

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. H.- E. Gabbert

Genetische Instabilität beim Magenkarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Nadine Buys

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. Phil. Alfons Labisch, M. A.
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Müller

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Möslein-Wagner

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pathologie des Magenkarzinoms	1
1.2	Genetische Instabilität	2
1.3	Mikrosatelliteninstabilität	2
1.4	Das FHIT-Gen	5
1.5	Das PTEN-Gen	6
1.6	Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	7
1.7	Fragestellung und Ziel der vorliegenden Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Untersuchtes Patientenkollektiv	12
2.2	Methoden	12
2.2.1	Histopathologische Untersuchungen	12
2.2.2	Immunhistochemische Untersuchungen	14
2.2.2.1	Auswertung der Expression von MLH1 und MSH2	14
2.2.3	Molekularpathologische Methoden	15
2.2.3.1	Mikrodissektion und DNA-Extraktion	15
2.2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	15
2.2.3.3	Mikrosatellitenanalyse	16
2.2.3.4	Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	18
2.2.3.4.1	Hybridisierung und Hybridisierungsnachweis	18
2.2.3.4.2	Bildanalytische Auswertung der Hybridisierungsreaktion	20
2.2.4	Statistische Auswertung	21

3	Ergebnisse	22
3.1	Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Allelverluste (LOH)	22
3.1.1	Korrelation der Mikrosatelliteninstabilität mit klinischen und histopathologischen Parametern	25
3.2	Expression der DNA-Reparaturproteine hMLH1 und hMSH2	26
3.2.1	Expression in normaler Magenschleimhaut	26
3.2.2	Expression in Magenkarzinomen	26
3.3	Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	26
3.3.1	Häufigkeit genetischer Aberrationen in Magenkarzinomen	26
3.3.2	Korrelation mit histopathologischen Parametern	32
4	Diskussion	36
4.1	Komparative genomische Hybridisierung	36
4.2	FHIT-Gen und PTEN-Gen	40
5	Zusammenfassung	43
6	Literaturverzeichnis	44
7	Abkürzungen	56
8	Danksagung	57
9	Lebenslauf	58

1 Einleitung

1.1 Pathologie des Magenkarzinoms

Das Magenkarzinom ist trotz abnehmender Inzidenz weltweit der zweithäufigste maligne epitheliale Tumor (Pisani et al.,1999).

Sein Vorkommen zeigt große geographische Unterschiede. So beträgt die jährliche Mortalität in Japan ungefähr 65/150.000 Einwohnern, während sie in Deutschland mit 30/150.000 Einwohnern und den USA mit 10/150.000 wesentlich niedriger ist. Die Inzidenz beträgt in Deutschland zur Zeit 20/100.000 Einwohner. Dabei ist sie Erkrankung 1,5-2mal häufiger beim männlichen Geschlecht zu beobachten. Das mittlere Manifestationsalter liegt bei 55-65 Jahren, allerdings existiert auch schon zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr ein erster Erkrankungsgipfel.

Trotz aller Erkenntnisse in der Entstehung des Magenkarzinoms hat sich die Prognose in den letzten 20 Jahren nicht entscheidend verbessert. Auch heute sterben noch mehr als 80% der Patienten mit einem neu diagnostizierten fortgeschrittenen Magenkarzinom an ihrem Tumor. Dabei liegt die durchschnittliche relative 5-Jahres-Überlebensrate aller Magenkarzinome in Westdeutschland bei Männern bei 24,4% und bei Frauen bei 22,4% (Becker et al.,1998).

Eine entscheidende Bedeutung für die Prognose der Patienten fällt dabei der frühen Erkennung und chirurgischen Intervention zu, da bei kurativer Resektion im Stadium I und II zwischen 50% bis 80% der Patienten geheilt werden können, im Stadium IV jedoch nur weniger als 5% fünf Jahre nach Diagnosestellung noch leben. Eine zusätzliche Bestrahlung oder Chemotherapie konnte bisher, im Gegensatz zu anderen Tumoren, beim Magenkarzinom noch keine Verbesserung der Lebenserwartung bringen.

Allerdings spielen in die Prognose der Patienten noch viele weitere tumor- und patientenbezogene Prognosefaktoren mit ein. So kommt in diesem Zusammenhang der pathohistologischen pTNM-Klassifikation (Hermanek et al.,1992) die bedeutendste Rolle bei der Beurteilung der Prognose von Magenkarzinompatienten zu. Trotz dieser Einteilungen ist bekannt, daß die Überlebenschance von Patient zu Patient variiert, und keineswegs ein bestimmtes Tumorstadium das gleich lange Überleben garantiert. Diese Erkenntnis hat eine Reihe von Untersuchungen zur

Folge gehabt, um mögliche weitere Prognosefaktoren zu entdecken und etablieren, um Magenkarzinompatienten mit hohem Risiko besser zu erkennen und so eine individuell ausgerichtete Prognosevorhersage zu erreichen.

1.2 Genetische Instabilität

Man geht heute davon aus, daß in der genetischen Instabilität der zentrale Schlüssel zum Verständnis der Entstehung sowie des weiteren raschen Progresses karzinomatöser Erkrankungen liegt (Loeb, 1991; Hartwell, 1992). Diese molekularpathologische Eigenschaft der Krebszelle kann sich zum einen auf chromosomaler Ebene nachweisen lassen. Hier kann eine Störung der Verteilung der Chromosomen bei der Zellteilung zur Aneuploidie führen, die ihrerseits eine gesteigerte Mutilität dieser Zellen zur Folge hat (Orr-Weaver und Weinberg, 1998; Paulovic et al., 1997; Tomlinson et al., 1996). Weiter sind Deletionen und Translokationen bestimmter Chromosomen sowie sogenannte „fragile sites“ von großem wissenschaftlichem Interesse. Es handelt sich hierbei um Regionen, in denen es bevorzugt zu Chromosomenbrüchen kommt, die in die Entstehung maligner Tumoren mit einspielen können.

Zum anderen muß auf DNA-Ebene neben Punktmutationen , Deletionen und Veränderungen des Methylierungsstatus der DNA besonders das Phänomen der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) beachtet werden, dem ursächlich Veränderungen im Bereich von sogenannten DNA-Reparaturgenen zugrunde liegen können.

