurch eliminiert oder können Genomschäden mittels Reparaturenzymen ausgleichen und dann wieder in Teilung gehen.

Diese Mechanismen unterliegen jedoch dem Zusammenspiel mit vielen weiteren, zum Teil noch nicht erforschten anderen zellulären Molekülen, durch die diese komplexen Zellregulationsschritte stattfinden können (Prives and Hall 1999).

Normalerweise findet sich *p53* in hoher Konzentration in tumorös veränderten Zellen, in denen eine Punktmutation zur Akkumulation geführt hat. In ruhenden Zellen sollte ein niedriges Level an *p53*-Protein herrschen (Lee et al 1998).

Durch Mutation eines von zwei Allelen von *p53* und Verlust des zweiten wird in Tumorzellen *p53* inaktiviert und durch mutiertes *p53* ersetzt (Böcker et al 2001). Dies entspricht auch der sogenannten *two-hit* Mutationshypothese von Knudson (Knudson 1971). Für den Verlust des Allels wird eine Deletion auf dem *p53*-Lokus verantwortlich gemacht (Kobayashi et al 1996). Die Zelle kann somit Schädigungen und Instabilitäten des Genoms nicht mehr kontrollieren und es kommt zu ungehemmtem Wachstum (Cadwell and Zambetti 2001). *p53* reichert sich im Kern an und kann somit immunhistochemisch nachgewiesen werden (Werner et al 2001).

Struktur und Funktion von p53

Das Tumorsuppressorgen *p53* ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p) lokalisiert und kodiert für ein 53-kD großes nukleäres Phosphoprotein mit 393 Aminosäuren (Cadwell and Zambetti 2001; Hollstein et al 1991). In erster Linie wirkt es, aktiviert durch Stressoren jeglicher Art, als Transkriptionsfaktor und induziert eine Reihe von nachgeschalteten Genen. Das Wildtyp *p53*-Protein bleibt im Zellkern und hat eine sehr kurze Halbwertszeit. In normalen Zellen ohne Einfluss von Stressoren liegt sie im Bereich von 5-20 min. Das Gen besteht aus 11 Exons, wovon Exon 2-11 für das 393 Aminosäuren lange Protein kodiert (Greenblatt et al 1994). Liegt eine Schädigung des Genoms vor, wird das Protein so gefaltet, um sich an die DNA anlagern zu können. Die beste Bindung zur DNA liegt dann vor, wenn sich vier *p53* Moleküle zu einem Tetramer zusammenlagern, wobei die Tetramerisierungsregion von der DNA-Bindungsregion entfernt liegt. Die Region für die Aktivierung der Transkription liegt am N-terminalen Ende und wird durch verschiedene Moleküle, wie Onkogene, beeinflusst. Nach der Bindung der Transkriptionsfaktoren folgt nun die Bildung von mRNA, die dann weitere Zielgene aktiviert, von denen zwei besonders erläutert werden, welche auch die unterschiedliche Wirkung von *p53* aufzeigen.

1. Handelt es sich dabei um ein Gen, das für *p21^{WAF1/CIP1}* kodiert. Dieses kleine Protein bindet an Komplexe aus G1-Phase-Cyclinen und Cdk2-Protein. Diese lenken die Zelle über die G1-Phase hinaus in den Zellzyklus. *p21^{WAF1/CIP1}* inhibiert die Kinase dieser

Komplexe und dadurch wird der Eintritt in die S-Phase und die damit verbundene DNA-Replikation verhindert (Levine 1997; Prives and Hall 1999).

2. Spielt das proapoptotische Protein *bax* eine Schlüsselrolle. Dieses weist in seiner Promotorregion Bindungsstellen für *p53* auf und wird durch DNA-Schädigung und *p53* hochreguliert. Die Lokalisation dieses Proteins sind intrazelluläre Membranen, v.a. mitochondriale. Es wird auch vermutet, dass *bax* zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien führt und dieses Enzym dann letztendlich in einer Aktivierung von Caspasen in kaskadenartiger Weise mündet. Durch *bax* wird innerhalb sehr kurzer Zeit dann der Zelltod herbeigeführt (Bates and Vousden 1999).

Ebenfalls am N-Terminus greift das Protein Mdm2 nach Behebung eines DNA-Schadens in die Regulation von *p53* ein. Dieses Protein führt *p53* dem Abbau durch eine Ubiquitin-vermittelte Proteolyse zu und darüberhinaus verhindert es die Bindung von *p53* an die transkriptionsrelevanten Stellen des Genoms. Der C-Terminus ist mit verantwortlich für die DNA-Bindungsaktivität. Beide Domänen, N- wie C-Terminus, werden posttranslational durch Phosphorylierung bzw. Acetylierung modifiziert, sind jedoch nur sehr selten mutiert (Prives and Hall 1999).

Mutationen im p53-Gen

Mutationen in *p53* führen zu stabilen Genprodukten, die man in diffusen wie auch intestinalen Magenkarzinomen findet (Lim et al 1996; Teh and Lee 1994). Beim diffusen Magenkarzinom wird den *p53* Mutationen jedoch eine große Rolle in der Tumorprogression zu gesprochen (Brito et al 1994; Ranzani et al 1995). Im Gegensatz zu den Mutationen anderer Tumorsuppressorgene handelt es sich dabei in über 75% der Fälle um *missense*-Mutationen, die zum Austausch einer Aminosäure gegen eine andere führen (Guimaraes and Hainaut 2002). Im übrigen findet man *Deletionen* oder *LOH* (*loss of heterozygosity*). Die Mutationen befinden sich v.a. in den Exons 5-8, in der DNA bindenden Region des Genoms. Die übrigen Exons enthalten extrem selten genetische Veränderungen (entnommen dem WorldWideWeb, einsehbar unter <http://www.iarc.fr/p53/home.htm> oder IARC TP53 database; Stand 5.6.2004).

Die DNA-Bindungsdomäne weist eine sehr komplexe Struktur auf, die aus zwei mit Loops und Helices stabilisierten β -Faltblättern besteht. Die Stabilität dieser Struktur ist auf ein Zinkatom zurückzuführen. In dieser Region finden sich die sogenannten *hot spot* Regionen, die über 30% aller Mutationen (Hollstein et al 1991) enthalten und in den meisten Tumoren gefunden werden können. In diesen Regionen kommen gehäuft Cytosine vor, die dann in Thyminen durch Deaminierung umgewandelt werden. Aber auch

hier können exogene Karzinogene in Frage kommen, die v.a. innerhalb dieser Regionen zu Mutationen führen (Guimaraes and Hainaut 2002). Eine wichtige Rolle kommt diesen Regionen im DNA-Kontakt und der Konformation des Proteins zu.

Der Verlust des Wildtyps und somit der Funktion als Tumorsuppressorgens, die fehlende Tetramerisierung durch mutierte Formen und der Überlebensvorteil durch den Verlust von Wildtyp-*p53* führen zusammen zur Tumorprogression.

Im Falle des diffusen Magenkarzinoms handelt es sich bei den *p53*-Mutationen um ein eher frühes Ereignis im Tumorgeschehen (Tahara 2000).

Ein großer Anteil der *p53*-Mutationen (> 90%) befindet sich in der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne und mehr als 50% führen zu einer Kodonveränderung bzw. einem Aminosäureaustausch in der gleichen Domäne. Es handelt sich hierbei um die Kodons 175, 248, 249, 273 und 282 (Levine 1997). Diese Veränderungen wurden bereits früher beschrieben (Tabelle 1).

Tabelle 1: Häufige Mutationen im *p53*-Genom (Kodon 1-393) von Magenkarzinomen (Fricke et al 2003; Seruca et al 1994); auch einsehbar im World Wide Web unter <http://www.iarc.fr/p53/homepage.htm> und p53.genome.ad.jp/p53sch011.html; Stand 5.6.2004). Viele *p53* Mutationen befinden sich in der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne und können zu einer Kodonveränderung bzw. einem Aminosäureaustausch führen.

Codon	Nukleotide	Aminosäureaustausch
161	GCC>ACC	Ala-Thr
173	GTG>ATG	Val-Met
175	CGC>CAC	Arg-Hist
213	CGG>CAG	Arg-Gln
244	GGC>GGT	Gly-Gly
245	GGC>AGC	Gly-Ser
248	CGG>CAG	Arg-Gln
249	AGG>AAG	Arg-Lys
273	CGT>TGT	Arg-Cys
282	CGG>TGG	Arg-Trp

p53 Mutationen gibt es in praktisch allen Tumoren. Untersucht man die Häufigkeit der *p53*-Mutationen in diesen Tumoren, so werden bei Entartungen im respiratorischen System

und Kolorektum sehr oft Mutationen gefunden (je ca. 13%), während sie bei Magenkarzinomen etwas geringer ausfallen mit ca. 5% (entnommen aus dem World Wide Web, einsehbar unter <http://www.iarc.fr/p53/>; Stand 5.6.2004).

Bcl-2

Der anti-apoptotische Marker Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) wurde zuerst in hämatologischen Erkrankungen, wie Lymphomen, entdeckt (Ngan et al 1988; Tsujimoto and Shimizu 2000) und nach ihnen benannt. Aber auch in anderen Tumoren wie z.B. kolorektalen Tumoren findet man eine Überexpression von Bcl-2 (Berghella et al 1998). Das Onkoprotein Bcl-2 - in unverändertem Zustand - schützt Zellen vor dem programmierten Zelltod (Hockenbery et al 1990) und ist dadurch ein Gegenspieler von p53, wie einige andere Proteine aus der Bcl-2 Familie. Beim diffusen Magenkarzinom gilt Bcl-2 als prognostischer Marker. Diffuse Magenkarzinome zeigen eine stärkere Expression von Bcl-2 als die vom intestinalen Typ (Krajewska et al 1996).

Gen, Struktur und Funktion von Bcl2

Der Genort des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 liegt auf Chromosom 18q21.3 mit einem relativen Molekulargewicht von 25.000. Es liegt bei dieser Grunderkrankung oft eine reziproke Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ vor, die in der Folge zu einer Fehlregulation des Proteins führt (Petros et al 2001).

Aber auch in vielen anderen Tumoren kann man eine Überexpression von Bcl-2 finden, auch wenn keine Translokation vorliegt, sondern die Schädigung an anderer Stelle der Signalweiterleitung stattfindet (Pezzella et al 1990).

Es ist ein integrales Membranprotein, das mehr in der Zelle als an der Oberfläche liegt und mit verschiedenen intrazellulären Organellen in Verbindung steht. Durch Immunlokalisationstudien (Hockenbery et al 1990) konnte Bcl-2 an der inneren Mitochondrienmembran entdeckt werden. Durch Überexpression blockiert es den Zelltod (Apoptose) und führt daher zu einer Störung der Homöostase. Es ist das einzige Proto-Onkogen, das in den Mitochondrien lokalisiert und zudem noch unabhängig vom Zellteilungsvorgang ist.

Wird nun in einer Zelle der apoptotische Vorgang in Gang gesetzt, werden pro-apoptotische Proteine durch post-translationale Veränderungen oder Konformationsänderung aktiviert. Dies führt zu einer Permeabilitätserhöhung für Cytochrom C ins Zytosol. Wenn es im Zytosol angelangt ist, aktiviert Cytochrom C eine Kaskade von Kaspasen, die zum Zelltod führen (Antonsson 2001).

Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 verhindert sowohl die Freisetzung als auch die Aktivierung der Kaspasen (Bates and Vousden 1999). Nach einem neueren Modell könnte die Aktivierung von Bcl-2 aber auch noch vom Phosphorylierungszustand des Proteins abhängig sein. Danach wird, wenn Bcl-2 an vielen Stellen phosphoryliert wird, der Zelltod eingeleitet, während in Zytokin-abhängigen Zelllinien die Phosphorylierung eine anti-apoptotische Wirkung zeigt (Blagosklonny 2001b). Es wird auch postuliert, dass eine Überexpression von Bcl-2-Protein ein Marker für Chemosensitivität oder bessere Prognose sein könnte (Blagosklonny 2001a).

1.1.8 Proliferationsmarker

Maligne Tumoren zeichnen sich oft durch sehr schnelles Wachstum aus, anhand von Proliferationsmarkern kann die Zellteilungsrate näherungsweise erfasst werden.

Ki-67-Funktion und Struktur

Das Proliferationsantigen Ki-67 ist auf Chromosom 10 lokalisiert (Fonatsch et al 1991). Bei dem Genprodukt handelt es sich um ein im Kern lokalisiertes Protein, das mit Zellproliferation in Verbindung gebracht wird und im Zellzyklus in der G₁, S, G₂ und M-Phase, aber nicht in ruhenden Zellen gefunden wird (Scholzen and Gerdes 2000). Es eignet sich daher besonders zum Nachweis sich in Teilung befindlicher Zellen. Nach Beendigung des Zellzyklus wird das Protein abgebaut und erscheint daher auch nicht in der G₀-Phase und während der DNA-Reparatur.

1.2 E-Cadherin

E(epitheliales)-Cadherin gehört zur Gruppe der interzellulären Zelladhäsionsmoleküle (ICAM) und gewinnt immer mehr an Bedeutung, letztendlich durch die zunehmende Forschung an der Entstehung von Brust- und Magenkarzinomen.

Neben seiner wachstumsinhibierenden Funktion wird es als Tumorsuppressorgen beschrieben und liegt gehäuft in invasiven Tumoren und Metastasen herunterreguliert oder mutiert vor (Birchmeier and Behrens 1994; Hirohashi 1998; Vleminckx et al 1991). Zahlreiche Versuche mit Zellkultur und Mäusen bestätigen die hemmende Wirkung von Wildtyp E-Cadherin beim Zellwachstum (Hermiston and Gordon 1995; Kandikonda et al 1996; Miyaki et al 1995; Navarro et al 1991; Stockinger et al 2001; Takahashi and Suzuki

1996; Watabe et al 1994). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass E-Cadherin-Mutationen in die Entstehung und Progression von diffusen Magenkarzinomen involviert sein können (Becker et al 1994; Berx et al 1998b; Machado et al 1999; Muta et al 1996; Tamura et al 1996). Als mögliche Ursache für die Entstehung von Magenkarzinomen könnte die DNA-Methylierung, v.a. des Promotors, eine große Rolle spielen. Diese Veränderung verhindert möglicherweise die Transkription auch von Tumorsuppressorgenen wie E-Cadherin (Fang and Xiao 2001).

Neben den in den meisten Fällen sporadisch entstandenen diffusen Magenkarzinomen konnte man in Familien mit gehäuft nachweisbaren Fällen von diffusen Magenkarzinomen Keimbahnmutationen im E-Cadherin-Gen finden (Gayther et al 1998; Guilford et al 1998; Keller et al 1999).

1.2.1 Struktur und Funktion von E-Cadherin

Von allen Cadherinen nimmt E-Cadherin bei epithelialen Geweben die wichtigste Rolle ein. Das humane E-Cadherin-Gen (CDH1) ist auf Chromosom 16q22.1 lokalisiert und kodiert für ein 120-kDa großes Transmembran-Protein.

Insgesamt weist es 16 Exons mit 100kb auf (Berox et al 1995a; Takeichi 1991).

Es wird als Vorläuferprotein synthetisiert und bis zum Entstehen des endgültigen Proteins werden eine Signal- und Vorläufersequenz abgespalten.

Das Protein wird dann in die Zellmembran eingebaut, so dass fünf Domänen extrazellulär zu liegen kommen.

Bei E-Cadherin handelt es sich um ein Ca^{++} -abhängiges Zell-Zelladhäsionsmolekül, das sich an der lateralen Seite der Zellen befinden und homophile Kontakte knüpft (Takeichi 1991).

Es sind für den Zusammenhalt der Zellen aber auch noch die an E-Cadherin gekoppelten intrazellulären Proteine notwendig.

Das sind das β -Catenin und γ -Catenin/Plakoglobin im Zytoplasma, die die intrazelluläre Domäne mittels α -Catenin mit dem Aktinzytoskelett verbinden und als Brückenmoleküle fungieren (Gumbiner 2000; Kemler 1993).

Es weist durch nachgeschaltete Faktoren, wie Zellzyklusregulation und Apoptose Signalfunktion auf (Behrens et al 1996). Freies β -Catenin wird durch einen Multiproteinkomplex, der das adenomatöse Polyposis Coli-(APC)-Protein enthält, phosphoryliert und dadurch für den proteolytischen Abbau markiert.

Eine onkogene Aktivierung dieses Proteins erfolgt, wenn das APC-Tumorsuppressorgen inaktiviert wird oder eine Mutation im β -Catenin selbst vorliegt.

Zudem wurde gefunden, dass β -Catenin nicht nur in den Zelladhäsionsvorgang involviert ist, sondern noch eine wichtige Funktion im Signalweg (wnt/wingless) einnimmt (Hirohashi 1998). Desweiteren wird die Zellproliferation noch durch einen anderen Weg inhibiert. Dieser schließt die Hochregulation des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p27^{KIP1} (St Croix et al 1998) ein und reguliert somit das Zellwachstum mit. Veränderungen in diesen Proteinen können dann zu einer sehr komplexen Funktionsstörung und maligner Entartung führen.

1.2.2 E-Cadherin-Mutationen

Das E-Cadherin-Gen als wichtiges Schlüsselprotein in der Zelladhäsion liegt in Tumoren sehr oft in mutierter Form vor oder fehlt sogar ganz (Van Aken et al 2001). In der jüngeren Vergangenheit wurden verschiedene Mutationen im E-Cadherin entdeckt, die Zahl lag 1998 bei 69 somatischen Mutationen (Berx et al 1998a).

Besonders gut erforscht sind diese Mutationen in nach Laurén klassifizierten diffusen Magenkarzinomen und invasiven lobulären Mammakarzinomen, wobei sogar die Mutationsarten unterschieden werden können. Während es sich beim Magenkarzinom meist um *splice site*-Mutationen handelt, so fehlen beim Mammakarzinom häufig nur einige Fragmente des E-Cadherin-Gens, die zu Stopkodon-Mutationen führen können (Becker et al 1994; Becker et al 1993; Berx et al 1998b; Muta et al 1996; Tamura et al 1996).

E-Cadherin-Mutationen greifen in das zelluläre Netzwerk ein und verändern die Zellmorphologie und die Motilität, so dass das Erscheinungsbild eher mesenchymalen als epithelialen Zellen ähnelt und die Zelladhäsion ab und die Motilität zunimmt (Handschuh et al 1999; Lubber et al 2000). So sind auch Mutationen im E-Cadherin-Gen gehäuft in die Progression von differenzierten in undifferenzierte Tumoren involviert (Tamura 2002). Im Zusammenhang mit den oben genannten Tumoren wird E-Cadherin als wichtiger Faktor für den Gewebezusammenhalt und als Suppressor von Invasion und Metastasierung gesehen.

Darum lag das Interesse v.a. auf Seiten der extrazellulären Domäne des Proteins, da es für die zellulären Verbindungen verantwortlich ist. Bisher konnten E-Cadherin-Mutationen nur in diffusen Magenkarzinomen - Becker et al. zeigten Mutationen in 50 % der Fälle - nachgewiesen werden, jedoch nicht beim intestinalen Typ (Becker et al 1994). Im Falle

des diffusen Magenkarzinoms wurden *inframe* Deletionen in Exon 8 und 9 und zudem noch eine *Punktmutation* in Exon 8 gefunden und detailliert untersucht. Bei der Punktmutation kommt es zum Austausch von Asparaginsäure durch Alanin (Abbildung 2). Möglicherweise führen diese Veränderungen zu einer anderen Faltung des Proteins und zu einer verminderten Calciumbindung. Die veränderte Zellmorphologie sowie eine veränderte Organisation des Aktinzytoskeletts sind bereits gezeigt worden (Handschuh et al 1999). Möglicherweise lösen sich die mutierten Zellen darum viel leichter aus dem Zellzusammenhalt und können sich diffus im Gewebe ansiedeln, was v.a. bei Mutationen in Exon 8 beobachtet wurde, die zudem zu einer Veränderung des Aktin-vermittelten Zytoskeletts führen (Handschuh et al 1999).

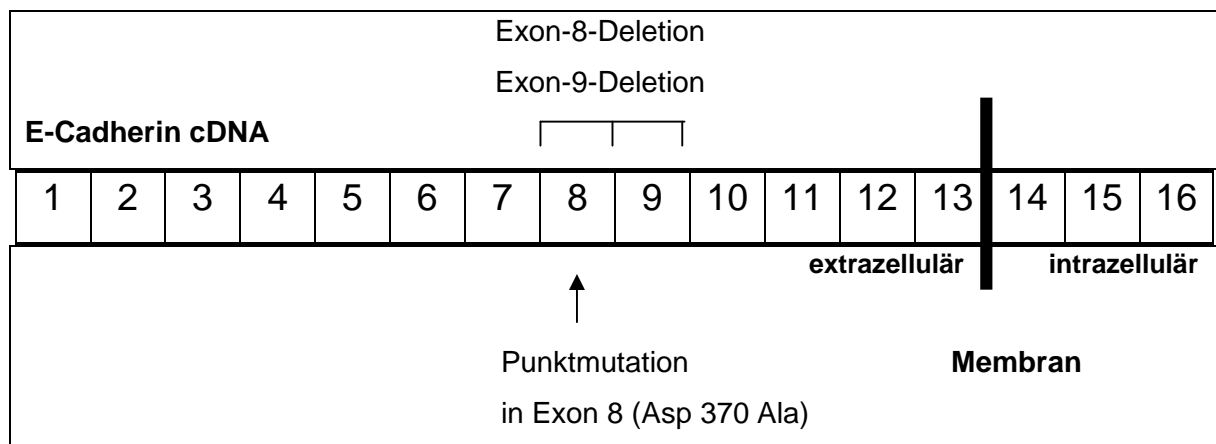


Abbildung 2: Häufige E-Cadherin-Mutationen beim diffusen Magenkarzinom. Die häufigsten somatischen E-Cadherin-Mutationen betreffen die Exons 8 und 9 (*in frame*-Deletionen oder Punktmutation). Durch die dargestellten Mutationen gehen potenzielle Calcium-Bindungsmotive verloren. Die Punktmutation in Exon 8 führt zum Ersatz der Aminosäure Asparaginsäure (Asp) an Position 370 durch Alanin (Ala).