1.3 Mikrosatelliteninstabilität

Die Mikrosatelliteninstabilität ist ein bekannter Mechanismus bei der Entstehung gastrointestinaler Tumoren. Besonders dem hereditären nicht polyposis-assoziierten kolorektalen Karzinom, das sogenannte HNPCC-Syndrom (Lynch et al., 1996), das in

vielen Studien molekularpathologisch untersucht wurde, kommt eine gewisse Vorreiterrolle zu.

Mikrosatelliten sind repetitive Mono-, Di- und Trinukleotidsequenzen, die ubiquitär in nicht kodierten Bereichen des menschlichen Genoms vorkommen (Weber und Wong, 1993). Dabei ist die Anzahl der Wiederholungen in allen Körperzellen eines Individuums gleich, während sie interindividuell variieren kann, und bildet so ein wichtiges Markersystem. Bei den häufigen Dinukleotid-Repeats handelt es sich insbesondere um Cytosin-Adenin-Sequenzen (CA)_n, wobei n zwischen 2 und 10 betragen kann.

Darüber hinaus gibt die Mikrosatellitenanalyse auch die Möglichkeit, eine weitere Form der genetischen Instabilität zu detektieren, den Verlust der Heterozygotie (Loss of Heterozygosity, LOH). Hierbei kommt es durch DNA-Verluste zu einem Abschwächen oder vollständigen Fehlen eines Allels.

Am Beispiel des erblichen HNPCC-Syndroms konnte gezeigt werden, daß Karzinome des „mutator phenotype“ (30% der untersuchten Mikrosatelliten sind instabil) das Resultat defekter Reparaturgene („mismatch-repair“-Gene) sind (Thibodeau et al.,1993; Ionov et al.,1993; Aaltonen et al.,1993; Peltomäki et al.,1993; Bronner et al.,1993; Leach et al.,1993; Fishel,1993).

Da innerhalb einer Zelle Mutationen, die im Verlauf eines Zellzyklus entstehen, nicht selten sind, existieren bestimmte Reparaturmechanismen, die solche erkennen und korrigieren. Der hierfür zuständige Enzymkomplex ist seit Jahren bei Bakterien bekannt (Modrich et al.,1991).

Entsprechend der „two hit“-Hypothese (Knudson,1971), nach der erst der Ausfall von beiden Allelen eines Reparaturgens zu dessen Inaktivierung führt, muß bei familiären Tumorerkrankungen schon in der Keimbahn eine Mutation eines Allels vorliegen („first hit“). Im Laufe des Lebens wird dann das zweite beeinträchtigt („second hit“) und somit die Karzinomentwicklung begünstigt (Liu et al.,1995), da der Reparaturmechanismus erst gestört wird, wenn beide Allele nicht mehr funktionieren (Parsons et al.,1993). Bei sporadische Karzinomen tritt die MSI erst später auf, ist also keine Keimbahnmutation, spielt aber auch hier eine wichtige Rolle. Da die meisten Patienten hier keine Mutationen in den bekannten MMR-Genen aufweisen, muß man davon ausgehen, daß Mutationen in bisher noch nicht bekannten Genen vorliegen (Liu et al.,1995).

Inzwischen konnten eine Reihe von mismatch-repair-Genen lokalisiert werden, von denen einzelne (hMSH3 und hMSH6) auch bei sporadisch auftretenden malignen Tumoren mutiert sein können.

Jedoch konnte nicht nur in sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen Reparaturdefekte nachgewiesen werden, sondern auch beim Magenkarzinom (Rhyu et al.,1994; Chong et al.,1994), Pankreaskarzinom (Han et al.,1993; Brentnall et al.,1995), sowie beim Endometriumkarzinom (Carduff et al.,1996), Ösophaguskarzinom (Meltzer et al.,1994), Mammakarzinom (Paulson et al.,1996) und beim Prostatakarzinom (Cunningham et al.,1996; Terell et al.,1995) beobachtet worden.

Interessant ist, daß MSI-positive Tumoren im Rahmen des HNPCC-Syndroms sich durch ein besonderes klinisch-pathologisches Profil charakterisieren lassen (Lynch und Smyrk,1996) und man vermutet, daß sie eine günstigere Prognose haben. (Percesepe et al.,1997).

Vergleichbare Arbeiten bei sporadisch aufgetretenen Karzinomen kamen dagegen bisher noch zu widersprüchlichen Ergebnissen. So konnte das Auftreten von Mikrosatelliteninstabilität bei sporadischen kolorektalen Karzinomen mit einer besseren postoperativen Prognose korreliert werden (Thiobodeau et al., 1993; Cawkwell et al., 1995; Lothe et al., 1993; Bubb et al., 1996). Beim Mammakarzinom dagegen wurde für Patienten mit MSI-positiven Tumoren eine schlechtere Prognose beobachtet (Paulson et al., 1996).

Bei sporadischen Magenkarzinomen konnte der Nachweis der MSI ebenfalls nicht mit einer besseren Prognose korreliert werden (Wirtz et al., 1998).

1.4 Das FHIT-Gen

Das FHIT-Gen („fragile histidine triad“) liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 (3p14.2) und befindet sich somit in einer beim menschlichen Genom besonders instabilen und somit häufig von Bruchstellen betroffenen Region, „fragile site“ (Ohta et al., 1996). Deletionen im Bereich des FHIT-Gens oder aberrante Transkripte hiervon konnten bei den unterschiedlichsten menschlichen Tumoren nachgewiesen werden. Wichtig zu erwähnen sind hierbei das Bronchialkarzinom (Sozzi et al., 1996; Marchetti et al., 1998), das Mammakarzinom (Negrini et al., 1996; Ahmadian et al., 1997; Hayashi et al., 1997) aber auch Kopf-Hals-Tumoren (Virgilio et al., 1996; Mao et al., 1996) und maligne Tumoren und ihre Zelllinien aus dem Bereich des Gastrointestinaltraktes (Ohta et al., 1996; Kastury et al., 1996; Gemma et al., 1997; Tamura et al., 1997; Zou et al., 1997). Auch wenn die genaue Funktion noch nicht geklärt ist, so nimmt doch man an, daß das FHIT-Gen bei der Zellzyklusregulation und der DNA-Replikation von Bedeutung ist (Barnes et al. 1996, Druck et al., 1997). Daß der Verlust eines FHIT-Gens zu einem frühen Zeitpunkt stattfindet und somit ein wichtiger Schritt in der Karzinogenese einiger maligner Tumoren sein könnte, unterstreichen Untersuchungen beim Bronchialkarzinom und bei Kopf-Hals-Tumoren, bei denen eine enge Verbindung zwischen dem Verlust der Heterozygotie im Bereich des FHIT-Gens und abnormen Transkripten nachgewiesen werden konnte (Virgilio et al., 1996; Mao et al., 1996; Sozzi et al., 1997).

Trotz dieser Hinweise auf eine mögliche Funktion als Tumorsuppressorgen existieren zum Kolon-, Ovarial- und Endometriumkarzinom sowie zu Hirntumoren Arbeiten, die dem FHIT-Gen , wenn überhaupt, nur bei kleinen Subgruppen eine Bedeutung für deren Entstehung und Fortschreiten einräumen (Thiagalingam et al., 1996; Hendricks et al., 1997; Frank et al., 1997).

Die wenigen entsprechenden Publikationen zum Magenkarzinom basieren meist auf nur sehr geringen Tumorzahlen (Ohta et al., 1996; Kastury et al., 1996; Gemma et al., 1997), wobei in diesen Arbeiten Allelverluste oder aberrante Transkripte des FHIT-Gens in bis zu 50% der untersuchten Magenkarzinome nachgewiesen wurden. Eine prognostische Bedeutung scheinen diese Allelverluste beim Magenkarzinom allerdings nicht zu haben (Noguchi et al., 1999).

1.5 Das PTEN-Gen

Das PTEN („phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) -Gen oder auch MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers) -Gen genannt, konnte auf dem langen Arm des Chromosom 10 lokalisiert werden (10q23.3) (Myers et al., 1997). Es liegt damit in einem Bereich, in dem häufig Mutationen und Deletionen bei verschiedenen Karzinomen beobachtet werden konnten (Li und Sun et al., 1997; Li et al., 1997; Steck et al., 1997).

Das PTEN-Gen kodiert für eine Phosphatase, die homolog zu den Adhäsionsmolekülen Tensin und Auxillin ist, und somit in der Lage einen intrazellulären „second messenger“ zu dephosphorilieren und inaktivieren (PI-3,4,5-P3, Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat), der nun nicht mehr in der Lage ist, die Serin-Threoninkinase, Akt, zu aktivieren. So führt die Phosphataseaktivität von PTEN zu Down-Regulation von Akt, welche Apoptose unterdrückt und das Überleben von Zellen unterstützt (Sun et al., 1999). Außerdem induziert PTEN das Verharren von Zellen im G1-Stadium des Zellzyklus (Li und Sun et al., 1998), sowie das Verhindern von fokaler Adhäsion, Streuung sowie Migration von Zellen (Tamura et al., 1998). Auch wird ihm eine Regulation bei der tumorinduzierten Angiogenese zugeschrieben (Wen et al., 2001).

Mutationen und LOH im Bereich des PTEN-Gens konnten bei einer Vielzahl verschiedener maligner Tumoren nachgewiesen werden, wie dem Glioblastom (Rahseed et al., 1992; Kraus et al., 2000), dem Mamma- und Endometriumkarzinom (Peiffer et al., 1995; Tashiro et al., 1997), aber auch bei Melanomen (Herbst et al., 1994; Birck et al., 2000) sowie Leber- und Lungenkarzinomen (Ding et al., 1995; Kohno et al., 1998). Ebenso wurde über genetische Veränderungen des PTEN-Gens im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom berichtet (Cairns et al., 1997; Huang et al., 2001).

So konnte ein enger Zusammenhang zwischen dem Verlust der Heterozygotie im Bereich des PTEN-Gens und abnormen Transkripten beim Mamma- und Prostatakarzinom sowie dem Glioblastom nachgewiesen werden, die hervorheben, daß auch der Verlust des einen PTEN-Allels ein wichtiger Schritt in der Karzinogenese dieser Tumoren sein könnte (Li et al., 1997).

Obwohl diese Ergebnisse eine mögliche Funktion des PTEN-Gens als Tumorsuppressorgen nahelegen (Li et al., 1997), liegt auch eine Untersuchung zu

sporadischen Karzinomen des Gastrointestinaltraktes vor, die vermuten läßt, daß Mutationen im Bereich des PTEN-Gens, wenn überhaupt, nur bei kleinen Randgruppen eine mögliche Rolle für die Entstehung und das Fortschreiten dieser Tumoren spielen (Chang et al., 1999).

Allerdings wurde in einer weiteren Arbeit zum Magenkarzinom eine Korrelation zwischen der genetischen Veränderung des PTEN-Gens und der Tumorprogression, der Metastasierung und der Überlebensrate beschrieben (Kang et al., 2002).

Insgesamt steht jedoch eine eindeutige Klärung der Rolle von PTEN-Mutationen und LOH beim Magenkarzinom noch aus.

1.6 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Vogelstein und seine Mitarbeiter (1990) konnten zeigen, daß es bei der Entstehung eines Tumors schrittweise zu einer Ansammlung von kritischen Mutationen kommt, die als sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz beim kolorektalen Karzinom zu einer Aufeinanderfolge bestimmter genomischer Aberrationen in verschiedenen Zielgenen führt. Nachfolgend konnte auch für andere Karzinome diese Sequenz vom normalen Epithel über verschiedene Zwischenstufen zum Karzinom mit entsprechenden genetischen Befunden korreliert werden, so zum Beispiel beim Zervixkarzinom, beim duktalem Mammakarzinom aber auch beim Pankreaskarzinom (Hahn et al., 1996; 1997). Für das Magenkarzinom konnte diese schrittweise erfolgende Progression nur in Ausnahmefällen beobachtet werden (Maesawa et al., 1995). Trotzdem wurde, in Anlehnung an das kolorektale Karzinom, auch beim Magenkarzinom versucht, in der Tumorgenese die der Adenom-Karzinom-Sequenz entsprechenden genetischen und phänotypischen Veränderungen der Tumorzellen nachzuweisen (Tahara et al., 1995). Zwar konnten so einzelne Chromosomenabschnitte mit einem häufigen Verlust der Heterozygotie entdeckt werden, doch aufgrund der geringen Fallzahlen kann man nicht von gesicherten Ergebnissen sondern nur von Einzelfalldarstellungen reden.