1.2.3 Die Rolle von E-Cadherin bei der Apoptose

Man weiß aus vielen Untersuchungen zur Apoptose, dass Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen Zellen vor Apoptose schützen (Day et al 1999; Kantak and Kramer 1998; Metcalfe and Streuli 1997) und dass der Verlust von Zell-Matrix-Interaktionen bei epithelialen Zellen Apoptose auslöst (Frisch and Francis 1994). Der genaue Mechanismus der anti-apoptotischen Funktion von E-Cadherin ist unbekannt, es gibt aber zwei Modelle, die sich damit beschäftigen. Das ist zum einen das Modell von Kantak und Kramer. Das besagt, dass durch den Verlust von Interaktionen ausgelöste Apoptose verhindert werden

kann, wenn die Zellen E-Cadherin-vermittelte Bindungen eingehen und dadurch anti-apoptotische Wege aktivieren (Kantak and Kramer 1998). E-Cadherin fungiert somit als Tumorsuppressorgen, dessen Funktion durch Mutationen oder Veränderungen in den nachgeschalteten Proteinen beeinträchtigt wird. Ein weiteres Modell besagt, dass möglicherweise auch die Funktion von E-Cadherin-assoziiertem β -Catenin, welches sogenannte Protoonkogene wie *c-myc* (He et al 1998) und *c-jun* (Mann et al 1999), die in den Zellen in die Apoptoseregulation involviert sind, reguliert (Peluso 2000). Zudem spielt der EGF (epidermal growth factor)-Rezeptor eine Rolle, der mit dem Cadherin-Catenin-Komplex assoziiert ist und somit möglicherweise die EGF-induzierte Signaltransduktion gestört wird (Hoschuetzky et al 1994).

1.3 Problemstellung

Die Voruntersuchungen zu diffusen Magenkarzinomen ergaben, dass diese in 50 % der Fälle Mutationen im E-Cadherin-Gen aufweisen (Becker et al 1994). Durch diese Mutationen zeigen die Zellen ein verändertes Verhalten bei der Zelladhäsion und Motilität. Möglicherweise kommt es durch ein mutiertes E-Cadherin zu einer veränderten Signalweiterleitung und zu einer Zunahme der Überlebensfähigkeit. In zellkulturellen Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass MDA-MB-435S-Zellen, die mit mutiertem E-Cadherin transfiziert wurden, deutlich resistenter gegenüber dem Entzug von Wachstumsfaktoren waren als der Wildtyp. Es war darum das Ziel dieser Arbeit, den Einfluß von tumor-assoziiertem E-Cadherin auf das apoptotische Verhalten von Tumoren näher zu untersuchen.

Krebszellen weisen häufig Veränderungen in der zellulären Regulation des programmierten Zelltodes auf. Es ist daher von großer Bedeutung, einen möglichen Grund für den Überlebensvorteil mutierter Zellen zu suchen.

Zum einen wurde vergleichend die zelluläre Antwort auf externe Apoptosestimuli von intaktem und mutiertem E-Cadherin charakterisiert, zum anderen sollten immunhistochemische und molekulargenetische Untersuchungen Aufschluß über den Einfluß von intaktem oder mutiertem E-Cadherin auf die Expression apoptose-assoziiierter Gene geben.

Ziel war es, bei bekanntem E-Cadherinstatus in Tumormaterial sowie *in vitro* das apoptotische Verhalten der Zellen zu untersuchen.

Im Einzelnen waren folgende Schritte geplant, die sich in einen zellbiologischen und einen tumorbiologischen Teil unterteilen lassen:

- Im zellbiologischen Teil sollte bei Zellen mit für diffuse Magenkarzinome typischen Mutationen der apoptotische Prozess initiiert und charakterisiert werden. Dies sollte mit externen Stimuli erfolgen und die Quantifizierung der überlebenden Zellen sollte mit einem Proliferationsassay erfolgen.
- Zur Verfügung stehen MDA-MB-435S-Mammakarzinomzellen, die bereits im Rahmen einer Veröffentlichung (Handschuh et al, 1999) für Untersuchungen am E-Cadherin verwendet wurden.
- Im tumorbiologischen Teil war dann geplant, parallel zu den *in vitro* erhobenen Daten durch immunhistochemische Färbungen die in den apoptotischen Prozess involvierten Gene näher zu untersuchen. Tumorzellen erlangen durch Mutationen/Allelverlust häufig einen Überlebensvorteil gegenüber nicht entarteten Zellen. Es werden dabei oft Onkogene hochreguliert oder Tumorsuppressorgene herunterreguliert. Immunhistochemische Färbungen eignen sich sehr gut dafür, die Expressionsprodukte dieser Gene zu untersuchen. Dies sollte zum einen durch eine Mutations-Analyse des p53-Gens erfolgen und eine Korrelation zum Auftreten von E-Cadherin-Mutationen hergestellt werden. Um nicht das ganze Gen sequenzieren zu müssen, kann man sich hierbei auf die Exon 5-8 beschränken, da sich Mutationen fast nur in diesen Regionen befinden.
- Zum anderen sollte immunhistochemisch neben p53 noch Bcl-2, E-Cadherin und mib-1 bei diffusen Magenkarzinomen untersucht werden und das Resultat sollte dann mit den Ergebnissen der Sequenzierung verglichen werden.

Insgesamt standen für diese Untersuchungen aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der TU München zur Verfügung:

- 4 diffuse Magenkarzinome mit einer Deletion von Exon 8 des E-Cadherin-Gens
- 6 diffuse Magenkarzinome mit einer Deletion von Exon 9 des E-Cadherin-Gen
- 8 diffuse und gemischte Magenkarzinome mit E-Cadherin Wildtyp
- 3 diffuse Magenkarzinome mit einer Deletion von Exon 10
- 1 gemischtes Magenkarzinom mit einer Deletion von Exon 7
- 1 diffuses Magenkarzinom mit einer Deletion von Exon 2
- 1 diffuses Magenkarzinom mit einer unbekanntem Mutation

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

AbiPrism™ 377 DNA Sequenzer	Perkin-Elmer, Ueberlingen
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, München
EagleEye II	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Elisa-Reader	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overrath
Färbemaschine TechMate Horizon	DAKO, Hamburg
Gelkammern, horizontal	Bio-Rad, München
Heiz-/Rührgerät	IKA-Labortechnik, Staufen
Kühlzentrifuge 5471R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
Mikrowelle	Siemens, München
Speedvac	Savant, Framingdale, USA
Spektralphotometer Beckman Du® 530	Beckman, Fullerton, CA, USA
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraeus, München
Thermocycler Gene Amp. PCR System 9600 und 9700	Perkin Elmer, Überlingen Applied Biosystems, Weiterstadt
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel
WAVE® DNA Fragment Analysis System	Transgenomic, San Jose, CA, USA
Zellzählgerät Z1	Coulter, München

2.1.2 Allgemeine Chemikalien, Lösungsmittel und Puffer

Sonstige allgemeine Chemikalien wurden von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogen.

Acetonitril	Sigma, Deisenhofen
Agarose und <i>low-melting</i> Agarose für Gelelektrophorese	BMA, Rockland, USA
Cisplatin	Sigma, Deisenhofen
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma, Deisenhofen
Ethanol 50% , 70% und 96%	technische Befüllanlage im Institut für Pathologie TUMünchen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Etoposid	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Eosinlösung, wäßrig 1%	Hausapotheke Klinikum r.d.Isar
5-Fluoro-Uracil (5-FU)	Sigma, Deisenhofen
Hämalaun, saures nach Mayer	Hausapotheke Klinikum r.d. Isar
H ₂ O dest.	HPLC-Qualität, Filtration durch Millipore-Anlage, Millipore, Eschborn
Hepes	Sigma, Deisenhofen
Molekulargewichtsmarker Phi 174 X / HAE III	Boehringer GmbH, Mannheim
NaOH	Roche, Mannheim
	Boehringer, Mannheim

2.1.3 Kommerzielle Komplettsysteme

Chemolumineszenz System	Amersham, Freiburg
DyeEx™ Spin Kit	Qiagen, Hilden
Färbekit	DAKO, Hamburg
Nitrozellulose Transfer	Schleicher und Schuell, Dassel
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
XTT-Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.4 Eukaryotische Zelllinie

MDA-MB-435S (humane Karzinomzellen)

ATTC, Rockeville, USA

2.1.5 Reagenzien und Medien für eukaryotische Zellkultur

Albumine Bovine Fraction V Solution (30%)	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco`s MEM (<i>with</i> Glutamax, 4500 mg/l Glucose)	Life Technologies, Eggenstein
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (1x) (without Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	PAA, Laboratories, Cölbe
FKS (fötales Kälberserum)	PAN Biotech, Aidenbach
Genitacin (G418 Sulphat)	Life Technologies, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin (10000 IU/ML-10000 UG/ML)	Life Technologies, Eggenstein
Viralex TM Trypsin/EDTA (1x)	PAA Laboratories, Cölbe

2.1.6 Reagenzien und Materialien für Protein- und Immunhistochemie

Monoklonaler Maus Anti-Human Ki-67 Antigen Antikörper, Klon MIB-1	DAKO, Hamburg, Code No. M 7240
Monoklonaler Maus Anti-Human BCL2 Onkoprotein Antikörper, Klon 124	DAKO, Hamburg, Code No. M 0887
Monoklonaler Maus Anti-Human p53 Protein, Klon DO-7	DAKO, Hamburg, Code No. M 7001
Monoklonaler Maus Anti-Human E-Cadherin Antikörper (AEC)	Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA

2.1.7 Enzyme und Oligonukleotide für die Amplifikation für Exon 5-8 von p53

Startnukleotid (Primer)	Sequenz in 5`→3`Richtung	Oligonukleotide	Taq-Polymerase
Exon 5	ATGTGTTCACTTGTGCCCTG	GSF, Neuherberg	Pharmacia, Freiburg

Exon 6	AGGGTCCCCAGGCCTCTGAT	GSF, Neuherberg	Pharmacia, Freiburg
Exon 7	CCAAGGCGCACTGGCCTCATC	GSF, Neuherberg	Pharmacia, Freiburg
Exon 8	TTCCTTACTGCCTCTTGCTT	GSF, Neuherberg	Applied Biosystems, Weiterstadt
Exon 5 r	AACCAGCCCTGTCGTCTCTC	GSF, Neuherberg	Pharmacia, Freiburg
Exon 6 r	CACCCTTAACCCCTCCTCCC	GSF, Neuherberg	Pharmacia, Freiburg
Exon 7 r	CAGAGGCTGGGGCACAGCAGG	GSF, Neuherberg	Pharmacia, Freiburg
Exon 8 r	TGTCCTGCTTGCTTACCTCG	GSF, Neuherberg	Applied Biosystems, Weiterstadt

Oligonukleotide mit einem „r“ stehen für „reverse“-Sequenzen des nicht kodierenden Stranges; solche ohne weitere Kennzeichnung stehen für die kodierenden Stränge.

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Einmalpipetten 5, 10, 25, 50 ml	Greiner, Frickhausen
Loch-Platten (96-Loch)	Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Objektträger	Labor Schubert und Weiss, München
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	Gilson, Villiers-le-Bel, France
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Skalpell	Martin, Tuttlingen
Zellkulturschalen (60 mm, 100 mm)	Nunc, Wiesbaden

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemein benötigte Lösungen und Medien

10 x TBE	Invitrogen, Scotland, UK
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
dH ₂ O	HPLC-Qualität, Filtration durch Millipore-Anlage, Millipore, Eschborn
Penicillin/Streptomycin	10000 U Penicillin und 10000 µg Streptomycin/ml in physiologischer NaCl-Lösung
Trypsin/EDTA	0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in modifizierter Puck`s Salzlösung
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	mit Glutamax, 4500 mg/ml D-Glukose, Natriumpyruvat

Spezielle Lösungen und Medien sind den einzelnen Methoden zugeordnet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

DNA-Extraktion aus Tumoren

Für die Mutationsanalyse in p53 wurde formalinfixiertes und Paraffin-eingebettetes Tumormaterial verwendet. Bei den ausgewählten diffusen Magenkarzinomen war der Mutationsstatus im E-Cadherin-Gen bekannt. Da die Tumorzellen sehr verstreut wachsen, wurden diejenigen Areale mit einer hohen Dicht an Tumorzellen, die für die späteren Untersuchungen benötigt wurden, lichtmikroskopisch markiert und manuell disseziert. Auf diese Weise wird der Anteil an nicht-tumorösem Material möglichst niedrig gehalten und die Detektion von Tumor-DNA erleichtert.

Für die Untersuchung der DNA aus den Tumorzellen erfolgten weitere Arbeitsschritte. Zuerst wurden HE-Färbungen der Schnitte angefertigt und dann unter dem Lichtmikroskop auf Tumorareale hin überprüft und markiert.

Um genügend DNA eines Tumors zu gewinnen, wurden dann je Tumor 4 x 8 µm Schnitte angefertigt und wie nachfolgend beschrieben, weiter bearbeitet.

Entparaffinierung in absteigender Alkoholreihe

Zum Entparaffinieren der 8 µm dicken Schnitte benötigt man eine absteigende Alkoholreihe, die sich wie folgt zusammensetzt:

2 x	Xylol	je 10 Minuten
2 x	100 % Isopropanol	je 10 Minuten
2 x	96 % Ethanol	je 5 Minuten
2 x	70 % Ethanol	je 5 Minuten
1 x	Aqua dest.	je 10 Minuten

Anschließend wurde je ein Schnitt pro Tumor mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, der als Kontrollschnitt für die weiteren Schritte diente.

Die HE-Färbung erfolgt nach dem folgenden Schema:

Schritt 1	Haemalaun, saures nach Mayer	10 Minuten
Schritt 2	Aqua dest.	kurz fließend
Schritt 3	1 % wässriges Eosin	10 Minuten

Danach erfolgt ein kurzes Eintauchen in eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol. Dann werden die Schnitte mit einem Tropfen Balsam (Pertex) und schließlich mit einem Deckglas versehen. Diese Schnitte können für die manuelle Dissektion nicht verwendet werden.

Die Haemalaun-Färbung erfolgte dann bei 4 Schnitten pro Tumor nach dem folgenden Schema:

Schritt 1	Haemalaun, saures nach Mayer	10 Minuten
Schritt 2	Aqua dest.	kurz abspülen

Die Haemalaun-Schnitte werden nicht weiter bearbeitet und dienen als Grundlage für die manuelle Dissektion.

Im Lichtmikroskop zeigen sich die Kerne blau. V.a. Tumorzellen sind gut sichtbar, da sie durch ihren großen Kern im Verhältnis zum Zytoplasma und auch vermehrten Nukleinsäuregehalt auffallen.

Makrodissektion und Proteinase K-Verdau

Die genaue Lokalisation der Tumoreale (mit einem Anteil von ca. 50% Tumorzellen) wurden von einer erfahrenen Pathologin (Frau PD Dr. Ingrid Becker) in den HE-Schnitten angezeichnet und dann auf die getrockneten Haemalaun-Schnitte übertragen. Von den Haemalaun-Schnitten wurde das Tumormaterial dann manuell abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß mit Proteinase K übertragen.

Proteinase K -aus der Gruppe der Serinproteinasen- ist eine sehr effektive Endopeptidase und weist aber keine spezifischen Schnittstellen auf. Sie spaltet zwischen einer aliphatischen/ aromatischen/hydrophoben und einer beliebigen anderen Aminosäure. Das Enzym kann bei langem Gebrauch Proteine in einzelne Aminosäuren abbauen und wird v.a. zum raschen Abbau von endogenen Nukleasen wie RNasen und DNasen verwendet. Es eignet sich daher sehr gut zur Isolierung von DNA aus Gewebe.

Proteinase K-Puffer:

2 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
50 ml	1 M Tris/HCl, pH 8,3
	ad 1 l Aqua dest.
pro 50 ml	250 µl TWEEN 20 steril filtrieren

Von dem Proteinase K-Puffer wird je nach Größe des zu untersuchenden Gewebes 50-200 µl in ein Eppendorfgefäß gegeben.

Anschließend wird zu dem Puffer die Proteinase K -1 µl auf 50 µl- gegeben. So wird mit allen Schnitten verfahren und stellt sie zum Schluß über Nacht in einen Thermomixer bei 55°C. Zur Inaktivierung des Enzyms werden die Proben am folgenden Tag für 10 Minuten auf 96°C erhitzt.

Spektral-photometrische Bestimmung der DNA-Menge

Die DNA-Konzentration kann durch Extinktionsmessung bestimmt werden.

DNA absorbiert UV-Strahlung mit einem Maximum bei 260 nm in Abhängigkeit von ihrer Konzentration.

Die Konzentration einer 1:10 verdünnten DNA-Lösung wurde in einem Spektralphotometer in einer Quarzküvette gemessen. Als Kalibrator diente Wasser. Gemessen wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm, wobei der Quotient aus beiden

die Verunreinigung mit Protein angibt. Die Messungen dienen zur Bestimmung der DNA-Konzentration.

PCR-Amplifikation der Exons 5-8 von p53

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Ehrlich and Saiki 1988) ist ein Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA-Abschnitten (Hildebrandt 1998) und ermöglicht die molekulargenetische Analyse dieser Sequenzen. Es können mit dieser molekulargenetischen Methode kleinste Mengen an DNA durch eine Folge von Amplifikationszyklen (20-40) dem Nachweis zugänglich gemacht werden. Benötigt werden die entsprechenden Primer (zu den jeweiligen entgegengesetzten Anfängen und Enden der DNA-Anschnitte komplementären synthetischen Oligonukleotide) und eine thermostabile DNA-Polymerase, die sogenannte taq-Polymerase, die nach dem Enzym des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* benannt ist und dNTP's für die Amplifikatsynthese. Nach der *Denaturierung* des DNA-Doppelstranges durch Erhitzen liegt dieser als Einzelstrang vor und die Primer können an den Einzelstrang über Wasserstoffbrücken (=Annealing) binden. In der anschließenden *Extension* vervollständigt die Polymerase die Primer-markierte DNA (Matrize) wieder zu einem Doppelstrang, indem Nukleotide (dNTP's) an das 3'-Ende der Primer binden.

Der Ansatz für eine PCR enthält wie folgend beschrieben:

PCR-Puffer 10 mM	10 mM Tris-HCl (pH 8,3); 50 mM KCl; 1,0 mM MgCl ₂ , 0,01 % Gelatine
15 mM	
Stammlösung dNTP's 200 µM	Applied Biosystems, Weiterstadt
Stammlösung taq-Polymerase (Exon 5-7)	Pharmacia, Freiburg
Stammlösung amplitaq-Gold (Exon 8)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Startoligonukleotide (20 pmol/µl) 0,4 mM	Synthese in GSF, Neuherberg

Die Fragmentamplifikation wurde in einem Thermocycler durchgeführt.

DNA-Verdünnung

Die gemessene DNA wird nun abhängig von ihrer Konzentration noch weiter mit Tris/EDTA (TE)-Puffer verdünnt (1:1 bis 1:5). Die Verdünnung wurde anhand der Ergebnisse im Spektralphotometer und der Tumorgröße abgeschätzt.

Mastermix für PCR

Die PCR wurde jeweils in einem 50 µl Ansatz durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt 5 µl PCR-Puffer, 8 µl dNTP`s mit einer Endkonzentration von 200 mM, 1 µl von jedem der beiden Startoligonukleotide, 4 µl DNA und 0,5 µl taq-Polymerase (Exon 5-7) bzw. amplitaq-gold (Exon 8). Aufgefüllt auf 50 µl wurde mit aqua dest. Beim Pipettieren mußte streng darauf geachtet werden, eine Kontamination der Ansätze mit Fremd-DNA zu vermeiden. Das Optimum der DNA-Konzentration für die Amplifikation liegt bei 200 ng. Kontrolle war stets ein Ansatz ohne die zu untersuchende DNA, d.h. aqua dest.

Es folgt eine tabellarische Zusammenstellung der optimalen Bedingungen für p53, wobei GT-reiche Sequenzen höhere Temperaturen benötigen:

Exon	Primer	Primerverdünnung	Puffer	Taq	Annealingtemperatur	Zyklen	Länge
5	719.1	1:19	15mM	taq	60°C	40	276 bp
	719.2	1:14					
6	720.1	1:14,2	10mM	taq	62°C	40	199 bp
	720.2	1:15,4					
7	721.1	1:16,7	10mM	taq	65°C	40	207 bp
	721.2	1:17,4					
8	722.3	1:15,4	15mM	Gold	56°C	40	217 bp
	722.4	1:21					

Amplifikatnachweis mittels Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Spezifität der Proben wurde ein Zehntel des Amplifikates mit 1µl 10 fach konzentriertem Gel-Ladepuffer auf ein 2%iges Agarosegel mit 0,5µl/ml Ethidiumbromid in die Agarosegeltaschen gegeben. Das Agarosegel besteht aus 2 g Agar in 100 ml 1x TBE und einem Tropfen Ethidiumbromid. Nach einer Laufzeit von 20 Minuten kann dann das in die DNA interkalierende fluoreszierende Ethidiumbromid unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht werden. Klar abgrenzbare Banden und keine Bande in der Kontrollprobe sprechen für die Reinheit des Amplifikats. Die Größe der Banden (Laufhöhe) wird mit dem mitgeführten Marker HAE III verglichen. Durch den Abgleich mit dem DNA-Längenstandard kann die Länge des Amplifikats abgeschätzt werden.

Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (DHPLC)

Die DHPLC ist eine relativ neue Methode nach Oefner und Underhill (Oefner 1998), die die Detektion von DNA-Mutationen erleichtert. Während früher der Goldstandard zur Entdeckung von Mutationen die direkte Sequenzierung war, wird heute meist die sehr viel zeit- und kostensparende Methode der DHPLC angewandt. Es erfolgt keine „Buchstabierung“ mehr, sondern eine Darstellung der Mutation als Basenpaarveränderung.