So sind nur Hypothesen über den zeitlichen Verlauf der Tumorentstehung beim Magenkarzinom möglich. Ursächlich hierfür ist unter anderem das methodisch und zeitlich sehr aufwendige Verfahren, daß die Suche nach solchen potentiellen Kandidatengen sicherlich verzögert.

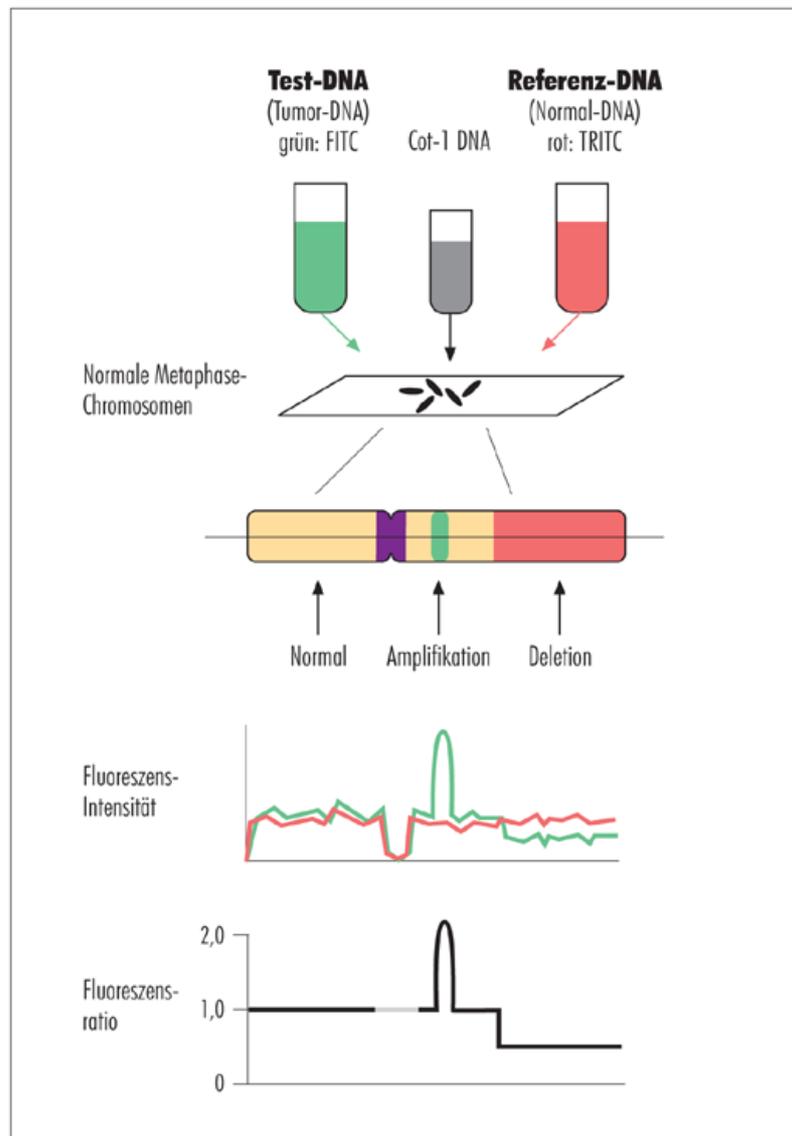


Abb 1: Schematische Darstellung der CGH-Technik. Jeweils fluoreszenzmarkierte Tumor-DNA und normale Referenz-DNA werden mit normalen Metaphase-Chromosomen hybridisiert. Die Fluoreszenzsignale werden mit einer Kamera aufgenommen und das Rot-Grün-Verhältnis für jedes Chromosom bildanalytisch ausgewertet.

Die komparative genomische Hybridisierung (CGH) als molekularzytogenetische Methode erlaubt es, alle unbalancierten chromosomalen Aberrationen der Test-DNA in einem Versuchsansatz zu identifizieren, und vereinfacht somit die Suche nach möglichen betroffenen Genorten (Kallioniemi et al., 1992). Beobachtete Veränderungen können entweder als DNA-Zugewinne (z.B. Amplifikationen) oder DNA-Verluste (z.B. Deletionen) erkannt werden und als ein Spiegelbild möglicher Aktivierungen von Onkogenen (DNA-Gewinn) oder Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens (DNA-Verlust) dienen. Beides sind entscheidende Faktoren in der Tumorentstehung und Progression. Die CGH eignet sich somit als Screeningmethode, auf deren Ergebnisse man aufbauen und anschließend veränderte Genorte gezielt mit anderen Methoden, wie zu Beispiel der Mikrosatellitenanalyse, auf Allelverluste untersuchen kann.

Ein weiterer entscheidender Vorteil der CGH beruht auf der Möglichkeit, neben Frischmaterial auch in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe sozusagen retrospektiv zu analysieren (Kallioniemi et al., 1994a; Isola et al., 1994).

Die CGH bietet sich durch den Vergleich von Tumor-DNA zu normalen Metaphasechromosomen für eine erweiterte Tumordiagnostik mit der Möglichkeit einer genetischen Tumorklassifikation in der Pathologie an, wie am Beispiel des Blasenkarzinoms gezeigt werden konnte (Kallioniemi et al., 1995, Voorter et al., 1995). Darüber hinaus ist es möglich, neben bekannten auch noch unbekannte chromosomale Aberrationen zu sichten, die zur Charakterisierung von neuen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen dienen können.

Mittlerweile sind zahlreiche Arbeiten zu unterschiedlichen Tumoren durchgeführt worden, die eine Vielzahl unterschiedlicher chromosomaler Aberrationen nachweisen konnten (Knuutila et al., 1998). Auch konnten in einzelnen Arbeiten bestimmte Muster von chromosomalen Aberrationen mit Hilfe der CGH bei unterschiedlichen Tumoren detektiert werden, die zum Teil mit einer bestimmten Prognose oder einem bestimmten Verhalten der Tumoren, wie einem aggressiveren Wachstum oder aber einer vermehrten Metastasierung der Primärtumoren, korreliert waren (Mammakarzinom: Isola et al., 1995; Harnblasenkarzinom: Richter et al., 1997; Simon et al., 1998; Nierenzellkarzinom: Moch et al., 1996; Gronwald et al., 1997; Ovarialkarzinom: Iwabuchi et al., 1995; Kopf-Hals-Tumoren: Bockmühl et al., 1997; maligne fibröse Histiozytome: Larramendy et al., 1997). Auch beim

Bronchialkarzinom waren über die Ergebnisse der CGH Aussagen zur Prognose möglich (Petersen et al., 1996).

Entsprechende Ergebnisse zum Magenkarzinom liegen bisher noch nicht vor, es existieren lediglich einzelne Arbeiten an kleineren Fallzahlen, die sich jedoch vorwiegend auf den Zusammenhang der genetischen Veränderungen mit der Tumorhistologie oder dem Tumorstadium konzentrieren (Kokkola et al., 1998; Koizumi et al., 1997; Vidgren et al., 1998). Deshalb hatte die vorliegende Arbeit unter anderem auch als Ziel, nicht nur die phänotypischen (morphologischen), sondern auch die genotypischen Veränderungen zu untersuchen.

1.7 Fragestellung und Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur genetischen Instabilität des Magenkarzinoms und deren Relevanz für die Tumorprogression und Lymphknotenmetastasierung.

Hierzu wurde eine Serie von 38 Magenkarzinomen mittels komparativer genomischer Hybridisierung untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Identifizierung von Genorten als Grundlage für weiterführende Untersuchungen potentieller Kandidatengene, die für die Entstehung des Magenkarzinoms eine Rolle spielen könnten.

Darüber hinaus wurde die mögliche Bedeutung allelischer Imbalancen im Sinne von Verlusten der Heterozygotie (LOH) im Bereich der vermuteten Tumorsuppressorgene FHIT und PTEN für die Karzinogenese des Magenkarzinoms untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Es wurde von 38 Patienten mit Magenkarzinom jeweils Proben des Tumor- als auch des Normalgewebes in flüssigen Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Proben bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Von jedem Tumor wurden die den für die molekularen Analysen entnommenen Gewebeproben benachbarten Tumoranteile in Paraffin eingebettet und als morphologisches Referenzmaterial archiviert.

2.1.1 Untersuchtes Patientenkollektiv

Das untersuchte Patientenkollektiv (vergleiche Tabelle 1) umfaßte 15 weibliche (39,5%) und 23 männliche Patienten (60,5%). Das durchschnittliche Alter betrug 65,6 Jahre (Median: 67 Jahre; Spannweite: 35 bis 85 Jahre).

2.2 Methoden

2.2.1 Histopathologische Untersuchungen

Die Tumoren wurden histologisch nach der WHO-Klassifikation (Oota und Sobin, 1977) und nach der Laurén-Einteilung (1965) klassifiziert. Bezüglich der Tumorstadien erfolgte eine Unterteilung nach der TNM-Klassifikation der UICC (1987).

Folgende Parameter wurden erhoben:

- Invasionstiefe (pT-Kategorie)
- Lymphknotenbefall (pN-Kategorie)
- Differenzierungsgrad (Grading)
- Blutgefäßinvasion (BVI) und Lymphgefäßinvasion (LVI; Gabbert et al., 1991)

Tabelle 1: Patientendaten: Alter, Geschlecht, pTNM-Stadien, Grading, Lymphgefäßinvasion (LVI) Blutgefäßinvasion (BVI)

Fall	Alter	Geschlecht	Laurén	T	N	M	G	LVI	BVI
1	66	w	intestinal	2	0	X	3	+	+
2	55	m	diffus	3	2	X	3	-	-
3	85	w	diffus	4	1	X	3	+	-
4	77	m	intestinal	2	0	X	2	+	-
5	67	m	diffus	2	0	X	3	-	-
6	59	m	gemischt	3	0	X	3	-	-
7	51	m	diffus	2	1	X	3	+	-
8	65	m	diffus	2	1	X	3	-	-
9	66	m	diffus	3	2	1	3	-	-
10	63	m	diffus	3	2	1	3	+	+
11	73	w	intestinal	1	0	X	2	-	-
12	83	m	intestinal	2	1	X	3	-	-
13	77	w	intestinal	2	2	X	2	+	-
14	80	m	intestinal	2	2	X	2	+	-
15	77	m	gemischt	2	1	X	3	+	-
16	73	m	diffus	2	0	X	3	+	-
17	64	m	intestinal	2	1	X	2	+	+
18	66	w	gemischt	3	2	X	3	-	-
19	76	w	intestinal	1	0	X	2	-	-
20	57	m	intestinal	2	1	X	2	+	+
21	35	m	intestinal	2	1	X	3	-	-
22	53	w	diffus	3	0	X	4	-	-
23	69	m	intestinal	2	2	X	3	+	+
24	45	w	diffus	1	0	X	3	-	-
25	67	m	gemischt	3	1	X	4	-	-
26	68	w	intestinal	3	2	X	3	-	-
27	48	m	gemischt	3	2	1	3	+	+
28	77	w	intestinal	2	1	X	3	-	-
29	76	w	diffus	3	1	X	3	-	-
30	44	w	diffus	2	2	X	3	-	-
31	69	m	intestinal	2	2	X	2	+	-
32	73	w	diffus	2	1	X	3	-	-
33	68	w	diffus	2	2	X	3	+	+
34	70	m	diffus	2	0	X	3	-	-
35	61	m	intestinal	2	0	X	2	+	+
36	69	m	diffus	3	1	X	3	+	-
37	58	w	diffus	2	2	X	3	-	-
38	63	m	gemischt	2	2	1	4	-	-

2.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden in allen Fällen an Paraffinschnitten sowohl des Normal- wie auch des Tumorgewebes durchgeführt. Nach einer Inkubation bei 60°C über Nacht erfolgte die Entparaffinierung und anschließend die Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe. Durch 10minütige Inkubation in 3%-igem H₂O₂ wurde die endogene Peroxidaseaktivität blockiert. Anschließend erfolgte nach Blockierung unspezifischer Bindungen mit 5%-igem Normalserum die Inkubation der monoklonalen Primärantikörper gegen hMSH2 (Fa. Calbiochem) in der Verdünnung 1:80 und gegen hMLH1 (Fa. PharMingen) in der Verdünnung 1:60 bei 4°C für annähernd 12 Stunden. Der Sekundärantikörper (Firma SkyTek) wurde im Anschluß für 30 Minuten inkubiert, danach erfolgte für eine Stunde eine Avidin-Biotin-Komplex-Reaktion (siehe Hsu et al., 1981) mit dem ABC-Elite-Kit (Fa. Vector). Sichtbar wurde das Reaktionsprodukt durch Immersion mit Diaminobenzidintetrachlorid der Fa. Sigma und Gegenfärbung mit Hämatoxylin gemacht. Bei allen immunhistochemischen Untersuchungen wurde eine Positivkontrolle für das jeweils zu untersuchende Antigen mitgeführt. Bei der entsprechenden Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch 5%-iges Serumalbumin ersetzt.