Im halbautomatischen WAVE™-System (Transgenomic, Omaha, Nebraska, USA) werden durch Erhitzen und anschließendes Abkühlen Heteroduplizes von Wildtyp und mutierter DNA erzeugt (Abbildung 3). Bei Heterozygoten für ein bestimmtes Allel liegen Wildtyp und mutierte DNA in einem Verhältnis von 1:1 vor. Das zu untersuchende DNA-Fragment wird amplifiziert und anschließend durch Erhitzen auf 95°C und langsames Abkühlen hybridisiert (Taylor et al 1998).

Die Trennung der Homoduplizes von den Heteroduplizes erfolgt auf einer hydrophoben Säulenmatrix durch getrennte Denaturierung der DNA-Stränge (O'Donovan et al 1998). Die Fragmente sollten kleiner 1000 bp (Spiegelman et al 2000) sein, wobei das Optimum für diese Untersuchungsmethode bei 60 bis 500 bp liegt (Taylor et al 1998).

Durch Erhitzen für 3 min auf 95°C werden die DNA-Stränge denaturiert, um sich dann in einem Zeitraum von 30 Minuten wieder zusammenzulagern, während die Temperatur von 95°C auf 65°C fällt. Dadurch wird die Stabilität der Nukleinsäuren durch hydrophobe Kräfte gestört und nur durch die langsame Abkühlung (Renaturieren) können sich die Wasserstoffbrücken wieder ausbilden. Die WAVE™-System Analyse ist auf diejenige Schmelztemperatur ausgelegt, die ausreichend ist, die Heteroduplizes zu denaturieren. Die durch die Denaturierung entstandenen Einzelstränge werden früher aus der Säule ausgewaschen. Doppelsträngige DNA wird mittels einem Brückenmolekül Triethylaminacetatpuffer (TEAA), das an die negativ geladene hydrophile DNA bindet, an der hydrophoben Säule länger gehalten und erscheint daher später (Abbildung 3 und 4).

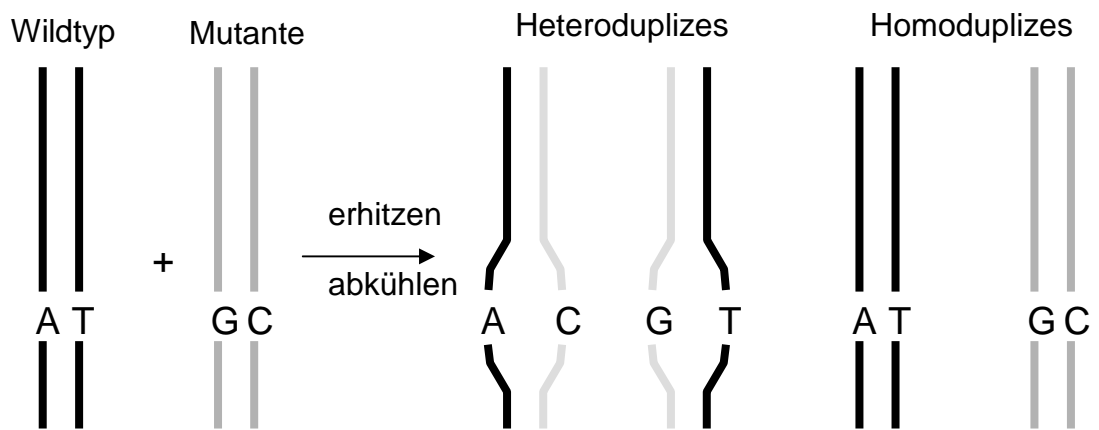


Abbildung 3: Entstehung von Homoduplizes und Heteroduplizes durch Hybridisierung.

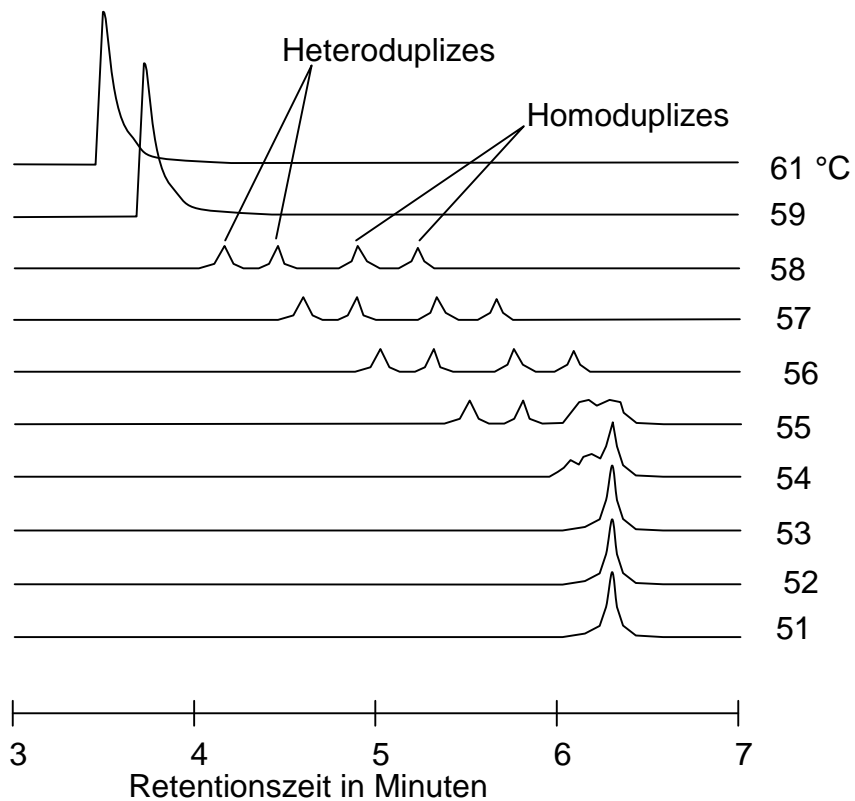


Abbildung 4: Temperatur-abhängige Trennung von Hetero- und Homoduplizes (Taylor, 1998 modifiziert). Heteroduplizes lösen sich früher wieder von der Säule und erscheinen daher als erster Peak im Gegensatz zu den Homoduplizes, die sich länger an der Säule halten und sich später, in einem zweiten Peak darstellen. Auch die Abhängigkeit von der Schmelztemperatur wird verdeutlicht.

Es ist ein langwieriger Prozess, die richtige Temperatur zu finden. Diese wurde bereits in Vorarbeiten am Institut für Pathologie der TU München von Frau Dr. G. Keller erarbeitet und war zu Beginn der Arbeit für die Exons 5-8 von p53 bereits etabliert (Keller et al 2001).

Vorbereitungen der Puffer und Lösungen für DHPLC

	50 ml Triethylaminacetatpuffer (TEAA)
Puffer A	0,1 M
	250 µl Acetonitril
	ad 1000 ml aqua dest.
Puffer B	50 ml TEAA
	250 ml Acetonitril
	ad 1000 ml aqua dest.
Puffer C	75% Acetonitril, 25% H ₂ O
Spritzenpuffer	80 ml Acetonitril auf 1000 ml HPLC- Wasser aufgefüllt

Die Durchflußrate der Puffer wurde auf 0,9 ml/min eingestellt.

DNA-Sequenzierung durch Kettenabbruch, modifiziert nach Sanger

Die DNA - Sequenzierung dient der Aufschlüsselung der Nukleotidreihenfolge innerhalb einer Nukleinsäure. Es gibt zwei verschiedene Methoden. Das erste, durch Alan Maxam und Walter Gilbert entwickelte chemische Verfahren und zum zweiten, das von Frederick Sanger eingeführte enzymatische Verfahren, das sich letztendlich auch durchgesetzt hat. Die Methode nach Sanger (Sanger and Coulson 1975) soll nun näher erläutert werden. Zuerst wird das zu untersuchende DNA-Stück mit Hilfe mehrerer Restriktionsendonukleasen in definierte Bruchstücke gespalten. Diese werden dann auf einem Agarosegel der Größe nach aufgespalten. Die Sequenzierung startet mit der Hybridisierung des bekannten 3`-Endes mit einem Primer. Der komplementäre Strang wird -ausgehend von dem Hybrid- durch Zugabe von den vier *Desoxynukleosid-Triphosphaten* (*dNTP*) und einer DNA-Polymerase erstellt. Der Zweitstrang-Kettenabbruch entsteht dann durch die Zugabe von fluoreszenzmarkierten *Didesoxynukleosid-Triphosphaten* (*ddNTP*) wenn eigentlich das *dNTP* eingebaut werden müsste (Koolman and Röhms 1998; Löffler and Petrides 1997). Die DNA wird dann in einem Sequenzgel elektrophoretisch aufgetrennt und ein automatisches Lesegerät kann dann die fluoreszenzmarkiertem Abbruchstellen messen und somit die Sequenz bestimmen.

Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Proben müssen vor der Sequenzierreaktion ausreichend vorbereitet werden, da die Qualität des Ergebnisses von der Qualität der DNA abhängt. V.a. Verunreinigungen mit Fremd-DNA müssen unbedingt vermieden werden. Die PCR-Produkte werden nun auf ein *low-melting* Gel (0,5 g Agar; 1,5 g *low melting* Agar; 100 ml 1 x TBE) aufgetragen, vom Primer getrennt und anschließend unter der UV-Lampe ausgeschnitten.

Reinigung der PCR-Produkte

Die Produkte der PCR werden nun über einen Geextraktionskit (Qiagen) von Agarose gereinigt und sind nun für den nächsten Schritt, den Cycle Sequenzierungsschritt vorbereitet.

Es folgt nun auf 1% Agarosegel die Prüfung, ob DNA erfolgreich extrahiert wurde (1µl 10 x Dye (Gel-Ladepuffer) und 1 µl Eluat).

Cycle Sequenzierung

Die Proben werden nun in einem weiteren Cycle-Schritt mit jeweils einem Primer und den für den Kettenabbruch verantwortlichen Terminatoren versehen und mit einer zuvor berechneten Annealing-Temperatur gecyclet.

Die Berechnung der Annealing-Temperatur erfolgt nach einer etablierten Formel:

$$T_A = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{C}+\text{G})$$

T_A : Annealingtemperatur, A, T, C, G Anzahl der entsprechenden Nukleotide in der Primersequenz

$T_A = \text{Gesamttemperatur} - 5^{\circ}\text{C}$ (60 °C sollen nicht überschritten werden)

Die Zusammensetzung des Ansatzes enthält wie folgt:

Premix (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit)	4,0 µl (2-8 µl)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Primer	0,5 µl	siehe oben Exon 5-8
DMSO	1,0 µl (gut für GT-reiche Sequenzen)	Sigma, Deisenhofen
Template (DNA)	x µl (PCR-Produkt: 10-100	Tumormaterial, TU

aqua dest.	ng)	München
	ad 20 µl	

Die Menge an Template wird an Hand der Stärke der einzelnen Proben im 1% Agarosegel nach der Elution bestimmt. Es wurde auf 14,5 µl aufgefüllt.

Anschließend folgte mit DyeEx (Qiagen) die Entfernung überschüssiger Terminatoren durch eine Säule. Das gereinigte Endprodukt wird dann durch Flüssigkeitsentzug in der Vakuumzentrifuge zu einem Pellet getrocknet. Das somit erhaltene Pellet wurde für die Sequenzierung auf dem Acrylamid-Gel dann mit 6 µl einer Gebrauchslösung wieder gelöst.

Gebrauchslösung:

Puffer (Blue Dextran)	1 Teil	Perkin Elmer, Überlingen
Formamid	3 Teile	Sigma, Deisenhofen

Nach einem 3-5 minütigen Denaturieren bei 95°C wurden die Proben dann auf das Gel geladen.

Es handelt sich dabei um ein 0,5 *long ranger* Hydrolink Gel, APS und TEMED dienen zur Polymerisation des Gels.

Folgende Lösungen werden für die Herstellung der Gele benötigt:

Hydrolink Gel <i>long ranger</i>	5 ml	BMA, Rockland, ME, USA
10 x TBE (45mM TRIS-Borat, 1mM EDTA)	5 ml	BioRad, München
Harnstoff	21 g	Sigma, Deisenhofen
bidest. H ₂ O	ad 50 ml	HPLC-Qualität, Filtration durch Millipore-Anlage, Millipore, Eschborn
10% Ammoniumpersulfat (APS)	350 bzw. 180 µl	BioRad, München
N, N, N, N-Tetra-methyl-ethylen-diamin (TEMED)	15 bzw. 45 µl	Amersham, Braunschweig

Der Laufpuffer für alle Gele ist 1xTBE (1200 ml)

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Neben den oben beschriebenen tumorbiologischen Untersuchungen diffuser Magenkarzinome wurde das Wachstum humaner Zelllinien unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Die zu untersuchenden Zellen wurden von Frau Dr.rer.nat. G. Handschuh (Handschuh et al, 1999) mit den E-Cadherinvarianten Wildtyp, Deletion in Exon 8 und 9, sowie der Punktmutation in Exon 8 transfiziert. Es handelt sich bei den Zellen um humane Mammakarzinomzellen.

Standardkultur

Eine untransfizierte, sowie die vier transfizierten Zelllinien (MDA-MB-435S) wurden in Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM mit 4500 mg/l Glucose und Glutamin-Dipeptid) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), sowie 50 µg/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin so lange kultiviert, bis sich die Teilungszyklen der Zellen angeglichen haben. Das Medium wurde 3-mal wöchentlich trypsinisiert. Alle Zellen wurden bei 37°C, 6,5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre gezogen. Zur Passagierung wurden anhaftende Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend wurden sie mit frischen Medium je nach Dichte 1:8 bis 1:11 verdünnt und wieder ausgesät.

XTT-Assay

Zur Untersuchung des Apoptoseverhaltens der verschiedenen Zelllinien wurden die Zellen Chemotherapeutika exponiert und mit Hilfe eines Zellproliferationsassays (XTT-Assay) wurden quantitativ Zellproliferation und Überleben bestimmt.

Es handelt sich bei dem XTT-Agens um ein gelbes Tetrazolium-Salz, das nur von lebenden Zellen und deren mitochondrialen Dehydrogenasen in ein wasserlösliches oranges Formazan-Salz umgewandelt wird.

Dieser Formazan-Farbstoff kann in einem ELISA-Reader direkt quantifiziert werden.

Die Absorption des Farbstoffes liegt bei 450 bis 500 nm, während die Referenzlänge mehr als 650 nm betragen sollte.

Zur Vorbereitung der Zellen inkubiert man je nach Zellart, bis die Zellen eine bestimmte Dichte erreicht haben (24-72 h) und gibt dann die Hälfte des Mediumvolumens an XTT und Coupling-Reagenz (z.B. bei 100 µl Medium 50 µl XTT und 1 µl Coupling-Reagenz) zu und inkubiert 4-24 h, um dann die Absorption zu messen. Der Farbstoff ist nicht länger als 24 h stabil. Es sollte jedoch immer nach der gleichen Zeit gemessen werden, um zu große Fehler zu vermeiden. Es wurde neben den Messungen mit sich in Kultur befindlicher

Zellen auch immer ein Leerwert bestimmt. Diese Methode arbeitet ganz ohne Radioaktivität und eignet sich durch die einfache Handhabung sehr gut zur Untersuchung von Zellproliferation und Überleben.

Allgemeine Grundlagen zur Messung der Zellproliferation

Die Zelllinien wurden zur weiteren Untersuchung im Zellproliferationsassay (XTT), zuerst wie oben beschrieben, in 10 cm Schalen kultiviert. Für die Messung der Zellproliferation war es jedoch zweckmäßig, die Zellen in einer bestimmten Anzahl auf eine kleinere Fläche zu überführen. 96-Well-Platten haben sich dafür besonders geeignet. Auf diese Weise war es möglich, alle Zelllinien auf einer Platte und mit verschiedenen Stimuli zu untersuchen. Der Versuch erstreckt sich jeweils über 4 Tage.

Tag 1:

Zunächst werden die Zellen in einem Coulter Counter gezählt, um das Aussäen einer zuvor definierten Zellzahl zu gewährleisten. Die Zellen wurden direkt von der Platte in einer Verdünnung von 1:8 bis 1:11 mit Medium entnommen und gezählt. Für die 96-Well-Platten haben sich 2×10^3 /Well bewährt, die dann je nach Konzentration noch mit Medium (DMEM; 10% FKS; je 50 μ l Penicillin und Streptomycin) verdünnt werden müssen. Die Zellen sollen pro Well in einer Konzentration von 2×10^3 /100 μ l vorliegen.

Tag 2:

Das Medium wird abgesaugt und verworfen. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen können nun vier verschiedenen Bedingungen ausgesetzt werden.

Tag 3 (24 h nach Medium/Hemmstoffzusatz):

Es folgt nun die Zugabe des XTT-Lösung mit Coupling-Reagenz (5 ml XTT und 0,1 ml Coupling). Bei der ersten Platte werden pro Well dann 50 μ l dieser Mischung zugegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37°C und 6,5 % CO₂ erfolgt dann die Messung im ELISA-Reader.

Tag 4 (48 h nach der Zugabe des Mediums/Hemmstoffes):

Nun folgt die Zugabe von XTT/Coupling auf die verbleibende zweite Platte (siehe oben).

Zur Vereinfachung werden im folgenden die einzelnen Medien/Hemmstoffe getrennt erläutert.

Zelllinienuntersuchung mit Standardmedium (mit fötalem Kälber-Serum FKS)

Auf jeder Platte werden alle Zelllinien mit Standardmedium untersucht. Der dabei bestimmte Wert wird gleich 100 % gesetzt. Er dient als Vergleichswert. Zudem wurde zugleich geprüft, ob ein Bakterienbefall oder ähnliches vorliegt. In diesem Fall wachsen die Zellen kaum muss man den Versuch wiederholen.

Zelllinienuntersuchung mit Standardmedium (ohne FKS)

Neben der Zugabe von Standardmedium (DMEM; 10% FKS), untersucht man durch den Entzug von Wachstumsfaktoren (DMEM; 0% FKS und 0,2% Albumin) ebenfalls das Verhalten der Zellen untersucht.

Zelllinienuntersuchung mit Zusatz von Chemotherapeutika

Die zwei übrigen Quadranten verblieben für die Zugabe von verschiedenen Chemotherapeutika. Hierbei ist besonders interessant, ob sich die transfizierten Zellen und die untransfizierte in ihrem Verhalten unterscheiden und ob die E-Cadherin-Mutation Einfluß darauf nimmt.

Die einzelnen Agenzien waren wie folgt:

Zur Ermittlung der wirksamen Dosis wurde das Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU)/ 2,4 Dihydroxy-5-fluoropyrimidin -ein Hemmstoff der Thymidylat-Synthase- gemäß dem Produktblatt in DMSO gelöst. Es liegt dann in einer Konzentration von 100 mg/ml als Stocklösung vor und wird bei -20°C gelagert. Tsunoda (Tsunoda et al 2001) führte Experimente mit 5-FU in der Zellkultur durch. Dort wurden Konzentrationen von 0,01/ 0,1/ 1 mg/ml eingesetzt. Diese Konzentrationen wurden zuerst ausgetestet im Rahmen einer Versuchsreihe und haben sich auch für unserer Zelllinien bestätigt.

Das Molekulargewicht geträgt 130,1 mg/ml. Von der Stocklösung ausgehend werden dann vor dem Experiment die Konzentrationen frisch vorbereitet.

Als weiterer Hemmstoff wurde Etoposid -ein Topoisomerase II Inhibitor- getestet.

Das Molekulargewicht liegt bei 588,6 mg/ml. Zunächst wird eine 50mM Stocklösung hergestellt, die der Konzentration von 29,4 mg/ml DMSO entspricht.

In der Literatur (Kravtsov et al 1999) existieren Beschreibungen von Zellkulturexperimenten mit Etoposidkonzentrationen von 1 bis 20 µM. Das entspricht 5,9 µg/ml bis 117,8 µg/ml. Diese Konzentrationen wurden dann an den MDA-MB-435S Mammakarzinomzellen ausgetestet, jedoch waren sie zu gering, um einen Effekt zu

erzielen. Daraufhin erfolgte eine Versuchsreihe mit mehreren, auch höheren Konzentrationen des Hemmstoffes und schließlich zeigten sich die stärksten Resultate bei 300 µg/ml. Der Hemmstoffversuch lief dann bei den Konzentrationen von 50, 100 und 300 µg/ml.

Ein weiterer Hemmstoff ist Cisplatin -ein Schwermetallkomplex mit zytostatischer Wirkung- mit einem Molekulargewicht von 300 mg/ml. Cisplatin wird in DMSO gelöst im Verhältnis 1,166 g/100 g Lösemittel. Ausgangsmenge des Hemmstoffes waren 25 mg und diese wurden dann in 21,44 g DMSO, was einer Menge von 19,5 µl Lösemittel entspricht, gelöst. Anschließend wurde eine Stocklösung von 0,1 M angefertigt, aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren. Ebenfalls bei Kravtsov (Kravtsov et al 1999) werden Hemmstoffteste mit Cisplatin beschrieben. Die dort erwähnten Konzentrationen liegen zwischen 1 und 20 µM, was 0,3 bis 6 µg/ml entspricht. Nach einer Versuchsreihe mit verschiedenen Konzentrationen ergaben sich für die MDA-MB-435S-Zellen höhere Hemmstoffansätze, um einen Rückgang der Zellpopulation erkennen zu können. Eingesetzt wurden schließlich 10 und 20 µg/ml.

2.2.4 Immunhistochemische Methoden

Die Immunhistochemie ist eine seit langem verbreitete Färbemethode, mit der festgestellt werden kann, ob eine Expression/Überexpression eines Genes vorliegt und wo die Genprodukte innerhalb der Zelle lokalisiert sind. Der Nachweis geschieht über eine Antigen-Antikörperreaktion.

Allgemeine Grundlagen

Die zentralen Reagenzien dieser Methode sind Immunglobuline (Ig), die sich in die 5 Klassen unterteilen lassen: IgG, IgA, IgM, IgD, sowie IgE, die sich v.a. durch ihr Molekulargewicht und ihre funktionelle Bedeutung unterscheiden (Kayser et al 1998, Seite 48). Jedes Immunglobulin besteht aus zwei identischen schweren und leichten Ketten. Die schweren Ketten unterscheiden sich durch ihre antigenen und strukturellen Eigenschaften und bestimmen so die Klasse (G, A, M, D, E). Die leichten Ketten gehören entweder zum Typ Lambda oder Kappa, die jedoch innerhalb der Immunglobulin-Klassen sehr variieren.