Die abschließende Auswertung wurde ohne Kenntnis der jeweiligen histopathologischen Daten der Tumoren vorgenommen.

2.2.2.1 Auswertung der Expression von MLH1 und MSH2

Bei der Auswertung der immunhistologischen Färbungen wurde lediglich die nukleäre Immunreaktion gewertet. Dabei wurden Tumoren mit einer nukleären Reaktion in mehr als 10% der Tumorzellen als positiv gewertet.

2.2.3 Molekularpathologische Methoden

2.2.3.1 Mikrodissektion und DNA-Extraktion

Für den Nachweis von LOH und Mikrosatelliteninstabilität wurde bei insgesamt 30 Magenresektaten aus dem Zeitraum 1996 bis 1998 Tumor- und Normalgewebe innerhalb von 30 Minuten nach der Operation entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Tumorproben wurden mittels Gefrierschnitten auf den Anteil von Tumorgewebe am Gesamtgewebe untersucht. Für die weiteren Untersuchungen wurden nur Proben mit mindestens 70%igem Tumoranteil verwendet. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp-Tissue-Kit der Fa. Qiagen (Hilden). Hierfür wurde das bei -80°C tiefgefrorene Gewebe aufgetaut, zerkleinert und in 220 μl ATL-Puffer gegeben. Nach Zugabe von 24 μl Proteinase K (25mg pro ml) wurde diese Lösung über mindestens 12 Stunden bei 55°C in einem Thermoschüttler inkubiert, bis das Gewebe vollständig lysiert war. Zum Abschluß erfolgte zunächst eine Aufreinigung der extrahierten DNA in 240 μl AL-Puffer (bei 70°C) und 250 μl Ethanol (100%) sowie mehrfaches Zentrifugieren mit 500 μl AW-Puffer (Waschpuffer). Nach dem Abpipettieren des Überstandes wurde das DNA-Pellet zweimal in 100 μl AE-Puffer bei 70°C gelöst, und stand nun den weiteren Untersuchungen der Mikrosatellitenanalyse und der Mutationsanalyse zur Verfügung.

2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Beurteilung der entsprechenden DNA-Fragmente auf Mikrosatelliteninstabilitäten im Bereich der jeweiligen untersuchten Marker diente die Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Sowohl die aus dem Tumor als auch die aus dem Normalgewebe extrahierte DNA wurde so exponentiell vervielfältigt. Für die PCR wurden Reagenzien des PCR-Core-Kit der Fa. Qiagen und Primer der Fa. Roche eingesetzt. Das jeweilige Gesamtvolumen der PCR betrug 50 μl mit einem DNA-Gehalt von ungefähr 200ng pro Reaktionsansatz.

Für die PCR wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt: Nach einer vierminütigen Denaturierungsphase bei 94°C folgten dann 35 Zyklen. Jeder der Zyklen bestand aus einem Denaturierungsschritt (1 Minute bei 94°C), der Annealing-Phase (45 Sekunden bis 1 Minute bei 55°C bis 58°C je nach untersuchtem Primer) und der Elongationsphase (1 Minute bei 72°C). Zum Abschluß erfolgte eine letzte vierminütige Elongation bei 72°C.

Von jedem Reaktionsansatz wurden zwei Kontrollen mitgeführt: eine Negativkontrolle, um eine Kontamination mit fremder DNA auszuschließen und eine Positivkontrolle, die DNA von hoher Qualität enthielt. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde sichergestellt, daß die erhaltenen DNA-Fragmente die korrekte Größe hatten.

Die PCR-Produkte wurden auf denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Herstellung der jeweiligen Gele erfolgte mit Hilfe der Fertiglösungen SequaGel-8 und SequaGel complete (Fa. Biozym, Hessisch-Oldendorf). Anschließend an die Elektrophorese wurde das Gel einer Silberfärbung unterzogen, fotografiert und schließlich in einem Geltrockner auf Whatman-Papier vakuumgetrocknet.

2.2.3.3 Mikrosatellitenanalyse

Für die Mikrosatellitenanalyse wurden 8 Dinukleotid-Marker $(CA)_n$ und ein Mononukleotid-Marker $(A)_n$ untersucht, die unterschiedliche Loci auf insgesamt 4 Chromosomen erfassen (vergleiche Tabelle 2).

Der Marker D2S123 gehört zu einem Teil des MMR-Genes hMSH2, während die Marker D10S209, D10S212, D10S215 und D10S587 im Bereich des PTEN/MMAC1-Gens auf Chromosom 10 lokalisiert sind. (Chang et al., 1999;)

Zum FHIT-Gen auf Chromosom 3 (Noguchi et al., 1999), das der „fragile histidine triad“ - Familie zugerechnet wird, gehört der Marker D3S1300, ebenso wie die Marker D3S1313 und D3S1234.

Der Mononukleotid-Marker BAT 25 gehört zu Intronsequenzen des c-kit-Onkogens (Parson et al., 1995).

Tabelle 2: Untersuchte Mikrosatelliten-Loki bei 30 Magenkarzinomen

Marker	Lokalisation	Primer	Annealing (°C)	Repeat
D3S1313	3p21.1-3p14.2	5'ccccttggaatcactg 5'ccatgaataagccttgcc	55	(CA) _n
D3S1300	3p21.1-3p14.2	5'agctcacattctagtcagcct 5'gccaattccccagatg	58	(CA) _n
D3S1234	3p21.1-3p14.2	5'cctgtgagacaaagcaagac 5'gacattaggcacagggctaa	58	(CA) _n
D10S209	10q24-10q26	5'caaatgtgctcatatcctgc 5'cccatcagtagtaaaggggc	58	(CA) _n
D10S212	10pter-10qter	5'gaagtaaagcaagttctatccacg 5'tctgtgtacggtgaaaatccc	56	(CA) _n
D10S215	10q22-10q23	5'tggcatcattctgggga 5'gctttacgtttctcacatggt	56	(CA) _n
D10S587	10pter-10qter	5'cccagattcatggcttc 5'ttctgctgacacgggc	56	(CA) _n
D2S123	2p-21- 16/hMSH2	5'aacaggatgcctgcctt 5'ggactttccacctatgggaa	58	(CA) _n
BAT 25	Intron c-kit	5'tcgctccaagaatgtaagt 5'tctgcattttaactatggctc	58	(A) _n

Im veränderten Laufverhalten der Tumor-DNA im Vergleich zur Normal-DNA des gleichen Patienten läßt sich die Instabilität der untersuchten Mikrosatellitenmarker erkennen. Dabei führen die in der Tumor-DNA eingefügten repetitiven Sequenzen, die den Mikrosatelliten entsprechen, zu einem Motilitätsshift der Banden. Eine zusätzliche Analyse auf einen möglichen Verlust der Heterozygotie (LOH) im Bereich der untersuchten Genorte erfolgte bei denjenigen Fällen, bei denen keine Mikrosatelliteninstabilität bezüglich der untersuchten Marker vorlag. Ein solcher LOH wurde hierbei als sichtbarer Verlust der Bandenintensität von mindestens 50% im Vergleich zur Normal-DNA definiert.

2.2.3.4 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die komparative genomische Hybridisierung beruht auf dem Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Die sog. Test-DNA bildet die aus dem Tumorgewebe extrahierte und zu analysierende genomische Tumor-DNA, während als sog. Referenz-DNA eine zweite DNA-Probe aus normaler (gesunder) DNA dient. Beide DNA-Proben werden in einem Mischungsverhältnis von 1:1 auf normale Metaphase-Chromosomen hybridisiert. Zusätzlich verwendete unmarkierte humane Cot1-DNA soll die unerwünschte Hybridisierung zentromerischer und heterochromatischer Regionen verhindern (Kallioniemi et al., 1992; 1994b,c). Test- und Referenz-DNA, beide zu gleichen Teilen eingesetzt, konkurrieren nun um die Bindungsstellen an ihre spezifische Region der normalen Metaphase-Chromosomen. Abhängig von der Kopienzahl der zugehörigen DNA-Sequenz in den beiden DNA-Proben werden die chromosomalen Anbindungsorte entweder bevorzugt von der Test-DNA (z.B. aufgrund von Amplifikation bestimmter Onkogene in der Tumor-DNA) oder von der Referenz-DNA (z.B. durch Verlust von DNA-Sequenzen im Bereich der Tumor-DNA aufgrund von Deletionen) besetzt. Durch vorherige Markierung von Test- und Referenz-DNA mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen lässt sich diese unterschiedliche Hybridisierungsrate erfassen. Die Signalverteilung und -intensität entlang der Achsen der einzelnen Chromosomen wird mittels eines Bildanalysesystems gemessen und die beiden Fluoreszenzprofile zu einem Gesamtverhältnisprofil verrechnet (Petersen et al., 1996). Im Normalfall liegen gleiche Abschnitte der Test-DNA und der Referenz-DNA in gleicher Kopienzahl vor. Für diese Abschnitte werden dann auch gleiche Fluoreszenzwerte ermittelt, und die Fluoreszenzratio ergibt den Wert 1.

2.2.3.4.1 Hybridisierung und Hybridisierungsnachweis

Durch Nick-Translation erfolgte die Markierung der DNA-Fragmente mit Hilfe des Biotin-Nick-Translations-Mix für die Test-DNA und des DIG-Nick-Translations-Mix für die Referenz-DNA der Fa. Boehringer-Mannheim. Dabei wurden jeweils 1µg sowohl

der Test- als auch der Referenz-DNA eingesetzt (weitere Einzelheiten können dem ausführlichen Protokoll des Herstellers entnommen werden).

Zur DNA-Fällung werden 300µl 100%iges Ethanol zu einem Gemisch aus jeweils 36µl biotinylierter Test-DNA und digoxigenierter Kontroll-DNA mit 30µl Cot1-DNA und 5µl Salmon-Sperm-DNA hinzugegeben. Im Anschluß daran erfolgte die Präzipitation der Lösung für 30 Minuten bei -80° Celsius und das Abzentrifugieren .

Zur Denaturierung der Chromosomenpräparate wurden die Slides zuerst exakt 5 Minuten bei 73° Celsius in FA/SSC und anschließend für 3 Minuten in eiskaltes 70%iges Ethanol eingestellt. Das DNA-Pellet wurde bei 37° Celsius getrocknet und dann in 5,5 µl deionisiertem Formamid resuspendiert. Die Denaturierung der Proben erfolgte nach Zugabe von 5µl Mastermix (20%iges Dextransulfat in 2fach SSC) bei 75° Celsius für 5 Minuten im Wasserbad und das Preannealing bei 37° Celsius für 45 Minuten.

Die DNA-Proben wurden vollständig auf die Slides mit den metaphasischen Chromosomenpräparaten (Fa. Vysis) aufgetropft, anschließend ein 18x18 mm Deckgläschen luftblasenfrei aufgelegt und an den Rändern mit Fixogum luftdicht abgesichert. Die Hybridisierung der Präparate bei 37° Celsius für 4-5 Tage fand in einer Stahlwanne schwimmend statt.

Nach Abschluß erfolgte die Waschung der Objektträger in 50%igem Formamid/2fach SSC bei 45° Celsius und 0,1fach bei 60° Celsius, um unspezifische Bindungen zu lösen. Mit 3%igem Rinderserum-Albumin (BSA) wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt, und anschließend die biotinylierten Fragmente der Tumor-DNA (Test-DNA) und die digoxinierten Fragmente der Normal-DNA (Referenz-DNA) mit Avidin-FITC (1:200; grüne Fluoreszenz) und Antidigoxigenin-TRITC (1:40; rote Fluoreszenz; beide Fa. Boehringer-Mannheim) gleichzeitig nachgewiesen. Für die Karyotypisierung mit DAPI (4,6 Diamino-2-Phenylindol) wurden die Metaphase-Chromosomen für 7–10 Minuten gegengefärbt (0,8 µg/ml) und zum Abschluß in Antifading-Puffer (Fa. Vector) eingedeckelt.