Es werden in der Immunhistochemie von den 5 Immunglobulinen am häufigsten IgG und IgM (Pentamer) verwendet. Des weiteren wird zwischen monoklonalen (Maus) und polyklonalen Antikörpern (Kaninchen) unterschieden, die entweder nur mit einem Epitop

des Antigens (monoklonal) oder mit verschiedenen Epitopen des Antigens (polyklonal) reagieren. Wichtig für das Gelingen der Färbung ist nun der Antikörpertiter, die Antikörperverdünnung, Inkubationszeit und Temperatur.

Zur Lokalisation von Antigenen wird die 2-Schritt-indirekte Methode verwendet. Es bindet ein unkonjugierter Antikörper an das Antigen. Es folgt dann ein zweiter enzymmarkierter Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist. Dann erfolgt die Zugabe einer Enzym-Substratlösung, um das Chromogen in ein gefärbtes Endprodukt zu überführen.

Enzyme, Chromogene und Techniken

Enzyme	Meerrettichperoxidase Alkalische Phosphatase
Chromogene	Peroxidase + 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) Alkalische Phosphatase (AP) + Neufuchsin/Naphtolphosphat, Chromogen 1 - 3
Technik:	
-Enzym-Anti-Enzym	APAAP (alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase)
-Streptavidin-Biotin	LSAB (labelled streptavidin biotin)

Medien und Verbrauchsmaterial für Immunhistochemie

Objektträger (blau, silanisiert)	DAKO, Hamburg
H ₂ O ₂ , 30%	Merck, Darmstadt
Citratpuffer	10,5 g Citronensäure-Monohydrat ad 5 l aqua dest., mit NaOH auf pH 6.0 einstellen
Detektions-Kit, Kaninchen/Maus	Peroxidase/DAB, DAKO, Hamburg
Detektions-Kit, APAAP	DAKO, Hamburg
Entparaffinierungsreihe	technische Befüllanlage, Institut für Pathologie TUMünchen

TRIS-Puffer 10 mM	60,5 g Trizma-Base (Sigma) in 700 ml a.d. gelöst, mit 1 M HCl (Hausapotheke) auf pH 7,6 einstellen und auf 1000 ml auffüllen, darin 90 g NaCl (Merck) lösen
TWEEN 20	Sigma, Deisenhofen
Balsam (Pertex)	Medite, Burgdorf
Deckgläser	Menzel, Braunschweig

Vorbereitung der Schnitte

Die 2-3 µm dicken Schnitte werden für immunhistochemische Untersuchungen auf silasinierte Objektträger mit Abstandshaltern aufgetragen, da die Färbemaschine für jeweils 2 gegenüberstehende Objektträger vorgesehen ist und mittels Kapillarkräften die Substanzen hochgezogen wurden. Wenn die Tumorschnitte aufgezogen sind, werden sie anschließend -am besten über Nacht- bei 50 °C getrocknet. Anschließend erfolgt die Entparaffinierung in absteigender Alkoholreihe. Die Dauer beträgt ca. 30 Minuten.

Folgende Lösungsmittel sind der technischen Befüllanlage des Institutes für Pathologie der TU München entnommen:

Xylol
 100 % Isopropanol
 96 % Ethanol
 70 % Ethanol
 dH₂O

Zur Zwischenlagerung werden die Schnitte in Tris-Puffer aufbewahrt.

Als nächster Schritt erfolgt dann die Demaskierung der Antikörper-Bindungsstellen. Hierzu benötigt man einen Schnellkochtopf mit 2 l Citratpuffer, stellt die Schnitte in einem Metallständer hinein und bringt diesen zum Kochen. Bei einer Temperatur von 230 °C sollen die Schnitte für 7 Minuten kochen. Nach dem Abkühlen werden sie wieder in Tris-Puffer gelagert. Bei verschiedenen Genprodukten wird die Demaskierung durch Mikrowellenerhitzung bevorzugt und wird bei den entsprechenden Antikörpern besprochen.

Der nächste Schritt ist die Zugabe von H_2O_2 zur Blockade der endogenen Peroxidase. Dafür werden in einem Plastikgefäß 160 ml H_2O mit 40 ml H_2O_2 (30%) gemischt, bei Raumtemperatur 10 min inkubiert und 3 x 2 min mit Tris-Puffer gewaschen.

Die Schnitte sind jetzt vorbereitet und können gefärbt werden. Als Färbemaschine wurde die *TechMate™ Horizon DAKO* für 2 x 20 Schnitte verwendet. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun.

Primärantikörper

Bei der indirekten Methode wurde zuerst einen Primärantikörper benötigt, der spezifisch an die zu untersuchenden Antigene des Genproduktes bindet. Diese Primärantikörper sind sehr unterschiedlich und werden im folgenden genauer beschrieben.

E-Cadherin

Zur Untersuchung des transmembranen Glykoproteins E-Cadherin wurde mit dem monoklonalen Maus anti-humanen-E-Cadherin Antikörper (AEC) gearbeitet. Da dieses Protein in diffusen Magenkarzinomen gehäuft mutiert vorliegt, ist es von großem Interesse, an welcher Lokalisation es in der Zelle vorliegt. Es bindet an die zytoplasmatische Domäne von E-Cadherin und sowohl an mutiertes wie auch Wildtyp E-Cadherin. Als Methode wird die DAB-Färbung angewandt. Der AEC-Antikörper wird in der Verdünnung 1: 2000 zugegeben. Als Positivkontrolle diente Gallenblasengewebe. E-Cadherin als Membranprotein zeigt sich in normalen Zellen als bräunlicher Saum an der Zytoplasmamembran. Der AEC-Antikörper reagiert sowohl mit mutiertem als auch Wildtyp-E-Cadherin.

p53

Zur immunhistochemischen Färbung des Tumorsuppressorgens p53 wurde mit dem Antikörper DO-7 gearbeitet. Es handelt sich um einen monoklonalen Maus anti-humanen p53 Protein Antikörper. Zur Demaskierung dieses Proteins wurden die Schnitte für 20 min in die Mikrowelle bei höchster Stufe gegeben. Die Verdünnung war 1: 200 und als Methode wurde der LSAB (DAB)-Komplex zugegeben. Der Antikörper bindet an ein Epitop am N-Terminus des p53-Proteins und reagiert sowohl mit Wildtyp als auch mit mutiertem Protein. Als Vergleichskontrolle der Färbeintensität diente das Plattenepithel des Ösophagus. Normalerweise ist das p53-Level zu niedrig, um detektiert zu werden, jedoch

führt eine Mutation im Genom oder jeglicher zellulärer Stress zu einer Akkumulation und damit zu einem Nachweis mittels Immunhistochemie.

Bcl-2

Zum Nachweis des Bcl-2 Onkoproteins diente der monoklonale Maus anti-humanes Bcl-2 Onkoprotein Antikörper (Klon 124). Bcl-2 ist ein integrales Membranprotein, das mehr im Zellinneren als an der Oberfläche zu finden ist. Als Färbemethode wurde LSAB (DAB) verwendet. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1: 100 eingesetzt. Als Positivkontrolle diente Lymphknotengewebe. Eine Anfärbung erfolgt in normalem Gewebe (Lymphknoten) v.a. in der Mantelzone, während die Keimzentren nahezu frei von Färbung sind. In Tumorgewebe werden v.a. neoplastische Zellen in folliculären Lymphomen angefärbt, jedoch werden auch tumoröse Zellen nicht-hämatopoetischer Herkunft gefärbt.

Ki-67

Bei der Untersuchung des Proliferationsmarkers Ki-67 wurde der monoklonalen Maus anti-humanes Ki-67-Antikörper mit der Bezeichnung Mib-1 eingesetzt. Das Ki-67-Antigen ist ein nukleäres Protein und ist während allen aktiven Phasen des Zellzyklus präsent. Für die Färbung wird die APAAP-Methode verwendet. Der Antikörper wird 1: 250 verdünnt und dann inkubiert.

Als Positivkontrolle wurde Tonsillengewebe verwendet. Ki-67 zeigt sich dort v.a. in proliferierenden Zellen des Keimzentrums eine intensive rote Farbe auf.

Auswertung

Nach Abschluß des Färbvorgangs werden die Schnitte unter dem Mikroskop auf Auffälligkeiten hin untersucht. Dazu werden die Positivkontrollen mit den jeweiligen Schnitten verglichen und auch die Farbintensität überprüft.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Frau Dr. Raymonde Busch vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie, Technische Universität München, Klinikum rechts der Isar, München

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Untersuchungen diffuser Magenkarzinome an histologischen Schnitten

3.1.1 Auswahl des Tumormaterials/Apoptoseuntersuchungen

Um die in die Zellteilung bzw. Apoptose von diffusen Magenkarzinomzellen involvierten Proteine p53, Bcl-2, E-Cadherin und Ki-67 genauer zu untersuchen, wurden 24 vorhandene formalin-fixierte, in Paraffin-eingebettete Magentumoren vom diffusen Typ ausgewählt. Das Staging erfolgte gemäß den UICC-Kriterien (Spiessl 1992), das Grading entsprechend den WHO Kriterien (Watanabe 1990) und die histologische Klassifikation nach Laurén (Laurén 1965). Ein kleiner Teil der Tumoren lag als sogenannter Mischtyp vor, d.h. es gibt neben den verstreut wachsenden Zellen vom diffusen Typ noch entartete Zellen, die intestinales Wachstum zeigen. Von diesen Mischtumoren wurde nur der diffuse Anteil untersucht. Bei den Untersuchungen interessierten v.a. das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin, das Tumorsuppressorgen p53, das anti-apoptotische Protein Bcl-2, sowie der Proliferationsmarker mib-1/Ki-67.

Als erstes sollte geklärt werden, ob die Expression von intaktem oder mutiertem E-Cadherin einen Einfluß auf die Apoptosebereitschaft der Tumorzellen hat. Da bei diffusen Magenkarzinomen in einem frühen Stadium Mutationen im p53-Gen gefunden wurden (Tahara 2000), sollte nun untersucht werden, ob ein gleichzeitiges Vorliegen von E-Cadherin und p53-Mutationen das Verhalten von Tumorzellen negativ beeinflusst.

Die Arbeiten begannen mit der Extraktion von DNA aus Tumorzellen histologischer Schnitte für die Analyse des Tumorsuppressorgens p53. Bei den verwendeten 24 Tumoren war der E-Cadherinstatus bekannt. Dieser war an Gefrierschnitten untersucht

worden. Es wurde RNA extrahiert und die Exons 1-16 anhand von cDNA mit PCR amplifiziert und sequenziert.

16 von 24 Tumoren weisen einen Defekt im E-Cadherin-Gen auf. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Art der Mutation, die Nukleotidänderung, sowie die Veränderung des Proteins durch die vorliegende Mutation.

Tabelle 2: Patientenkollektiv mit Tumorstadium und E-Cadherin-Mutationsstatus. Das E-Cadherin-Gen wurde in 24 Magentumoren vom diffusen Typ untersucht. Aufgezeigt sind die jeweilige Mutation, die Nukleotidänderung, sowie die Änderung des Proteins.

Histologische Klassifizierung (Laurén)	Patient	Exon	Nukleotidänderung	Proteinänderung
gemischt	1	-	-	-
gemischt	2	-	-	-
diffus	3	-	-	-
gemischt	4	-	-	-
diffus	5	-	-	-
gemischt	6	-	-	-
diffus	7	-	-	-
diffus	8	-	-	-
diffus	9	8	1009del129	<i>in frame</i> Deletion
diffus	10	8	1009del129	<i>in frame</i> Deletion
diffus	11	8	1009del129	<i>in frame</i> Deletion
diffus	12	9	1138del138	<i>in frame</i> Deletion
diffus	13	9	1138del138	<i>in frame</i> Deletion
diffus	14	9	1138del138	<i>in frame</i> Deletion
diffus	15	9	1138del138	<i>in frame</i> Deletion
diffus	16	9	1138del138	<i>in frame</i> Deletion
diffus	17	9	1138del138	<i>in frame</i> Deletion
diffus	18	10	1418T>A	V473D
diffus	19	10	1387G>C und 1320del67	E463Q und <i>in frame</i> Deletion
gemischt	20	7	1004G>A	R335Q

diffus	21	10	1532del33	<i>in frame</i> Deletion
diffus	22	2	59G>A	W20X
diffus	23	8	1012del24	<i>in frame</i> Deletion
diffus	24	unbekannt ¹	unbekannt ¹	unbekannt ¹

¹ RT-PCR war nicht möglich, daher war keine Sequenzierung möglich

3.1.2 p53-Mutationsanalyse

Von den diffusen und gemischten Magenkarzinomen wurde zunächst nach der DNA-Isolierung mittels PCR jedes Exon (Exon 5-8) einzeln amplifiziert und über Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Proben zeigten bei der Kontrolle auf 2 %-igem Agarosegel je nach Menge des gewonnenen Materials verschieden starke Signale an. Abbildung 5 gibt ein Beispiel dafür und zeigt 9 Proben von Exon 8 von p53 mit einer Größe von 217 Kilobasenpaaren, sowie eine negative Kontrollprobe (aqua. dest.).

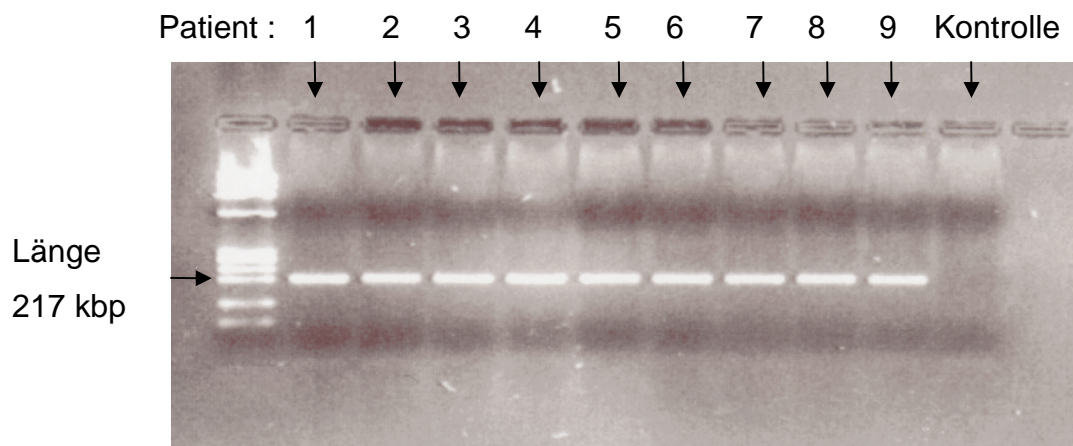


Abbildung 5: Ergebnis der Gelelektrophorese der PCR-Analyse von Exon 8 von p53

Anhand der Stärke des Signals in der Gelelektrophorese wurde diejenige Menge an DNA abgeschätzt (zwischen 8µl und 15µl DNA), die für die Untersuchung mit der *denaturierenden Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie* (DHPLC) benötigt wurde. Für diese Art der Untersuchung werden Heteroduplexe zwischen Wildtyp- und mutierter DNA genutzt, um Mutationen zu entdecken. Die Heteroduplexmoleküle werden von den

Homoduplizes mittels einer *reversed-phase* Chromatographie getrennt und früher wieder eluiert.

Wildtyp-DNA zeigt bei dieser Art von Mutationsanalyse einen einzelnen Peak, während mutierte DNA-Proben durch einen zweiten, früheren Peak (schnellere Elution aus der Säule) auffallen. Zur Überprüfung der Genauigkeit dieser Methode wurde in jedem Lauf eine positive und eine negative Kontroll-DNA verwendet. Auffallend in der DHPLC waren insgesamt 16 Fälle. Abbildung 6 zeigt den Vergleich von 2 Patientenproben mit einer p53-Mutation im Vergleich mit Wildtyp-DNA von p53. Bei den Patientenproben sind Wildtyp-p53 Sequenzen gegenübergestellt, die jeweils nur einen Peak aufweisen.

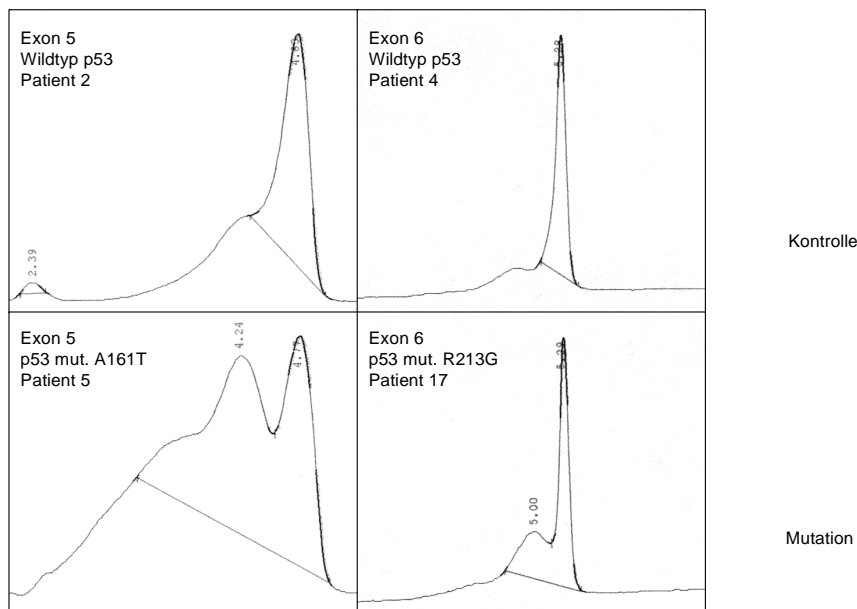


Abbildung 6: p53 Mutationen bei den Patienten 5 und 17. Die DHPLC Analyse zeigt die Mutation A161T bei Patient 5 im Vergleich mit der Wildtyp-p53-Sequenz von Exon 5 von Patient 2. Die zweite p53 Mutation R213Q wurde bei Patient 17 gefunden und steht im Vergleich mit der Wildtyp-p53-Sequenz von Exon 6 von Patient 4.

Für die anschließende Sequenzierung von auffälligen Fällen, wurden die Proben wieder amplifiziert und aufgereinigt. Sequenziert wurde, um die Mutationen bei auffälligen Proben zu verifizieren und wenn Mutationen vorlagen, die genaue Basenfolge zu bestimmen.

Nach Abschluss der Sequenzierung ergaben sich insgesamt 2 Fälle mit p53-Mutationen. Bei einem Tumor liegt neben der p53-Mutation auch noch eine E-Cadherin-Mutation vor (1 von 16; 6,3%), beim anderen zeigte sich nur die Mutation im p53-Gen (1 von 8 Fällen; 12,5 %).

Dieser Unterschied der Häufigkeit von p53-Mutationen ist statistisch in Patienten mit oder ohne E-Cadherin-Mutation nicht signifikant ($p=1,00$).

Bei dem Tumor ohne E-Cadherin-Mutation (Patient 5) liegt die genetische Veränderung im Nukleotid an Position 481, welches zum Austausch des Kodons 161 von Alanin zu Threonin führt.

Beim zweiten Tumor (Patient 17), der eine Deletion in Exon 9 des E-Cadherins zeigt, führte die Mutation im Nukleotid an Position 638 zum Austausch des Kodons 213 von Alanin zu Glutamin. Bei beiden Patienten lag ein Allel in Wildtypform vor.

Abbildung 7 zeigt die Bestätigung der p53-Mutationen von Patient 5 und 17 durch direkte Sequenzierung. Beide gefundenen Mutationen sind *missense* Mutationen mit einem Austausch von G >A an Position 481 bei Patient 5 und an Position 638 bei Patient 17 (dargestellt durch Pfeile).

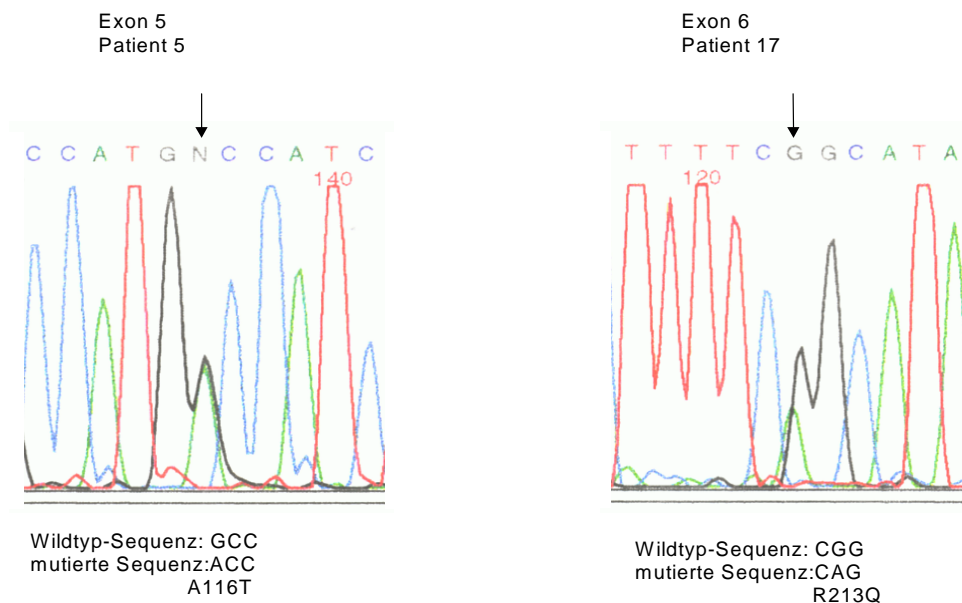


Abbildung 7: p53-Mutationen der Patienten 5 und 17. Gezeigt werden die *missense* Mutationen G>A an Position 481 bei Patient 5 und an Position 638 bei Patient 17 (Pfeile).