2.2.3.4.2 Bildanalytische Auswertung der Hybridisierungsreaktion

Die weitere Analyse der fluoreszenzmarkierten Metaphasen-Präparate wurde mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss-Axiophot) mit Hilfe eines vom Auswertungsprogramm gesteuerten externen Fluoreszenz-Filterrad und einer angeschlossenen CCD-Videokamera durchgeführt. Die digitale Bildanalyse der aufgenommenen DAPI-Färbung und der FITC- und TRITC-Fluoreszenz erfolgte mit dem Hard- und Softwareprogramm der Fa. Applied Imaging (Version 2.21). Bei jedem untersuchten Magenkarzinom wurden durchschnittlich 13 Metaphasen (range: 11-15) ausgewertet. Zunächst erfolgte eine Karyotypisierung der DAPI-gefärbten Chromosomen. Danach wurde die grüne und rote Fluoreszenz der FITC- und TRITC-markierten Chromosomen aufgenommen, und die durchschnittlichen Fluoreszenzratio-Profile errechnet. Im Normalfall liegen gleiche Abschnitte der Test-DNA und der Referenz-DNA in gleicher Kopienzahl vor. Daraus ergeben sich gleiche Fluoreszenzwerte und eine Fluoreszenzratio mit dem Wert 1. Überwiegt die Rotfluoreszenz der hybridisierten Referenz-DNA, so liegt ein Verlust (sog. „loss“) von Abschnitten der Tumor-DNA vor und das Ratio-Profil sinkt unter den Wert 1. Bei einem Zugewinn (sog. „gain“) überwiegt die Grünfluoreszenz der Test-DNA, und das Ratio-Profil steigt auf einen Wert größer 1. Dabei wurden lediglich Veränderungen gewertet, die den unteren Schwellenwert von 0,75 bzw. den oberen Schwellenwert von 1,25 des Fluoreszenzratio-Profils unter- bzw. überschritten. Ein Überschreiten des Ratio-Profil über den Wert 2 wurde als sog. high-level-Amplifikation gewertet (vergleiche hierzu auch du Manoir et al., 1995a,b; Piper et al., 1995; Lundsteen et al., 1995).

Aufgrund CG-reicher Regionen sind die kurzen Arme von Chromosom 1 (1p-ter), Chromosom 6 und 17 sowie die gesamten Chromosomen 19 und 22 nur eingeschränkt beurteilbar (Kallioniemi et al., 1994a; Isola et al., 1995). Deshalb wurden diese Regionen ebenso wie das X- und Y-Chromosom bei der Analyse nicht berücksichtigt. Ausgeschlossen wurden auch die perizentromeren Regionen, da sie während der Hybridisierung durch die COT1-DNA geblockt werden, sowie der Bereich der Telomeren, da hier die Fluoreszenzintensitäten graduell abnehmen. Eingeschlossen in jedes CGH-Experiment war eine Kontrollhybridisierung mit Biotin- und Digoxigenin-markierter Normal-DNA.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die Testung der Unterschiede zwischen den einzelnen Ausprägungsgraden der untersuchten Parameter erfolgte für dichotome Variablen mit dem Fischer-Exakt-Test, für kategoriale Variablen mit dem Wilcoxon-Mann-White-Test für 2 Gruppen und dem Kruskal-Wallis-Test für mehr als 2 Gruppen.

Als statistisch signifikant galt jeweils eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Allelverluste (LOH)

Während bei 24 der 30 untersuchten Tumoren (80%) keine MSI nachweisbar war, konnte bei 6 Tumoren (20%) bei mindestens einem Marker eine MSI nachgewiesen werden. Drei Tumoren wiesen Instabilitäten in 4-6 Markern auf, zwei Karzinome bei 2 Markern sowie ein Tumor in einem Marker (Tabelle 3).

Allelverluste (LOH) im Bereich der untersuchten Marker konnten bei fünf Tumoren nachgewiesen werden, wobei in drei Fällen ein alleiniger Allelverlust und in den restlichen zwei Fällen eine Kombination mit Mikrosatelliteninstabilitäten vorlag (Tabelle 3).

Tabelle 3: MSI-Häufigkeit und LOH bei 30 Magenkarzinomen

Nr.	D3S13 13	D3S13 00	D3S12 34	D10S2 09	D10S2 12	D10S2 15	D10S5 87	D2S12 3	BAT 25
M 1	2	1	1	1	1	2	2	1	1
M 2	LOH	2	1	1	2	2	1	2	1
M 3	2	2	1	1	2	2	1	2	1
M 5	2	1	1	1	1	2	2	2	1
M 6	2	1	1	1	1	MSI	1	2	MSI
M 7	2	2	2	1	1	1	1	2	1
M 9	2	2	1	LOH	1	1	2	2	1
M10	2	2	1	2	1	2	1	1	1
M11	2	2	2	2	1	2	2	2	1
M12	2	2	1	2	2	2	2	1	1
M13	2	2	1	MSI	MSI	2	2	MSI	MSI
M14	2	2	2	2	2	MSI	MSI	MSI	MSI
M15	2	1	2	2	1	2	2	1	1
M16	LOH	MSI	2	MSI	MSI	MSI	MSI	1	MSI
M17	LOH	2	1	1	2	2	2	1	1
M18	1	2	2	2	1	2	2	1	1
M19	1	2	2	2	MSI	2	2	1	MSI
M20	1	2	2	2	1	2	2	1	1
M21	1	1	1	2	1	1	2	2	1
M22	1	2	2	2	2	2	2	1	1
M23	2	1	1	2	1	2	LOH	MSI	1
M24	1	2	2	2	2	1	2	2	1
M25	1	2	2	2	2	1	2	1	1
M26	2	2	1	2	2	2	2	2	1
M27	1	2	-	2	2	2	2	1	1
M28	1	2	1	2	2	1	1	1	1
M29	1	2	1	2	1	1	2	2	1
M30	2	1	2	2	1	2	-	1	1
M31	1	2	2	2	1	-	2	1	1
M32	2	1	2	2	1	2	1	1	1

1: homozygot

LOH: Loss of Heterozygoty

2: heterozygot

MSI: Mikrosatelliteninstabilität

Der Mononukleotidmarker BAT-25 wies in 5 Tumoren (17%) eine Mikrosatelliteninstabilität auf (Abb. 2), die Marker D2S123, D10S212 und D10S215 in 3 Fällen (10