Bei Patient 3 wurde ein genetischer Polymorphismus im Nukleotid 639 entdeckt. In Tabelle 3 sind die Daten der Mutationsanalyse von p53 zusammengefasst und zeigen das Exon, die Nukleotidposition, das betroffene Kodon sowie den Aminosäureaustausch.

Tabelle 3: Mutationen und Polymorphismen des p53-Gens.

Patient	Exon	Nukleotid- position	Art der Mutation	Kodon	Aminosäure- tausch
5	5	481	<i>missense</i>	161	Ala > Thr
3	6	639	<i>silent</i>	213	-
17	6	638	<i>missense</i>	213	Arg > Gln

3.1.3 Immunhistochemische Untersuchungen von p53 und Bcl-2

Desweiteren wurden die angefertigten Schnitte immunhistochemisch angefärbt, um die Expression und Lokalisation von p53 und Bcl-2 zu bestimmen.

Die dafür verwendeten Antikörper binden an die entsprechenden Proteine und lassen sich durch Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper und Färbung nachweisen.

Die mikroskopische Analyse von p53 ergab, dass in 8 der 24 Fälle eine Akkumulation im Kern vorliegt (33,3 %). Während p53 normalerweise durch seine kurze Halbwertszeit nicht akkumuliert, kommt es durch eine Mutation zur Bildung einer stabilen Form, die dann Konzentrationen erreicht, die durch immunhistologische Färbemethoden sichtbar gemacht werden können. Es kommt in diesem Fall dann zu einer nukleären Anfärbung von p53.

Eine Akkumulation trat häufiger in Tumoren ohne E-Cadherin-Mutation (5 von 8 Tumoren, 62,5 %) auf, als in Tumoren mit E-Cadherin-Mutation (3 von 16 Tumoren, 18,8 %).

Dieses Ergebnis erwies sich als statistisch signifikant ($p=0,03$).

Bei den beiden Patienten mit vorliegenden p53-Mutationen (siehe Tabelle 3) konnte eine Anfärbung des p53 Proteins im Kern gefunden werden. Es zeigte sich, dass die immunhistochemische Färbung das veränderte Protein detektierte und als Indikator für eine Veränderung der Proteinstruktur diente, während die genaue genetische Struktur durch die Sequenzierung konkretisiert wurde. Abbildung 8 dient als Beispiel der immunhistochemischen Analyse von p53. Sie zeigt eine im Kern der Tumorzellen lokalisierte Akkumulation von p53.

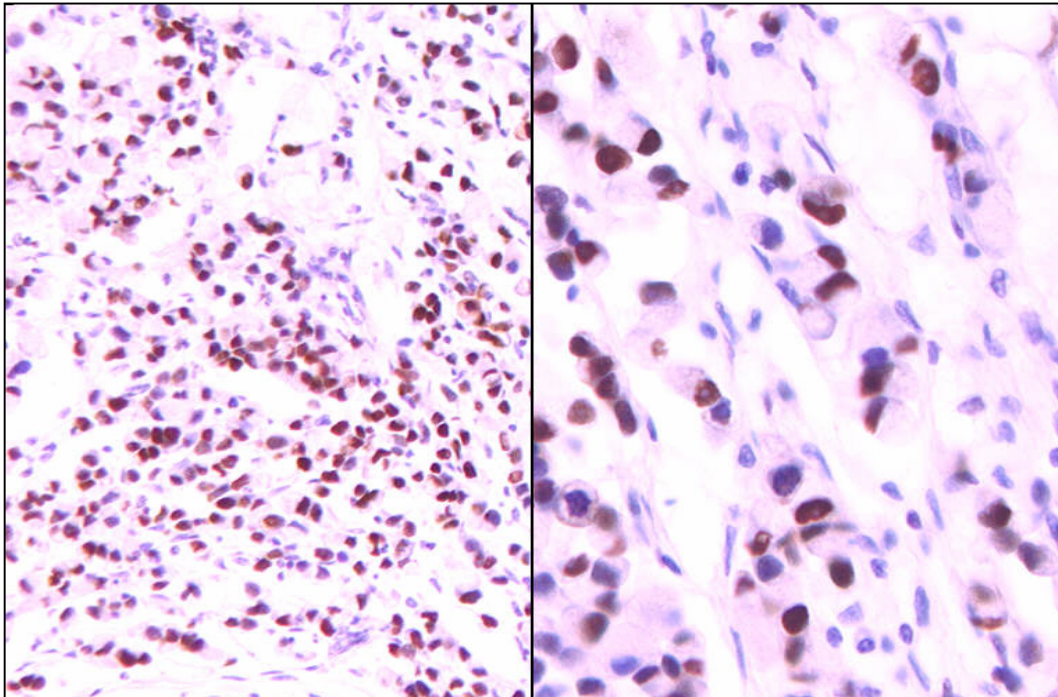


Abbildung 8: Immunhistochemische Analyse von p53 (Tumor 5). Die immunhistochemische Anfärbung mit dem Antikörper gegen p53 zeigt eine nukleäre Akkumulation von p53 in Tumorzellen. Vergrößerung linkes Bild: 220-fach, rechtes Bild: 440-fach.

Neben dem Protein P53 wurde das Bcl-2 Protein aus der Bcl-2-Familie, dem eine anti-apoptotische Funktion zugeschrieben wird, untersucht. Da dieses Protein als Gegenspieler von P53 fungieren kann, ist es von großem Interesse, das Vorhandensein dieses Proteins immunhistologisch im Vergleich mit den übrigen Färbungen und E-Cadherin zu sehen.

Positive Färbungen zeigten eine Expression des Bcl-2-Proteins bei den Tumorzellen im Zytoplasma. Mitgefärbte Lymphozyten (v.a. in der Mantelzone von Keimzentren) exprimieren Bcl-2 stark und dienen in den Tumoren als Positivkontrolle.

In Tumoren ohne vorliegende E-Cadherin-Mutation wurde keine Färbung des anti-apoptotischen Bcl-2 Proteins gefunden, es war jedoch nachweisbar in 5 von 16 Tumoren mit E-Cadherin-Mutation (31,3 %). Dieses Ergebnis ist statistisch nicht signifikant ($p=0,13$), lässt jedoch den Schluss zu, dass eine Prävalenz für die Anfärbung von Bcl-2 in Tumoren mit E-Cadherin-Mutation vorliegt. Abbildung 9 zeigt ein Beispiel der immunhistochemischen Analyse des Bcl-2-Proteins. Die verwendete Probe ist von einem Magenkarzinom ohne E-Cadherin-Mutation (Tumor 5), der Antikörper gegen Bcl-2 reagiert mit Lymphozyten, die Tumorzellen bleiben ungefärbt.

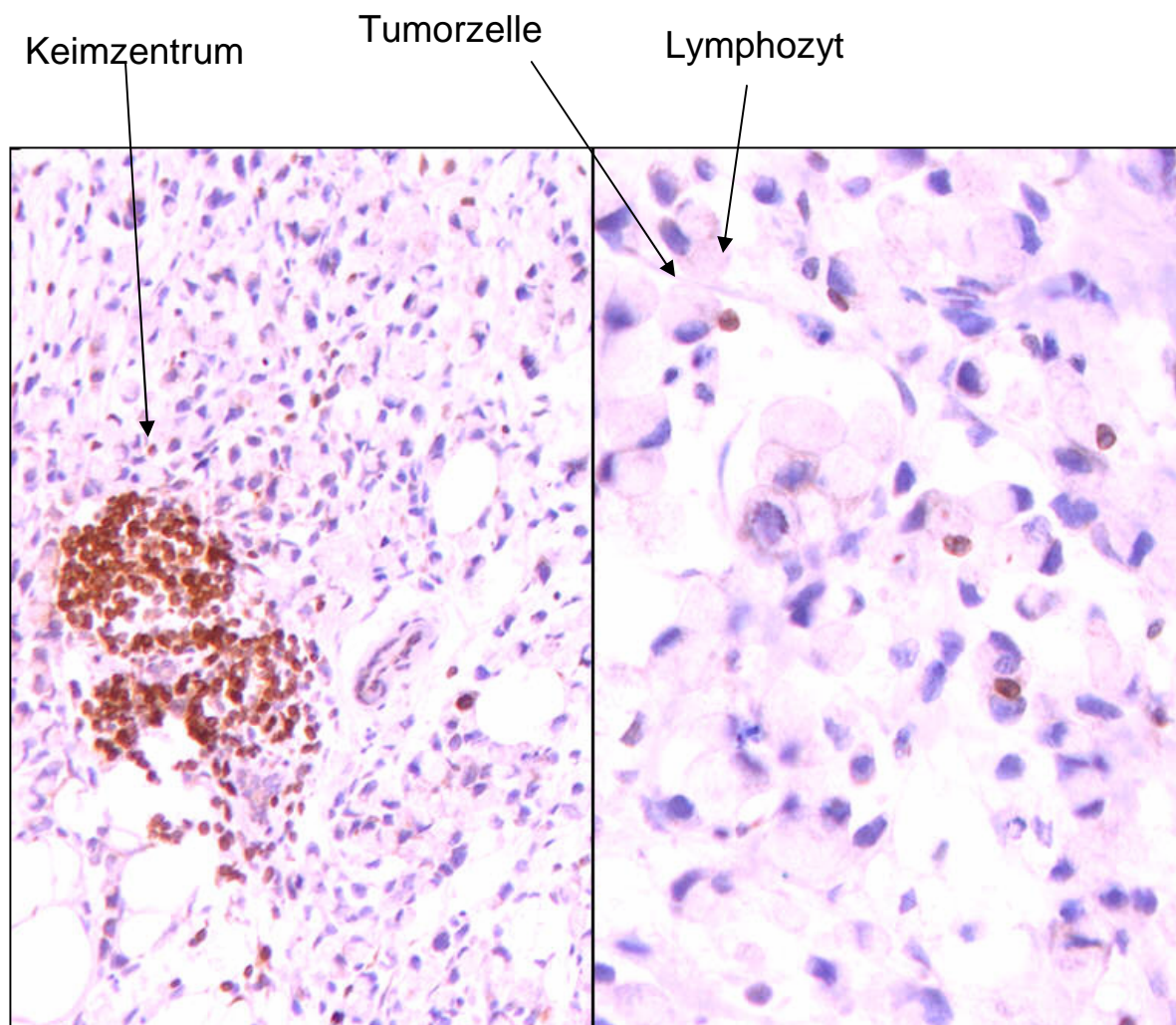


Abbildung 9: Immunhistochemische Analyse des Bcl-2-Proteins (Tumor 5). Mit dem Antikörper gegen das Bcl-2-Protein färbten sich Lymphozyten, jedoch keine Tumorzellen. Vergrößerung linkes Bild: 220-fach, rechtes Bild: 440-fach.

3.1.4 Immunhistochemische Untersuchung von Ki-67

Da möglicherweise durch eine Mutation im E-Cadherin-Gen die Proliferationsfähigkeit der Zellen erhöht wird, wurde zur Überprüfung der Proliferationsrate der Tumorzellen der Antikörper Mib-1 ausgewählt. Dieser färbt diejenigen Zellen an, die sich gerade in Teilung befinden.

Da sich beim Auswerten unter dem Mikroskop zeigte, dass sehr viele Tumorzellen stark angefärbt sind, musste eine geeignete Einteilung gefunden werden. Mehr als 10 % gefärbte im Verhältnis zu allen Tumorzellen wurde als stark proliferierend eingestuft. Es

zeigt sich auch hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Tumoren mit (15 von 16, 93,8 %) und ohne E-Cadherin-Mutation (8 von 8, 100 %, $p=1,00$). Abbildung 10 zeigt ein Beispiel der immunhistochemischen Analyse von Ki-67.

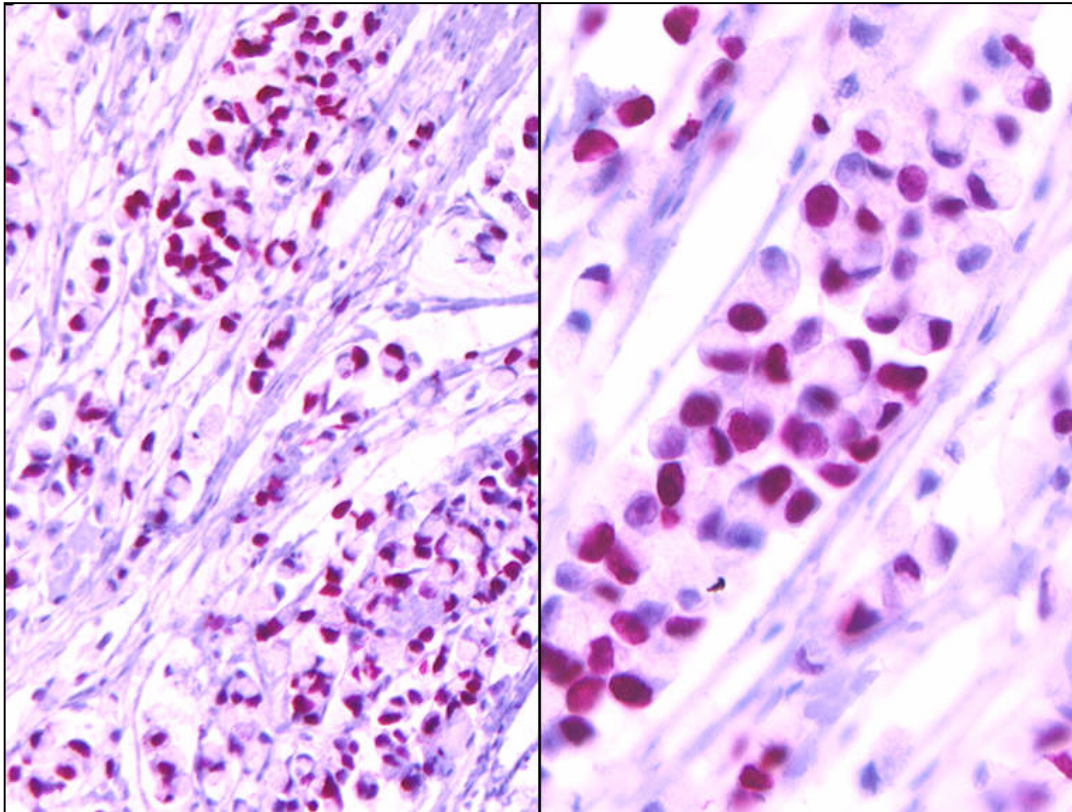


Abbildung 10: Immunhistochemische Analyse von Ki-67 (Tumor 5). Mit dem Antikörper gegen Ki-67 zeigt sich eine nukleäre Färbung der Magenkarzinomzellen. Vergrößerung linkes Bild: 220-fach, rechtes Bild: 440-fach.

Die Hypothese, dass durch E-Cadherin-Mutationen die Proliferation der Zellen gesteigert wird, konnte also nicht bestätigt werden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass aufgrund anderer genetischer Veränderungen hohe Proliferationsraten der Tumoren vorliegen.

3.1.5 Immunhistochemische Untersuchung des E-Cadherinstatus

Da sich das Adhäsionsmolekül E-Cadherin normalerweise an der Zellmembran befindet, war es von großem Interesse, ob es durch die verschiedenen Mutationen zu einer Änderung der typischen Lokalisation kommt. Da sich die für diffuse Magenkarzinome

typischen Mutationen v.a. auf die extrazellulären Domänen des Proteins beschränken, lag die Vermutung nahe, dass die Lokalisation des Proteins verändert sein könnte. Durch das Fehlen der Exone 8 und 9 gehen wichtige Kalziumbindungsstellen des E-Cadherinproteins verloren, die für die Adhäsion notwendig sind. Auch die Punktmutation in Exon 8 (Austausch Aspartat zu Alanin in Position 370) verursacht eine Veränderung dieser Bindungsstelle.

Die immunhistochemische Untersuchung ergab, dass das E-Cadherinprotein in allen Tumoren anwesend war. Eine Membranlokalisation des Proteins konnte in 3 von 8 Tumoren ohne E-Cadherin-Mutation (37,5 %) und in 11 von 16 Tumoren mit Mutation (68,8 %) nachgewiesen werden. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,20$). Abbildung 11 zeigt ein Beispiel für die immunhistochemische Anfärbung von E-Cadherin.

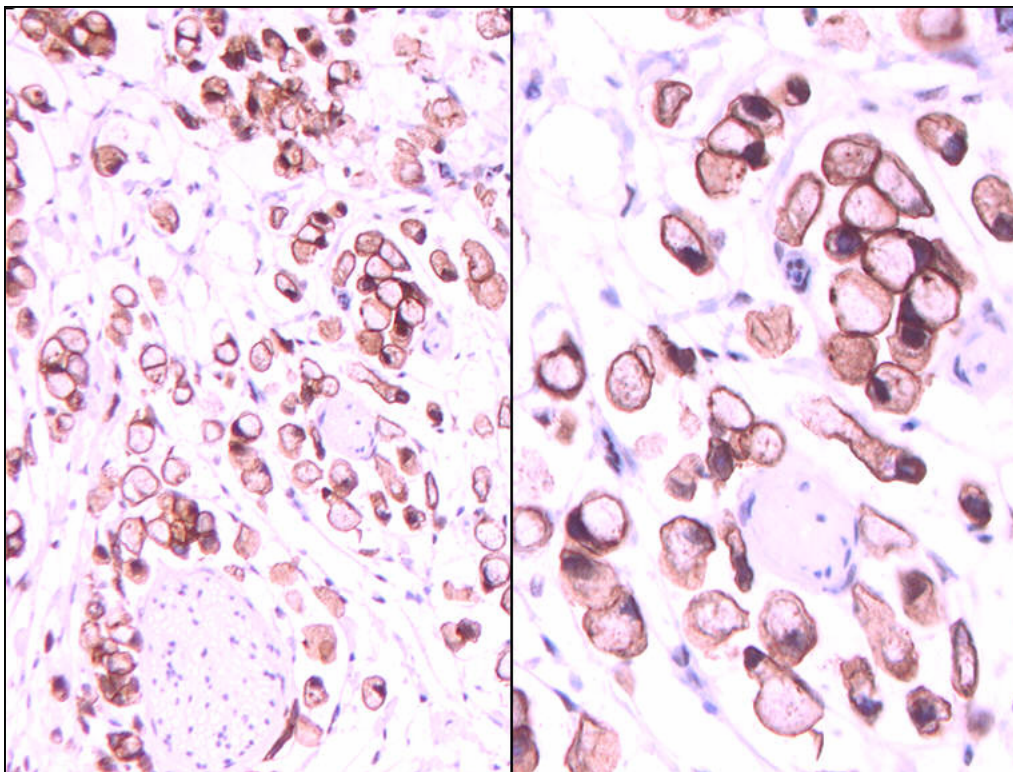


Abbildung 11: Immunhistochemische Analyse von E-Cadherin (Tumor 5). Mit dem Antikörper gegen E-Cadherin zeigt sich die Anfärbung der Zellmembran in Tumorzellen. Vergrößerung linkes Bild: 220-fach, rechtes Bild: 440-fach.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen in Bezug zum E-Cadherin-Mutationsstatus zusammengefasst und Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der gesamten Daten des tumorbiologischen Teils.

Tabelle 4: Zusammenfassung der immunhistochemischen Daten. Einteilung des Anteils gefärbter Tumorzellen: + = weniger als 10%, ++ = 10% bis 50%

E-Cadherin Mutation	Anzahl der Fälle	p53 (++/+)	Bcl-2 (++/+)	Ki-67 (++/+)
-	8	5 (62,5 %)	0 (0 %)	8 (100 %)
+	16	3 (18,8 %)	5 (31,3 %)	15 (93,8 %)
total	24	8 (33,3 %)	5 (20,8 %)	23 (95,8 %)

Tabelle 5: Histologische Klassifikation, E-Cadherin und p53 Mutationsstatus und Immunreaktivität von p53, Bcl-2, Ki-67 und E-Cadherin. p53, Bcl-2, Ki-67: ++: positiv bei >50%; +: positiv bei >10% und <50 %; -: positiv bei <10 %. Kernfärbung wird bei p53 als positiv gewertet. E-Cadherin: +++: positiv bei >50%, ++: positiv bei >10% und <50 %, +: positiv bei <10 %. M: Membran-Färbung; C: cytoplasmatische Färbung; E-Cad: E-Cadherin.

Patient	Histologische Klassif. (Laurén)	E-Cadherin-mutation	p53-mutation	Immunhistochemie				E-cad-lokalisation
				p53	Bcl-2	Ki-67	E-cad	
1	mixed	-	-	++	-	++	+++	M / C
2	mixed	-	-	++	-	+	++	M
3	diffuse	-	-	-	-	++	+++	C
4	mixed	-	-	++	-	++	+++	M / C
5	diffuse	-	+	++	-	++	+++	M
6	mixed	-	-	-	-	++	+++	M / C
7	diffuse	-	-	+	-	++	+++	M / C
8	diffuse	-	-	-	-	++	+++	M
9	diffuse	+	-	-	-	+	+++	M
10	diffuse	+	-	++	-	+	+++	M / C
11	diffuse	+	-	-	-	++	+++	M
12	diffuse	+	-	-	-	++	+++	M
13	diffuse	+	-	-	-	+	+++	M / C
14	diffuse	+	-	-	-	++	+++	M
15	diffuse	+	-	++	+	+	+++	M
16	diffuse	+	-	-	+	+	+++	M / C
17	diffuse	+	+	++	-	++	+++	M
18	diffuse	+	-	-	-	+	+++	M
19	diffuse	+	-	-	-	-	+	M
20	mixed	+	-	-	++	++	+++	M / C
21	diffuse	+	-	-	+	++	+++	M
22	diffuse	+	-	-	+	++	+++	M / C
23	diffuse	+	-	-	-	++	+++	M
24	diffuse	+	-	-	-	+	+	M

3.2 Zellbiologische Untersuchungen mit dem Zellproliferationsassay XTT

Um nicht nur statische Untersuchungen an Magenkarzinomen vorzunehmen, sondern auch das dynamische Verhalten von Tumorzellen über einen längeren Zeitraum zu beobachten, wurden Zellen in Kultur genommen. Ziel der Arbeit war es, Zellen mit unterschiedlichem E-Cadherinstatus vergleichend zu beobachten. Es ging in erster Linie darum, Zellproliferation und die Sensitivität auf verschiedene Chemotherapeutika zu untersuchen.

Eingesetzt wurden zum einen mit Wildtyp oder mutiertem E-Cadherin transfizierte MDA-MB-435S Zellen und zum anderen die nicht-transfizierte parentale Zelllinie und beide wurden vergleichend untersucht. Die vorliegenden Mutationen waren *in frame* Deletionen der Exons 8 (*del 8*) und 9 (*del 9*), sowie eine Punktmutation in Exon 8 (*p8, D370A*).

3.2.1 Korrelation zwischen E-Cadherinstatus und Wachstumsverhalten

Um das Ergebnis aus früheren Beobachtungen (St Croix et al 1998; Watabe et al 1994), dass E-Cadherin als Wachstumsinhibitor fungiert, zu bestätigen, wurde die Zellproliferationsrate der einzelnen Zelllinien bestimmt. Es zeigte sich bei den untersuchten MDA-MB-435S-Zellen eine reduzierte Proliferationsrate in Zellen mit exprimiertem Wildtyp-E-Cadherin gegenüber den untransfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu beeinflussen Zellen mit mutiertem E-Cadherin das Wachstumsverhalten positiv, d.h. es kommt zu einer Zunahme der Proliferation im Vergleich von Wildtyp und mutiertem E-Cadherin.

Diejenigen Zellen, die nicht transfiziert wurden, zeichnen sich durch sehr schnelles Wachstum aus, da ihnen das Zelladhäsionsprotein E-Cadherin fehlt und die Zellen sich daher eher wie mesenchymale als epitheliale Zellen verhalten und stark proliferieren (Abbildung 12 und 13).

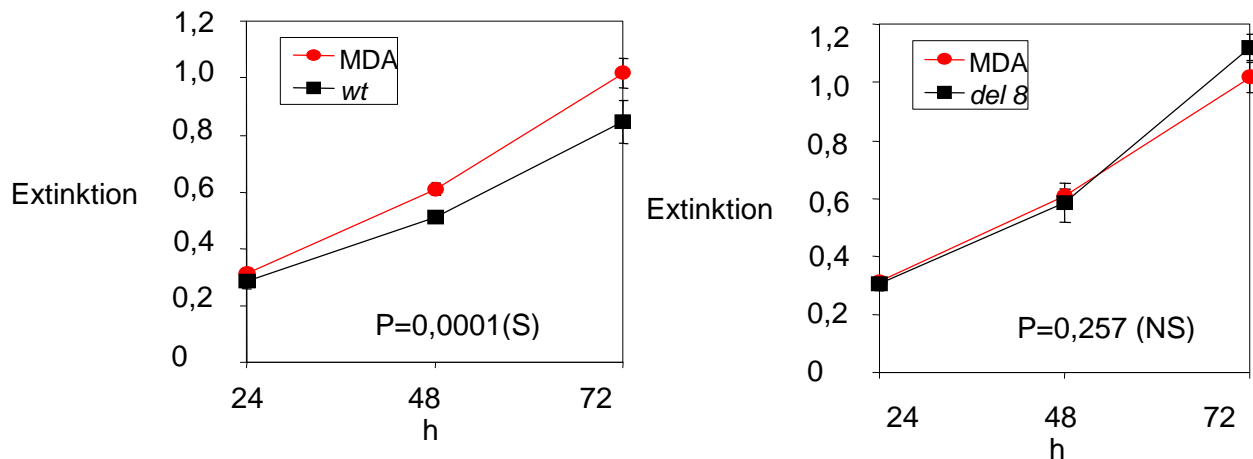


Abbildung 12: Wachstumskurve von Wildtyp-E-Cadherin exprimierenden Zellen (linkes Bild) und von Deletion-8-E-Cadherin exprimierenden Zellen (rechtes Bild) im Vergleich mit parentalen untransfizierten MDA-MB-435S Zellen. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wird als signifikant (S), ein p-Wert größer als 0,05 als nicht-signifikant angesehen.

3.2.2 E-Cadherin-Mutationen und die Bedeutung für ihre Chemotherapeutika-Sensitivität

Zur Untersuchung, ob der E-Cadherinstatus den Zelltod von MDA-MB-435S Zellen beeinflusst, erfolgte der Nachweis der Chemosensitivität der untransfizierten, sowie der Wildtyp oder mutiertes-E-Cadherin exprimierenden Zellen.

Um das Verhalten der Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen verschiedenen externen Apoptosestimuli ausgesetzt. Wichtig war bei der Auswahl der einzelnen Agentien zum einen, dass die Chemotherapeutika schon bei der Behandlung von Magenkarzinomen etabliert waren, zum anderen, dass unterschiedliche Angriffspunkte im Zellzyklus vorlagen. Denn durch die verschiedene Wirkweise der Chemotherapeutika sollte sich nachweisen lassen, ob es einen Zusammenhang zwischen dem E-Cadherinstatus und dem Wirkstoff gibt. Beim Einsatz des Chemotherapeutikums *Cisplatin* zeigte sich eine reduzierte Sensitivität der Wildtyp oder mutiertes E-Cadherin exprimierenden Zellen im Vergleich zur untransfizierten Zelllinie der MDA-MB-435S (Abbildung 13).

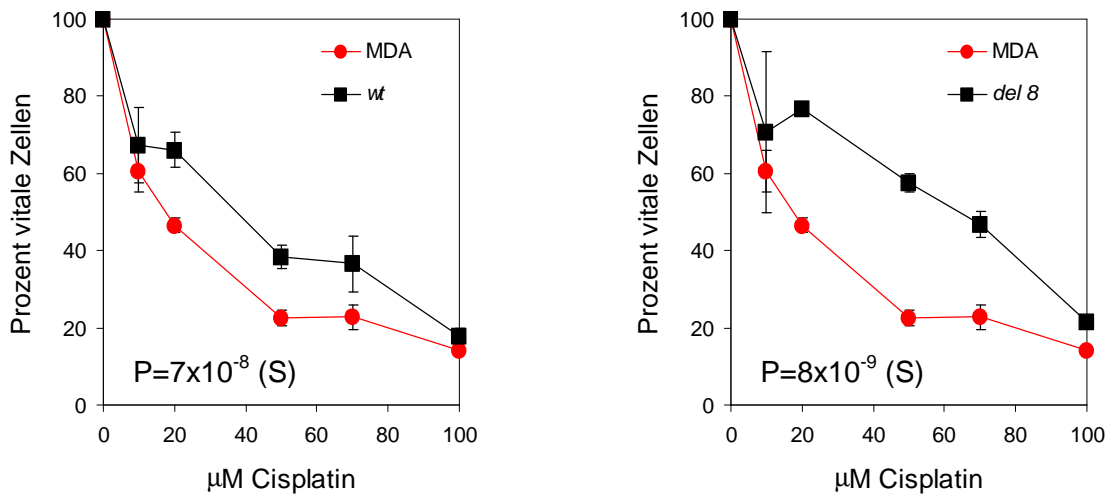


Abbildung 13: Wachstumskurve von Wildtyp-E-Cadherin exprimierenden Zellen (linkes Bild) und von Deletion-8-E-Cadherin exprimierenden Zellen (rechtes Bild) im Vergleich mit parentalen untransfizierten MDA-MB-435S Zellen unter Zugabe von Cisplatin. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wird als signifikant angesehen (S).

Nach Zugabe der Chemotherapeutika 5-FU (Pyrimidinanalogon) / Etoposid (Mitosehemmstoff) zeigten sich vergleichbare Sensitivitätsprofile im Vergleich von untransfizierten und transfizierten MDA-MB-435S-Zellen. Es bedeutet, dass die Sensitivität weder durch den E-Cadherin-Mutations noch durch den Expressions-Status beeinflusst wird.

Um die Unterschiede in der Cisplatin-Sensitivität noch näher zu untersuchen, sollte nun geklärt werden, ob die Unterschiede in dem genetischen Hintergrund oder dem Expressionslevel von p53 begründet sind. Dafür wurden wiederum die parentalen und die mit Wildtyp oder mutiertem E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zelllinien verwendet. Da bekannt ist, dass stabile Transfektionen zu einer Integration der transfizierten cDNA in das Genom der zugrundeliegenden Zelle führen und somit genetische Veränderungen hervorrufen können, wurden auch hier die mutationsreichen *hot spot regions* in Exon 5-8 der MDA-MB-435S Zellen mit der DHPLC-Methode untersucht. Die Untersuchung erfolgte gemäß einem schon etablierten Protokoll (Keller et al 2001). Eine Veränderung im Kodon 266 des Gens (G266E, GGA>GAA, Exon 8, Nukleotid 797) wurde bereits in MDA-MB-435S Zellen beschrieben (O'Connor et al 1997) und durch Sequenzanalyse im Institut für Pathologie der TU München nachgewiesen (Keller et al 2001).

Diese Mutation wurde auch in den transfizierten Zelllinien gefunden. Sowohl die parentale, als auch die Zelllinien, die E-Cadherin Wildtyp oder Mutanten exprimieren, zeigten diese Mutation (Abbildung 14). Es kann nun angenommen werden, dass die Transfektion mit E-Cadherin nicht den p53 Mutationsstatus verändert. Durch die Anwesenheit von einem Wildtyp und einem mutiertem p53-Allel zeigt sich die Heterozygotie von p53.

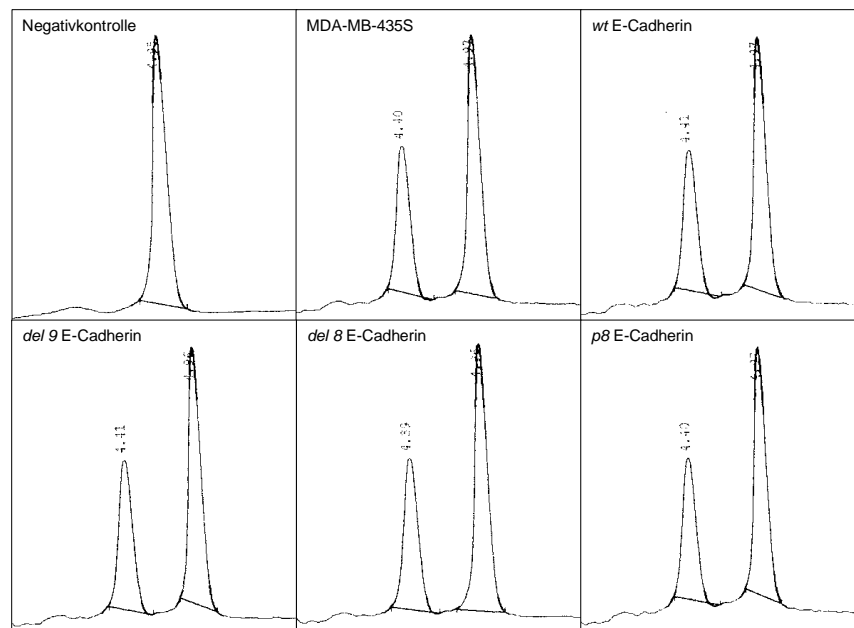


Abbildung 14: Wave-Darstellung der p53 Mutation in MDA-MB-435S Mammakarzinomzellen (parentale Linie, Wildtyp-E-Cadherin und E-Cadherin-Mutationen exprimierende Zellen) durch DHPLC. Zum Verfahren der Wave-Darstellung siehe Kapitel 2, „Material und Methoden“.

3.3 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Variablen erfolgte je nach Umfang des Proben mit Pearson's χ^2 oder dem Fisher-Test. Das Signifikanzniveau wurde bei 5 % festgelegt. Alle Tests wurden 2-fach durchgeführt.

3.4 Eigene Publikationen

Fricke E, Keller G, Becker I, Rosivatz E, Schott C, Plaschke S, Rudelius M, Hermannstädter C, Busch R, Höfler H, Becker KF, Luber B. . Relationship between E-cadherin gene mutation and p53 gene mutation, p53 accumulation, Bcl-2 expression, and Ki-67 staining in diffuse-type gastric carcinoma.
Int J Cancer, 2003; 104: 60-65.

Fricke E, Hermannstädter C, Keller G, Fuchs M, Höfler H, Becker KF, Luber B.
Effect of wild-type and mutant E-cadherin on cell proliferation and responsiveness to the chemotherapeutic agents cisplatin, etoposide, and 5-fluorouracil.
Oncology, 2004; 66: 150-159.

Koautorschaft:

Rosivatz E, Becker I, Specht K, **Fricke E**, Luber B, Busch R, Höfler H, Becker KF. 2002.
Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1 and twist in gastric cancer.
Am J Pathol, 161; 1881-1891.

Kapitel 4

Diskussion

Magenkarzinome zählen weltweit zu den häufigsten Ursachen krebsbedingter Todesfälle (Neugut et al 1996) und sind Gegenstand zahlreicher v.a. molekularpathologischer Untersuchungen.

In der vorliegenden Studie wurden 24 diffuse und Mischtumoren des Magens, sowie Zelllinien mit für diffuse Magenkarzinome typischen genetischen Veränderungen untersucht.

4.1 Tumorbilologische Untersuchungen

Magenkarzinome vom diffusen Typ sind durch den Verlust der homophilen Zell-zu-Zell-Kontakte charakterisiert und wachsen als invasive Einzelzellen ohne zellulären Zusammenhalt. Das Zell-Zell-Adhäsionsprotein E-Cadherin ist in seiner Wildtypform für den Zusammenhalt der Zellen verantwortlich und wirkt als Tumorsuppressor-Gen. Durch Mutationen im E-Cadherin-Gen kann es diese Funktion verlieren. Mutationen im E-Cadherin-Gen wurden erstmalig im Institut für Pathologie der TU München von der AG Becker (Becker et al 1994) in diffusen Magenkarzinomen gefunden. Magenkarzinome vom diffusen Typ weisen gehäuft gleichzeitig Mutationen im E-Cadherin und p53-Gen auf (Tahara 2000), im Rahmen unserer Forschung wurde dann am Kollektiv eine gezielte Untersuchung durchgeführt, ob zwischen p53 und E-Cadherin ein Synergismus besteht. Ziel der Studie war es nun, den Zusammenhang zwischen einer vorliegenden E-Cadherin-Mutation und p53-Mutation zu finden, da beide als Tumorsuppressorgene eine große Rolle für das Überleben von Tumorzellen spielen.

4.1.1 p53-Mutationsanalyse

Mutationen im Tumorsuppressor-Gen p53 gehören zu den häufigsten Mutationen in Tumoren (Vogelstein 1990) und sind damit Gegenstand vieler Forschungsprojekte. Da bereits bekannt ist, dass sich viele Mutationen dieses Gens auf den Exons 5 bis 8 befinden, wurden diese Exons untersucht. Auf diesen Exons, in den sogenannten *hot spot regions*, sind ca. 30% der Mutationen zu finden (Hollstein et al 1991).

Zur Mutationsanalyse des p53-Gens wurden bei 24 Magenkarzinomen mit DHPLC und anschließender Sequenzierung der auffälligen Proben die Exons 5 bis 8 untersucht. Dabei wurden 19 Karzinome vom diffusen Typ und der diffuse Anteil von 5 gemischten Tumoren untersucht.

Für die Exone 5-8 wurden die bereits durch Frau Dr. Keller vom Institut für Pathologie der TU München (Keller et al 2001) etablierten Bedingungen angewendet.

Von den insgesamt 24 untersuchten Tumoren ergab sich bei 2 Tumoren eine Auffälligkeit in Exon 5 und 6 in der DHPLC. Die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte ergab dann die Mutationen A161T und R213Q. Beide Mutationen wurden bereits beschrieben (p53 mutation database, administered by IARC, einsehbar über das World Wide Web, <http://www.iarc.fr/p53/homepage.htm>; Stand 5.6.2004) und es handelt sich dabei auch um *missense*-Mutationen, die zu Austausch von Aminosäuren führen.

Die Häufigkeit der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten p53 Mutationen liegt bei 8,3% bezogen auf die 24 Tumore.

In anderen Studien wurden verschiedene Angaben über die Häufung von p53-Mutationen in diffusen Magenkarzinomen gefunden (Tabelle 5).

Tabelle 6: Übersicht p53 Mutationen (Fricke et al 2003; Liu et al 2001; Ranzani et al 1995; Strickler et al 1994; Tolbert et al 1999; Uchino et al 1993)

Untersuchung	Häufigkeit von p53-Mutationen in %
Uchino et al, 1993	0
Strickler et al, 1994	22,5
Ranzani et al, 1995	33
Tolbert et al, 1999	21
Liu et al, 2001	34,5
Fricke et al, 2003	8,3

Somit schwanken die Resultate zwischen 0 % und 34,5 %, wobei die Größe und Zusammensetzung des Kollektivs, die Herkunft aus verschiedenen Ländern, sowie die Genauigkeit des Detektionssystems eine Rolle spielen können.

Die verwendete Methode DHPLC hat eine Sensitivität und Spezifität von 95 % (Keller et al 2001), es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass einige Mutationen nicht entdeckt wurden.

Die Methode ist jedoch so genau, dass sogar bei verstreutem Tumorwachstum und durch eine Verunreinigung durch 60-80 % nicht tumoröse Zellen heterozygote Mutationen im p53-Gen erkannt werden können.

4.1.2 Immunhistochemische Untersuchung des p53-Proteins

In der Karzinogenese von Tumoren spielt die Inaktivierung bzw. der Verlust von Tumorsuppressorgenen eine große Rolle. Eine Mutation des p53-Gens oder der *loss of heterozygosity* (LOH) des 17p Abschnittes auf Chromosom 17 konnte in Magenkarzinomen gezeigt werden (Kobayashi et al 1996; Seruca et al 1994). Immunhistochemisch lassen sich die Mutationen nachweisen, die zu einer Stabilisierung oder Überexpression von p53 und damit zu einer Verlängerung der Halbwertszeit des Proteins führen. Mutationen, die das Protein in seiner Struktur weitgehend nicht beeinflussen und damit auch die Halbwertszeit nicht verändern, entgehen dadurch jedoch dem immunhistochemischen Nachweis und benötigen andere Nachweismethoden. Eine Akkumulation von p53 in Magenkarzinomen zeigt sich beim diffusen Typ in 52% (Craanen et al 1995) und in 61% (Joypaul et al 1993). Bei Magenkarzinomen allgemein konnte eine Akkumulation in 57% (Gabbert et al 1995), 42,5% (Starzynska et al 1996) und 23% (Soong et al 1996) nachgewiesen werden.

Aber auch hier wurde keine exakte Korrelation der immunhistochemischen Positivität für p53 mit der vorliegenden Mutationen erreicht. Immunhistochemische Verfahren erlauben nur die Detektion einer Überexpression durch nukleäre Anfärbung. Konkrete Aussagen bezüglich Mutationen können nur durch Sequenzierung getroffen werden.

Bei der Auswertung der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der mikroskopischen Analyse in 33,3 % der Fälle eine Akkumulation des Proteins. Bei der anschließenden Sequenzierung wurde nur in zwei Fällen eine Mutation nachgewiesen.

Dieses Ergebnis erhielten andere Arbeitsgruppen zuvor auch schon. Zum Beispiel zeigte Ranzani (Ranzani et al 1995), dass 18 von 65 (28 %) ohne p53-Mutation eine starke Reaktion in der Immunhistochemie zeigten.

Diese Abweichung lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Anhäufung von p53 - einem sonst sehr kurzlebigen Protein (~10 bis 20 min) - durch vielerlei Arten von Noxen, wie oxidativen Stress und DNA-Schäden verursacht werden kann und somit zu den falsch hohen Werten führen kann. Möglicherweise ist es auch das Resultat einer vermehrten mRNA Translation und Stabilisierung des p53 Proteins (Giaccia and Kastan 1998), was dann zu einer Verlängerung der Halbwertszeit des Proteins führt. Des weiteren könnte die Antigen-Antikörper-Bindungsstelle für die Reaktion in der Immunhistochemie verantwortlich sein. Der Antikörper erkennt ein Epitop im N-Terminus des humanen p53 Proteins. Dieses Epitop befindet sich zwischen den Aminosäuren 19 und 26 und der Antikörper bindet sowohl an Wildtyp als auch an mutiertes P53 Protein. Es wird somit nicht zwischen mutiertem und normalem Protein unterschieden.

Beim Vergleichen von p53-Akkumulation und E-Cadherinstatus ergibt sich, dass 62,5 % der Tumoren ohne E-Cadherin-Mutationen eine nukleäre Färbung des p53-Proteins zeigten, während sich p53 bei nur 18,8 % der Tumoren mit E-Cadherin-Mutation nachweisen ließ. Dies weist trotz der kleinen Fallzahl eine statistische Signifikanz auf und gibt einen Hinweis auf eine inverse Korrelation von E-Cadherin- und p53-Mutationen. In diesem Fall heißt das, dass sich bei Vorliegen einer Mutation im E-Cadherin-Gen, das für die Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich ist, durch verschiedene inter- und intrazelluläre Vorgänge P53-Protein weniger stark angehäuft wird als bei Anwesenheit von nicht mutiertem E-Cadherin.

4.1.3 Immunhistochemische Untersuchungen des Bcl-2-Proteins

Während *p53* eine große Rolle für die Initiation der Apoptose spielt, wirkt Bcl-2 als anti-apoptotisches Protein (Reed 1997). Es verhindert den programmierten Zelltod und spielt damit eine große Rolle in der Regulation des Tumorwachstums.

In verschiedenen Studien wurden die Apoptoseindizes gemessen und Bcl-2 scheint invers mit dem Auftreten der Apoptose korreliert zu sein (Baretton et al 1996; Koshida et al 1997). Es konnte sogar ein Zusammenhang zwischen Bcl-2-Expression und einer besseren Prognose bezüglich des Überlebens hergestellt werden (Ishida et al 1997).

Es ergab, dass in der vorliegenden Arbeit 31,3 % der Tumoren mit E-Cadherin-Mutation Bcl-2 exprimierten, aber kein Tumor ohne E-Cadherin-Mutation. In früheren Studien wurde berichtet, dass der Prozentsatz der Bcl-2 positiven Tumorzellen bei diffusen Magenkarzinomen höher ist (32+/-5 %) als bei intestinalen (12+/-5%), wie Krajewska (Krajewska et al 1996) berichtete.

Bei der Auswertung der Immunhistochemie ist zu beachten, dass der Bcl-2-Antikörper sowohl in Normalgewebe mit B-Lymphozyten in der Mantelzone von Keimzentren reagiert als auch in Tumorgewebe mit genetisch veränderten Tumorzellen (Yang and Korsmeyer 1996).

Kürzlich wurde berichtet, dass durch die Expression von E-Cadherin die Expression von Bcl-2 herunterreguliert wird und damit die Sensitivität für eine Etoposid-induzierte Apoptose ansteigt (Sasaki et al 2000). Umgekehrt wurde auch beschrieben, dass der Verlust von E-Cadherin in invasiven Zellen zu einer vermehrten Anhäufung von Bcl-2 und zudem noch zu einer bislang ungeklärten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führt (Sasaki et al 2000).

Diese Beobachtungen stimmen mit denen dieser Arbeit überein und erklären somit auch die verstärkte Expression von Bcl-2 bei gleichzeitig vorliegender E-Cadherin-Mutation.

4.1.4 Immunhistochemische Untersuchungen des E-Cadherinproteins

E-Cadherin ist ein Zelladhäsionsmolekül, das in 50% in diffusen Magenkarzinomen mutiert vorliegt (Becker et al 1994). Weitere Studien konnten in Magen-Frühhkarzinomen Defekte im E-Cadherin-Gen finden, was darauf hinweist, dass E-Cadherin-Mutationen ein frühes Ereignis in der Karzinogenese sind (Becker et al 1996(a); Muta et al 1996; Tahara 2000). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von Gen-Promotorstellen die Transkription von sehr vielen Genen inhibiert und im Falle des E-Cadherins, dem die Rolle eines Tumorsuppressor-Gens zufällt, eine zentrale Funktion in der gastrointestinalen Karzinogenese zu Eigen wird (Fang and Xiao 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Methylierung des E-Cadherin-Gens eher in undifferenzierten (diffusen) Magenkarzinomen gefunden wurde und somit ein Zusammenhang zwischen Histologie und genetischen Veränderungen der Tumoren gesehen werden kann (Tamura 2002). Mit diesem Hintergrundwissen wurde die E-Cadherin-Expression im Kollektiv untersucht. Wildtyp-E-Cadherin lässt sich mit immunhistochemischen Verfahren in der lateralen Zellwand lokalisieren, während es durch viele verschiedene genetische und epigenetische Einflüsse so verändert werden kann, dass sich eine zytoplasmatische Lokalisation ergibt. Diese kann auch durch post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierung entstehen.

Die immunhistochemische Analyse ergab, dass das Protein in allen Tumoren exprimiert wurde. In 14 von 24 Fällen wurde das Protein in der Membran lokalisiert, was die Funktion des Proteins als Adhäsionsmolekül bestätigt.

In weiteren 10 Fällen wurde das Protein im Zytoplasma detektiert. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die membranöse E-Cadherinfärbung/lokalisierung nicht erhalten bleibt, wenn der Zellkontakt verloren geht - wie es in diffusen Magenkarzinomen häufig der Fall ist.

4.1.5 Apoptose und Homöostaseregulation

Der sogenannte programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein wichtiger zellulärer Vorgang und bedarf einer genauen Kontrolle, damit die Homöostase gewährleistet ist.

E-Cadherin ist ein wichtiger Faktor für das Überleben, Wachstumsverhalten und Invasivität der Zellen, während p53 und Bcl-2 wichtige Kontrollproteine für das Auslösen und Durchführen bzw. Verhindern der Apoptose sind. Die Bedeutung von E-Cadherin für das Überleben von Zellen wurde in Experimenten mit E-Cadherin-Knockout-Mäusen verdeutlicht (Larue et al 1994; Riethmacher et al 1995). Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von E-Cadherin in intestinalen Zellen von Mäusen die Zellmigration reduziert, die Proliferation unterdrückt und Apoptose induziert (Hermiston and Gordon 1995).

Werden mesenchymale und epitheliale Zellen vergleichend betrachtet, so lässt sich feststellen, dass Epithelzellen in Abwesenheit von Zell-Matrix-Interaktionen empfindlicher gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli sind (Frisch and Francis 1994). Es wurde auch beobachtet, dass verstreut wachsende Zellen, wie es in diffusen Magenkarzinomen der Fall ist, weniger empfindlich gegenüber Apoptose-induzierenden Stimuli sind als kohäsiv wachsende Zellen (Metcalf and Streuli 1997).

Kommt es nun zu einem Missverhältnis zwischen proliferierenden und apoptotischen Zellen, so ist dies charakteristisch für Neoplasien. Dabei sind in den komplexen Prozess der Tumorigenese verschiedene Faktoren wie E-Cadherin/p53/Bcl-2 involviert, die zusammen oder einzeln eine große Rolle spielen können.

Für einen genaueren Einblick in diese Regulationsmechanismen ist es von großer Bedeutung, weitere Untersuchungen -auf dem Gebiet der Zellbiologie- im Hinblick auf diese drei wichtigen Faktoren in der Apoptoseregulation zu erheben.

4.2 Untersuchungen von E-Cadherin für die Zellproliferation und Chemosensitivität

Wie bereits von früheren Zellkulturexperimenten berichtet wurde, reduziert E-Cadherin die Zellproliferation (St Croix et al 1998; Watabe et al 1994). Es fungiert als Transmembran-Protein und knüpft Ca^{++} -abhängig homophile Kontakte zu benachbarten Zellen. Durch die Zell-Zell-Kontakte kommt es zu einer Wachstumshemmung durch Kontaktinhibition. Durch Mutation im E-Cadherin-Gen geht diese Funktion zum Teil verloren und es kommt zu einem verstärkten Wachstum der Zellen. Die am häufigsten gefundenen Mutationen sind eine Deletion des Exons 8 und 9 (*del 8 und del 9*), die im folgenden untersucht wurden. Hinzu kam noch eine Punktmutation in Exon 8 (*p8*), die jedoch nicht häufig gefunden wurde.

Das wachstumshemmende Verhalten von Wildtyp-E-Cadherin konnte in Zellkultur bestätigt werden.

E-Cadherin-Mutationen beeinflussen die normalerweise vorhandene anti-proliferative Funktion von E-Cadherin. Demgegenüber steht das Resultat einer weiteren Untersuchung von diffusen Magenkarzinomzellen, dass ein großer Prozentsatz der Tumorzellen unabhängig vom E-Cadherinstatus mäßig bis stark proliferierte (Fricke et al 2003). Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass vielerlei Faktoren die Proliferation beeinflussen wie p53 Akkumulation, multiple genetische und epigenetische Effekte (Yokozaki et al 2001).

4.2.1 Zellbiologische Untersuchungen von E-Cadherin

Bei den Untersuchungen der histologischen Schnitte handelte es sich um ein Kollektiv diffuser Magenkarzinome, während sich für die Erforschung der Zellbiologie und Dynamik von genetisch veränderten Zellen Experimente in Zellkultur eignen.

Für die Zellkultur wurde mutiertes E-Cadherin aus diffusen Magenkarzinomzellen isoliert und kloniert (Handschuh et al 1999), als Empfängerzellen dienten MDA-MB-435S Karzinomzellen anstelle von Magenkarzinomzellen. MDA-MB-435S Zellen wurden schon in vielen Studien (Frixen et al 1991; Handschuh et al 1999; Luber et al 2000; Meiners et al 1998) verwendet, um die Funktion von E-Cadherin zu untersuchen und haben sich dabei bewährt. Bisher waren MDA-MB-435S-Zellen als Mammakarzinomzellen akzeptiert und für die Mammakarzinomforschung verwendet. Kürzlich wurden neue Ergebnisse bekannt, dass MDA-MB-435S-Zellen ihren Ursprung nicht in Mammakarzinomzellen haben (Ellison

et al 2002; Ross et al 2000), sondern von Melanomzellen abstammen könnten (Ross et al 2000). Mit RT-PCR und immunhistochemischen Färbungen von MDA-MB-435S Zellen sollten Gene nachgewiesen werden, die sowohl für Mammakarzinomzellen als auch für Melanomzellen charakteristisch sind (Ellison et al 2002). Gene von Mammakarzinomzellen konnten nicht nachgewiesen werden, jedoch Gene von Melanomzellen. Diese Resultate weisen eher daraufhin, dass MDA-MB-435S Zellen melanozytären Ursprungs sind. Der parentalen MDA-MB-435S Zelllinie, die nicht transfiziert wurde und als Vergleich dient, fehlt endogenes E-Cadherin. Möglicherweise wurde die Expression des Genes unterdrückt, indem die 5`CpG Insel methyliert wird (Graff et al 1995), oder aber es wurde durch Transkriptionsfaktoren wie z.B. *snail* (Cano et al 2000) herunterreguliert. Der Transkriptionsfaktor *snail* spielt bei der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) eine Rolle und gehört zusammen mit *SIP1* zu den Repressoren von E-Cadherin. Eine andere Studie untersuchte den Mechanismus, der zur Inaktivierung von E-Cadherin in Mammakarzinomen führt und fand, dass in >35% der Fälle *snail* hochreguliert war und es einen signifikanten Zusammenhang mit einer reduzierten/negativen E-Cadherin-Expression gibt (Cheng et al 2001; Rosivatz et al 2002).

Besonderes Augenmerk bei den Untersuchungen lag auf den Mutationen der extrazellulären Domäne von E-Cadherin, welche für die Zelladhäsion zuständig ist und die oben genannten Mutationen *del 8*, *del 9* und *p8* enthält. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese extrazelluläre Domäne nicht nur für die Adhäsion verantwortlich ist, sondern die Zellproliferation beeinflusst. Es gibt Modellvorstellungen, wie E-Cadherin proliferationshemmend wirken könnte. E-Cadherin greift in das Zellwachstum ein, in dem es die Transkription von β -Catenin verändert (Stockinger et al 2001). Es muss jedoch eine zytoplasmatische Bindung zwischen E-Cadherin und β -Catenin zustande kommen, um die Transkription von β -Catenin zu unterbinden (Stockinger et al 2001).

Die untersuchten E-Cadherinmutanten haben alle intakte β -Cateninbindungsstellen und können mit E-Cadherin interagieren (Luber et al 2000). Zellen mit mutiertem E-Cadherin zeigen jedoch abweichende zytoplasmatische und perinukleäre Färbungen von β -Catenin, möglicherweise infolge der abnormalen Lokalisation von mutiertem E-Cadherin (Luber et al 2000). Zudem kann eine Mutation im adenomatösen Polyposis coli (APC)-Tumorsuppressorgen zu einer fehlerhaften Akkumulation von β -Catenin führen, die dann die Transkription einer Reihe noch unbekannter Gene bewirkt (He et al 1998).

β -Catenin beeinflusst die Expression von *c-myc* (He et al 1998) und *cyclin D1* (Shtutman et al 1999; Tetsu and McCormick 1999), so dass ein Anstieg von freiem β -Catenin in Zellen

mit mutiertem E-Cadherin - verglichen mit Wildtyp - zu einer Erhöhung der Proliferationsrate führen könnte. Eine Fehlregulation im Zellwachstum durch mutiertes E-Cadherin kann daher möglicherweise als vorteilhaft für Tumorzellen angesehen werden.

4.2.2 Chemotherapeutika-Response

Da bei Erstdiagnose von Magenkarzinomen bereits in ca. 2/3 der Patienten ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium und / oder Fernmetastasen gefunden werden, ist es notwendig, eine effektive systemische Therapie anzuwenden.

Magenkarzinome gelten als potentiell chemosensibel und durch die Kombination mehrerer Chemotherapeutika -wie Etoposid/5-Fu/Cisplatin- kann man eher Remissionen erreichen als mit einer früher verwendeten Monotherapie. Es wurde aber bei diesen Behandlungsschemata nie der E-Cadherinstatus des Tumors berücksichtigt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Chemotherapie-Response und der zugrundeliegenden Mutation zu sehen.

Die Effekte der Chemotherapeutika wurden einzeln in Zellkultur ausgetestet.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Effekt von parentalen MDA-MB-435S Zellen und mit Wildtyp und mutiertem E-Cadherin transfizierten Zellen auf die Zellproliferation und Chemotherapeutikasensitivität gegenüber Agentien wie Cisplatin, Etoposid und 5-FU aufgezeigt.

Cisplatin

In der vorliegenden Studie wurde eine unterschiedliche Chemosensitivität der parentalen und transfizierten Zellen gegenüber Cisplatin nachgewiesen. Die Sensitivität gegenüber der eingesetzten Substanz wird durch das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin (Wildtyp oder mutiert) herabgesetzt. Somit konnte gezeigt werden, dass die parentale Zelllinie durch Cisplatin in ihrem Wachstum gehemmt wird, während E-Cadherin-positive Zellen weniger ansprechen. Es konnte jedoch aufgezeigt werden, dass der E-Cadherin-Mutationsstatus keine Rolle spielt, sondern nur das Vorhandensein des Proteins. Cisplatin ist ein platinhaltiges Agens, welches v.a. gegen solide Tumoren wirksam ist (Pinto and Lippard 1985). Es führt zu *crosslinks* innerhalb und zwischen DNA-Strängen und verhindert somit eine erfolgreiche Replikation.

Es wurden verschiedene Gene entdeckt, die die Wirksamkeit von Cisplatin beeinflussen können (Niedner et al 2001), wie z.B. DNA *mismatch repair* Gene. Durch einen Defekt in diesen Genen kann es zu einer Resistenz gegenüber Cisplatin kommen.

Etoposid und 5-FU

Im Vergleich zu Cisplatin wurde kein Unterschied zwischen parentalen und transfizierten MDA-MB-453S Zellen bei der Behandlung mit den Chemotherapeutika Etoposid und 5-FU festgestellt.

Das Ergebnis war unabhängig von der Expression und dem Mutationsstatus von E-Cadherin.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass diese Agentien unterschiedlich angreifen: Etoposid ist ein Inhibitor der Topoisomerase II, die für viele Vorgänge wie Transkription, Replikation usw. verantwortlich ist (Hande 1998). 5-FU dagegen ist ein kompetitiver Inhibitor der Thymidilat-Synthetase (Parker and Cheng 1990).

4.3 Ausblick

Die vorliegende Studie zeigt zum einen den Zusammenhang zwischen E-Cadherin-Mutation und p53-Mutation, p53 Akkumulation, Bcl-2-Expression und Ki-67 Anfärbung in diffusen Magenkarzinomen und zum anderen den Einfluss von Wildtyp und mutiertem E-Cadherin auf die Zellproliferation und die Sensitivität gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika.

Es wurde das Verhalten von Tumorzellen an Tumorproben wie auch *in vitro* parallel untersucht.

E-Cadherin-Mutationen scheinen eine große Rolle in der Zelladhäsion und Wachstumskontrolle von Tumorzellen zu spielen. Durch den Verlust des Zell-Zell Kontaktes können sich Tumorzellen diffus im Gewebe verteilen und die Therapiemöglichkeiten beschränken. Es ist aber bislang noch nicht ausreichend geklärt, welche anderen Faktoren und deren Zusammenwirken dabei eine Rolle spielen können.

Die Expression von E-Cadherin scheint eine wichtige Rolle in Magenkarzinomen zu spielen, während der Mutationsstatus von geringer Bedeutung ist. Dieses Ergebnis könnte schwierige Untersuchungen im Hinblick auf Mutationen entbehrlich machen, es sollte jedoch weiter untersucht werden, welche anti- und proapoptischen Signalwege eine Rolle in Anwesenheit von mutiertem E-Cadherin spielen und in den komplexen Prozess der

Tumorgenese involviert sind. Die hier erhaltenen Resultate sollen als Grundlage für weitere Forschungen v.a. in der Behandlung maligner Erkrankungen wie dem diffusen Magenkarzinom dienen.

Abkürzungsverzeichnis

A oder a	Adenin
Ak.	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
C oder c	Cytosin
bzw.	beziehungsweise
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G oder g	Guanin
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromol
mM	Millimol
nt	Nukleotide

nm	Nanometer
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNS	Ribonukleinsäure
s	Sekunden
T oder t	Thymin
TBE	Tris-Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEAA	Triethylaminacetatpuffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der enzymatischen Aktivität
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

verwendete Aminosäurenabkürzungen:

Ala, A	Alanin
Arg, R	Arginin
Asp, D	Aspartat
Cys, C	Cystein
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutamat
Gly, G	Glycin
Thr, T	Threonin
Trp, W	Tryptophan
Val, V	Valin

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Genetische Veränderungen bei Magenkarzinomen (Tahara 2000, modifiziert). Auf dem Weg von normaler Mukosa zum Karzinom finden verschiedene genetische Veränderungen statt, die jedoch bei diffusem und intestinalem Typ in Art und Zeitpunkt unterscheiden. Der Fortschritt der Karzinomentstehung erfolgt beim diffusen Typ über ein Frühkarzinom zum fortgeschrittenen Karzinom, während das Magenkarzinom vom intestinalen Typ über eine intestinale Metaplasie und/oder Adenom entsteht. 10
- Abbildung 2: Häufige E-Cadherin-Mutationen beim diffusen Magenkarzinom. Die häufigsten somatischen E-Cadherin-Mutationen betreffen die Exons 8 und 9 (*in frame*-Deletionen oder Punktmutation). Durch die dargestellten Mutationen gehen potenzielle Calcium-Bindungsmotive verloren. Die Punktmutation in Exon 8 führt zum Ersatz der Aminosäure Asparaginsäure (Asp) an Position 370 durch Alanin (Ala). 23
- Abbildung 3: Entstehung von Homoduplizies und Heteroduplizies durch Hybridisierung. ... 36
- Abbildung 4: Temperatur-abhängige Trennung von Hetero- und Homoduplizies (Taylor, 1998 modifiziert). Heteroduplizies lösen sich früher wieder von der Säule und erscheinen daher als erster Peak im Gegensatz zu den Homoduplizies, die sich länger an der Säule halten und sich später, in einem zweiten Peak darstellen. Auch die Abhängigkeit von der Schmelztemperatur wird verdeutlicht. 36
- Abbildung 5: Ergebnis der Gelelektrophorese der PCR-Analyse von Exon 8 von p53..... 50
- Abbildung 6: p53 Mutationen bei den Patienten 5 und 17. Die DHPLC Analyse zeigt die Mutation A161T bei Patient 5 im Vergleich mit der Wildtyp-p53-Sequenz von Exon 5 von Patient 2. Die zweite p53 Mutation R213Q wurde bei Patient 17 gefunden und steht im Vergleich mit der Wildtyp-p53-Sequenz von Exon 6 von Patient 4. 51

Abbildung 7: p53-Mutationen der Patienten 5 und 17. Gezeigt werden die <i>missense</i> Mutationen G>A an Position 481 bei Patient 5 und an Position 638 bei Patient 17 (Pfeile).	53
Abbildung 8: Immunhistochemische Analyse von p53 (Tumor 5). Die immunhistochemische Anfärbung mit dem Antikörper gegen p53 zeigt eine nukleäre Akkumulation von p53 in Tumorzellen. Vergrößerung linkes Bild: 220-fach, rechtes Bild: 440-fach.....	55
Abbildung 9: Immunhistochemische Analyse des Bcl-2-Proteins (Tumor 5). Mit dem Antikörper gegen das Bcl-2-Protein färbten sich Lymphozyten, jedoch keine Tumorzellen. Vergrößerung linkes Bild: 220-fach, rechtes Bild: 440-fach.....	56
Abbildung 10: Immunhistochemische Analyse von Ki-67 (Tumor 5). Mit dem Antikörper gegen Ki-67 zeigt sich eine nukleäre Färbung der Magenkarzinomzellen. Vergrößerung linkes Bild: 220-fach, rechtes Bild: 440-fach.....	57
Abbildung 11: Immunhistochemische Analyse von E-Cadherin (Tumor 5). Mit dem Antikörper gegen E-Cadherin zeigt sich die Anfärbung der Zellmembran in Tumorzellen. Vergrößerung linkes Bild: 220-fach, rechtes Bild: 440-fach.....	58
Abbildung 12: Wachstumskurve von Wildtyp-E-Cadherin exprimierenden Zellen (linkes Bild) und von Deletion-8-E-Cadherin exprimierenden Zellen (rechtes Bild) im Vergleich mit parentalen untransfizierten MDA-MB-435S Zellen. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wird als signifikant (S), ein p-Wert größer als 0,05 als nicht-signifikant angesehen.....	61
Abbildung 13: Wachstumskurve von Wildtyp-E-Cadherin exprimierenden Zellen (linkes Bild) und von Deletion-8-E-Cadherin exprimierenden Zellen (rechtes Bild) im Vergleich mit parentalen untransfizierten MDA-MB-435S Zellen unter Zugabe von Cisplatin. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wird als signifikant angesehen (S).....	62
Abbildung 14: Wave-Darstellung der p53 Mutation in MDA-MB-435S Mammakarzinomzellen (parentale Linie, Wildtyp-E-Cadherin und E-Cadherin-Mutationen exprimierende Zellen) durch DHPLC. Zum Verfahren der Wave-Darstellung siehe Kapitel 2, „Material und Methoden“.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufige Mutationen im <i>p53</i> -Genom (Kodon 1-393) von Magenkarzinomen (Fricke et al 2003; Seruca et al 1994); auch einsehbar im World Wide Web unter http://www.iarc.fr/p53/homepage.htm und p53.genome.ad.jp/p53sch011.html ; Stand 5.6.2004). Viele <i>p53</i> Mutationen befinden sich in der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne und können zu einer Kodonveränderung bzw. einem Aminosäureaustausch führen.	18
Tabelle 2: Patientenkollektiv mit Tumorstadium und E-Cadherin-Mutationsstatus. Das E-Cadherin-Gen wurde in 24 Magentumoren vom diffusen Typ untersucht. Aufgezeigt sind die jeweilige Mutation, die Nukleotidänderung, sowie die Änderung des Proteins.....	49
Tabelle 3: Mutationen und Polymorphismen des <i>p53</i> -Gens.	53
Tabelle 4: Zusammenfassung der immunhistochemischen Daten. Einteilung des Anteils gefärbter Tumorzellen: + = weniger als 10%, ++ = 10% bis 50%	59
Tabelle 5: Histologische Klassifikation, E-Cadherin und <i>p53</i> Mutationsstatus und Immunoreaktivität von <i>p53</i> , Bcl-2, Ki-67 und E-Cadherin. <i>p53</i> , Bcl-2, Ki-67: ++: positiv bei >50%; +: positiv bei >10% und <50 %; -: positiv bei <10 %. Kernfärbung wird bei <i>p53</i> als positiv gewertet. E-Cadherin: +++: positiv bei >50%, ++: positiv bei >10% und <50 %, +: positiv bei <10 %. M: Membran-Färbung; C: cytoplasmatische Färbung; E-Cad: E-Cadherin.....	59
Tabelle 6: Übersicht <i>p53</i> Mutationen (Fricke et al 2003; Liu et al 2001; Ranzani et al 1995; Strickler et al 1994; Tolbert et al 1999; Uchino et al 1993)	66

Literaturverzeichnis

- Antonsson B (2001): Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 306:347-61.
- Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, et al (1996): Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 15:255-64.
- Bates S, Vousden KH (1999): Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 55:28-37.
- Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, et al (1994): E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 54:3845-52.
- Becker KF, Keller G, Hoefler H (2000): The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol* 9:5-11.
- Becker K-F, Atkinson MJ, Reich U, et al (1993): Exon skipping in the E-cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinomas. *Hum. Mol. Genet.* 2:803-804.
- Becker K-F, Reich U, Handschuh G, Dalke C, Höfler H (1996(a)): Non-radioactive protein truncation test (nrPTT) for rapid detection of gene mutations. *Trends Genetics* 12:250.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, et al (1996): Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382:638-642.
- Berghella AM, Pellegrini P, Contasta I, Del Beato T, Adorno D (1998): Bcl-2 and drugs used in the treatment of cancer: new strategies of biotherapy which should not be underestimated. *Cancer Biother. Radiopharm.* 13:225-236.
- Berx G, Becker KF, Hofler H, van Roy F (1998a): Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* 12:226-37.
- Berx G, Nollet F, van Roy F (1998b): Dysregulation of the E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell Adhes Commun* 6:171-84.
- Berx G, Staes K, van Hengel J, et al (1995a): Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 26:281-289.

- Bevan S, Houlston RS (1999): Genetic predisposition to gastric cancer. *Qjm* 92:5-10.
- Birchmeier W, Behrens J (1994): Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198:11-26.
- Blagosklonny MV (2001a): Paradox of Bcl-2 (and p53): why may apoptosis-regulating proteins be irrelevant to cell death? *Bioessays* 23:947-53.
- Blagosklonny MV (2001b): Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation. *Leukemia* 15:869-74.
- Blaser MJ (1995): Intrastrain differences in *Helicobacter pylori*: a key question in mucosal damage? *Ann Med* 27:559-63.
- Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, et al (1995): Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 55:2111-5.
- Böcker W, Denk H, Heitz PU (2001): *Pathologie*, 2. Auflage ed. München, Jena: Urban&Fischer.
- Boeing H, Frentzel-Beyme R, Berger M, et al (1991): Case-control study on stomach cancer in Germany. *Int. J. Cancer* 47:858-864.
- Brito MJ, Williams GT, Thompson H, Filipe MI (1994): Expression of p53 in early (T1) gastric carcinoma and precancerous adjacent mucosa. *Gut* 35:1697-700.
- Cadwell C, Zambetti GP (2001): The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 277:15-30.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, et al (2000): The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2:76-83.
- Cheng CW, Wu PE, Yu JC, et al (2001): Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* 20:3814-23.
- Craanen ME, Blok P, Dekker W, Offerhaus GJ, Tytgat GN (1995): Chronology of p53 protein accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 36:848-52.
- Day ML, Zhao X, Vallorosi CJ, et al (1999): E-cadherin mediates aggregation-dependent survival of prostate and mammary epithelial cells through the retinoblastoma cell cycle control pathway. *J Biol Chem* 274:9656-64.
- Ehrlich DHG, Saiki RK (1988): Specific DNA amplification. *Nature* 331:461-462.

- Ellison G, Klinowska T, Westwood RF, Doctor E, French T, Fox JC (2002): Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol Pathol* 55:294-299.
- Fang JY, Xiao SD (2001): Alteration of DNA methylation in gastrointestinal carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 16:960-8.
- Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schluter C, Gerdes J (1991): Assignment of the human Ki-67 gene (MKI67) to 10q25-qter. *Genomics* 11:476-477.
- Forman D (1991a): The etiology of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 105:22-32.
- Forman D (1991b): Helicobacter pylori infection: a novel risk factor in the etiology of gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 83:1702-3.
- Forman D, Newell DG, Fullerton F, et al (1991): Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Bmj* 302:1302-5.
- Fricke E, Keller G, Becker I, et al (2003): Relationship between E-cadherin gene mutation and p53 gene mutation, p53 accumulation, Bcl-2 expression and Ki-67 staining in diffuse-type gastric carcinoma. *Int J Cancer* 104:60-5.
- Frisch SM, Francis H (1994): Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124:619-626.
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al (1991): E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 113:173-185.
- Gabbert HE, Muller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G (1995): The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer* 76:720-6.
- Gayther SA, Goringe KL, Ramus SJ, et al (1998): Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res* 58:4086-9.
- Giaccia AJ, Kastan MB (1998): The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12:2973-83.
- Gonzales Flores PA, Diaz Ferrer JO, Monge Salgado E, LIC WVT (2000): ABO blood groups as risk factor in helicobacter pylori infection. *Rev Gastroenterol Peru Oct - Dec* 20 (4):370-375.
- Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, et al (1995): E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 55:5195-9.

- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994): Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54:4855-78.
- Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al (1998): E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 392:402-5.
- Guimaraes DP, Hainaut P (2002): TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie* 84:83-93.
- Gumbiner BM (2000): Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 148:399-404.
- Hamilton SR, Aaltonen LAe (2000): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon: IARC Press.
- Hande KR (1998): Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* 34:1514-21.
- Handschuh G, Candidus S, Luber B, et al (1999): Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 18:4301-12.
- He TC, Sparks AB, Rago C, et al (1998): Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281:1509-12.
- Hermiston ML, Gordon JI (1995): In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.* 129:489-506.
- Herold G (2001): *Innere Medizin*. Köln: Herold, G.
- Hildebrandt HL (1998): *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, Vol 258. Berlin: de Gruyter.
- Hirohashi S (1998): Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 153:333-9.
- Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334-6.
- Hofmann K (1999): The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol Life Sci* 55:1113-28.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991): p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53.
- Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R (1994): Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 127:1375-80.

- Hsu PI, Lai KH, Tseng HH, et al (2000): Impact of Helicobacter pylori eradication on the development of MALT, gland atrophy and intestinal metaplasia of the antrum. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 63:279-87.
- Huang JQ, Hunt RH (2000): Review article: Helicobacter pylori and gastric cancer--the clinicians'point of view. *Aliment Pharmacol Ther* 14 Suppl 3:48-54.
- Huang XQ (2000): Helicobacter pylori infection and gastrointestinal hormones:a review. *World J Gastroenterol* 6:783-788.
- Ishida H, Irie K, Itoh T, Furukawa T, Tokunaga O (1997): The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. *Cancer* 80:1034-45.
- Janunger KG, Hafstrom L, Nygren P, Glimelius B (2001): A systematic overview of chemotherapy effects in gastric cancer. *Acta Oncol* 40:309-26.
- JoyPaul BV, Newman EL, Hopwood D, et al (1993): Expression of p53 protein in normal, dysplastic, and malignant gastric mucosa: an immunohistochemical study. *J Pathol* 170:279-83.
- Kandikonda S, Oda D, Niederman R, Sorkin BC (1996): Cadherin-mediated adhesion is required for normal growth regulation of human gingival epithelial cells. *Cell Adhes Commun.* 4:13-24.
- Kantak SS, Kramer RH (1998): E-cadherin regulates anchorage-independent growth and survival in oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 273:16953-61.
- Kato T, Motoyama H, Akiyama N (2003): Helicobacter pylori infection in gastric remnant cancer after gastrectomy. *Nippon Rinsho* 61:30-5.
- Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (1998): *Medizinische Mikrobiologie*, 9. Auflage ed. Stuttgart, New York: Thieme Verlag.
- Keller G, Hartmann A, Mueller J, Hofler H (2001): Denaturing high pressure liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of somatic p53 mutations. *Lab Invest* 81:1735-7.
- Keller G, Vogelsang H, Becker I, et al (1999): Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol* 155:337-42.
- Kemler R (1993): From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 9:317-21.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-57.

- Knudson AGJ (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820-823.
- Kobayashi M, Kawashima A, Mai M, Ooi A (1996): Analysis of chromosome 17p13 (p53 locus) alterations in gastric carcinoma cells by dual-color fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 149:1575-84.
- Koolman J, Röhm K-H (1998): *Taschenatlas der Biochemie*, Vol 2. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Koshida Y, Saegusa M, Okayasu I (1997): Apoptosis, cell proliferation and expression of Bcl-2 and Bax in gastric carcinomas: immunohistochemical and clinicopathological study. *Br J Cancer* 75:367-73.
- Krajewska M, Fenoglio-Preiser CM, Krajewski S, et al (1996): Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. *Am J Pathol* 149:1449-57.
- Kravtsov VD, Daniel TO, Koury MJ (1999): Comparative analysis of different methodological approaches to the in vitro study of drug-induced apoptosis. *Am J Pathol* 155:1327-39.
- Lane DP, Crawford LV (1979): T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278:261-263.
- Larue L, Ohsugi M, Hirchehain J, R. K (1994): E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8263-8267.
- Laurén P (1965): The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type of carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scan* 65:31-49.
- Lawniczak M, Starzynska T (2002(a)): Helicobacter pylori infection in gastric cancer patients. *Pol Merkuriusz Lek* 13:103-6.
- Lawniczak M, Starzynska T (2002(b)): Helicobacter pylori CagA(+) infection in gastric cancer patients. *Pol Merkuriusz Lek* 13:216-20.
- Lee WJ, Shun CT, Hong RL, Wu MS, Chang KJ, Chen KM (1998): Overexpression of p53 predicts shorter survival in diffuse type gastric cancer. *Br J Surg* 85:1138-42.
- Levine AJ (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331.
- Lim BH, Soong R, Grieu F, Robbins PD, House AK, Iacopetta BJ (1996): p53 accumulation and mutation are prognostic indicators of poor survival in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 69:200-4.
- Linzer DI, Levine AJ (1979): Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17:43-52.

- Liu XP, Tsushimi K, Tsushimi M, et al (2001): Expression of p53 protein as a prognostic indicator of reduced survival time in diffuse-type gastric carcinoma. *Pathol Int* 51:440-4.
- Löffler G, Petrides PE (1997): *Biochemie und Pathobiochemie*, Vol 6. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Luber B, Candidus S, Handschuh G, et al (2000): Tumor-derived mutated E-cadherin influences beta-catenin localization and increases susceptibility to actin cytoskeletal changes induced by pervanadate. *Cell Adhes Commun* 7:391-408.
- MacDonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al (2001): Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 345:725 ff.
- Machado JC, Soares P, Carneiro F, et al (1999): E-cadherin gene mutations provide a genetic basis for the phenotypic divergence of mixed gastric carcinomas. *Lab Invest* 79:459-65.
- Mann B, Gelos M, Siedow A, et al (1999): Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1603-8.
- Meiners S, Brinkmann V, Naundorf H, Birchmeier W (1998): Role of morphogenetic factors in metastasis of mammary carcinoma cells. *Oncogene* 16:9-20.
- Metcalfe A, Streuli C (1997): Epithelial apoptosis. *Bioessays* 19:711-20.
- Miyaki M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Konishi M, Takeichi M (1995): Increased cell-substratum adhesion, and decreased gelatinase secretion and cell growth induced by E-cadherin transfection of human colon carcinoma cells. *Oncogene* 11:2547-2552.
- Moss SF (1998): Review article: Cellular markers in the gastric precancerous process. *Aliment Pharmacol Ther* 12 Suppl 1:91-109.
- Muta H, Noguchi M, Kanai Y, Ochiai A, Nawata H, Hirohashi S (1996): E-cadherin gene mutations in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Jpn J Cancer Res* 87:843-8.
- Navarro P, Gomez M, Pizarro A, Gamallo C, Quintanilla M, Cano A (1991): A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115:517-533.
- Negri E, La Vecchia C, D'Avanzo B, Gentile A, Boyle P, Franceschi S (1990): Salt preference and the risk of gastrointestinal cancers. *Nutr Cancer* 14:227-32.
- Neugut AI, Hayek M, Howe G (1996): Epidemiology of gastric cancer. *Semin Oncol* 23:281-91.

- Ngan B-Y, Chen-Levy Z, Weiss LM, Warnke RA, Cleary ML (1988): Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the BCL-2 protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *New Engl. J. Med.* 318:1638-1644.
- Niedner H, Christen R, Lin X, Kondo A, Howell SB (2001): Identification of genes that mediate sensitivity to cisplatin. *Mol Pharmacol* 60:1153-60.
- Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ (1991): Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 325:1132-6.
- O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, et al (1998): Blind analysis of denaturing high performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* 52:44-49.
- O'Connor PM, Jackman J, Bae I, et al (1997): Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 57:4285-300.
- Oefner (1998): DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatographie (DHPLC). In Oefner PJ UP (ed), *Current protocols in human genetics*. New York: John Wiley and Sons, Inc., pp 7.10.1 - 7.10.12.
- Parker WB, Cheng YC (1990): Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol Ther* 48:381-95.
- Peluso JJ (2000): N-cadherin-mediated cell contact regulates ovarian surface epithelial cell survival. *Biol Signals Recept* 9:115-21.
- Petros AM, Medek A, Nettesheim DG, et al (2001): Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3012-7.
- Pezzella F, Tse AG, Cordell JL, Pulford KA, Gatter KC, Mason DY (1990): Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol.* 137 (2):225-32.
- Pinto AL, Lippard SJ (1985): Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochim Biophys Acta* 780:167-80.
- Prives C, Hall PA (1999): The p53 pathway. *J Pathol* 187:112-26.
- Ramon JM, Serra L, Cerdo C, Oromi J (1993a): Dietary factors and gastric cancer risk. A case-control study in Spain. *Cancer* 71:1731-5.
- Ramon JM, Serra-Majem L, Cerdo C, Oromi J (1993b): Nutrient intake and gastric cancer risk: a case-control study in Spain. *Int J Epidemiol* 22:983-8.

- Ranzani GN, Luinetti O, Padovan LS, et al (1995): p53 gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4:223-31.
- Reed JC (1997): Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387:773-6.
- Richards FM, McKee SA, Rajpar MH, et al (1999): Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 8:607-10.
- Riethmacher D, Brinkmann V, Birchmeier C (1995): A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:855-859.
- Rosivatz E, Becker I, Specht K, et al (2002): Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 161:1881-91.
- Ross DT, Scherf U, Eisen MB, et al (2000): Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 24:227-235.
- Sanger F, Coulson AR (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94:441-448.
- Sasaki CY, Lin H, Passaniti A (2000): Expression of E-cadherin reduces bcl-2 expression and increases sensitivity to etoposide-induced apoptosis. *Int J Cancer* 86:660-6.
- Scholzen T, Gerdes J (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-22.
- Seruca R, David L, Castedo S, Veiga I, Borresen AL, Sobrinho-Simoes M (1994): p53 alterations in gastric carcinoma: a study of 56 primary tumors and 204 nodal metastases. *Cancer Genet Cytogenet* 75:45-50.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, et al (1999): The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5522-7.
- Soong R, Robbins PD, Dix BR, et al (1996): Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. *Hum Pathol* 27:1050-5.
- Spiegelman JI, Mindrinos MN, Oefner PJ (2000): High-accuracy DNA sequence variation screening by DHPLC. *Biotechniques* 29:1084-90, 1092.
- Spiessl (1992): *UICC International Union Against Cancer: TNM Atlas*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

- St Croix B, Sheehan C, Rak JW, Florenes VA, Slingerland JM, Kerbel RS (1998): E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin- dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J Cell Biol* 142:557-71.
- Starzynska T, Markiewski M, Domagala W, et al (1996): The clinical significance of p53 accumulation in gastric carcinoma. *Cancer* 77:2005-12.
- Stein HJ, Feith M, Siewert JR (2000): Cancer of the esophagogastric junction. *Surg Oncol* 9:35-41.
- Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R (2001): E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol* 154:1185-96.
- Strickler JG, Zheng J, Shu Q, Burgart LJ, Alberts SR, Shibata D (1994): p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: when guardians fail. *Cancer Res* 54:4750-5.
- Tahara E (1993): Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 119:265-272.
- Tahara E (1995): Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. *Cancer* 75:1410-7.
- Tahara E (1998): Molecular mechanism of human stomach carcinogenesis implicated in *Helicobacter pylori*. *Exp Toxicol Pathol* 50:375-378.
- Tahara E (2000): Molecular aspects of invasion and metastasis of stomach cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol* 84:43-9.
- Tahara E, Semba S, Tahara H (1996): Molecular biological observations in gastric cancer. *Sem Oncol* 23:307-315.
- Tahara E, Yokozaki H, Yasui W (1999): Stomach-genetic epigenetic alterations of preneoplastic and neoplastic lesions. In Srivasta S, Henson, D. E., Gazdar, A. (ed), *Molecular Pathology of Early Cancer*. IOSPres, Netherland, pp 341-361.
- Takahashi K, Suzuki K (1996): Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Exp. Cell Res.* 226:214-22.
- Takeichi M (1991): Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451-1455.
- Talley NJ, Zinsmeister AR, Weaver A, et al (1991): Gastric adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* infection. *J Natl Cancer Inst* 83:1734-9.
- Tamura G (2002): Genetic and epigenetic alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in gastric cancer. *Histol Histopathol* 17:323-9.

- Tamura G, Sakata K, Nishizuka S, et al (1996): Inactivation of the E-cadherin gene in primary gastric carcinomas and gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 87:1153-9.
- Taylor P, Munson K, Gjerde D (1998): Detection of mutations and polymorphisms on the WAVE(TM) DNA fragment analysis system. *Transgenomic(TM)* Application note No.101.
- Teh M, Lee YS (1994): An immunohistochemical study of p53 protein in the different histological subtypes of gastric carcinoma. *Pathology* 26:432-4.
- Tetsu O, McCormick F (1999): Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398:422-6.
- Tolbert D, Fenoglio-Preiser C, Noffsinger A, et al (1999): The relation of p53 gene mutations to gastric cancer subsite and phenotype. *Cancer Causes Control* 10:227-31.
- Tsujimoto Y, Shimizu S (2000): Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 466:6-10.
- Tsunoda Y, Shimizu Y, Tsunoda A, et al (2001): Synergistic effect of CGS16949A and 5-fluorouracil on a human breast cancer cell line. *Eur Surg Res* 33:232-6.
- Uchino S, Noguchi M, Ochiai A, Saito T, Kobayashi M, Hirohashi S (1993): p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. *Int J Cancer* 54:759-64.
- Van Aken E, De Wever O, Correia de Rocha AS, Mareel M (2001): Defective E-cadherin/catenin complexes in human cancer. *Virchows Arch.* 439:725-751.
- Vleminckx K, Vakaet LJ, Mareel M, Fiers W, van Roy F (1991): Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66:107-119.
- Vogelstein B (1990): Cancer. A deadly inheritance. *Nature* 348:681-2.
- Wanebo HJ, Kennedy BJ, Chmiel J, Steele G, Jr., Winchester D, Osteen R (1993): Cancer of the stomach. A patient care study by the American College of Surgeons. *Ann Surg* 218:583-92.
- Watabe M, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M (1994): Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J Cell Biol* 127:247-56.
- Watanabe (1990): *World Health Organization: histological typing of oesophageal and gastric tumors*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Werner M, Becker KF, Keller G, Hofler H (2001): Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol* 127:207-16.

- Wilke H, Stahl M, Meyer H-J, Achterrath W, Preusser P, Vanhoefer U (2001):
Chemotherapie des Magenkarzinoms. *Onkologe* 7:632-648.
- Yang E, Korsmeyer SJ (1996): A discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*
88:386-401.
- Yokozaki H, Yasui W, Tahara E (2001): Genetic and epigenetic changes in stomach
cancer. *Int Rev Cytol* 204:49-95.
- Yonemura Y, Nojima N, Kaji M, et al (1995): E-cadherin and urokinase-type plasminogen
activator tissue status in gastric carcinoma. *Cancer* 76:941-953.

Vielen Dank

- Herrn Prof. Dr. H. Höfler für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.
- Frau Dr. B. Lubert für die hervorragende Betreuung, ihre kompetente Hilfe in allen Bereichen und die immerwährende Bereitschaft zu Diskussionen über die Probleme der Arbeit.
- Frau Dr. G. Keller für die hervorragende Betreuung und Einführung in das halbautomatische WAVE™-System.
- Frau PD. Dr. I. Becker für hervorragende Betreuung, die Durchsicht sowie die kompetente Hilfe bei den immunhistochemischen Materialien und Diskussionen über die Probleme der Arbeit.
- Herrn PD Dr. K.-F. Becker für die Überlassung von Probenmaterial und Frau C. Schott für die vielen von ihr bereits durchgeführten Voruntersuchungen.
- Den Mitarbeitern des Instituts für allgemeine Pathologie und anatomische Pathologie der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar, allen voran Frau Dr. E. Rosivatz, Frau Dr. G. Fuchs, Frau C. Hermannstädter und Frau S. Plaschke, die mir immer mit Rat und Tat zu Seite standen und dadurch eine tolle Arbeitsatmosphäre und prima Zusammenarbeit ermöglichten.
- Frau Dr. B. Lubert und Frau PD. Dr. I. Becker für die Durchsicht des Manuskriptes.
- Meinen Eltern und Großeltern für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung.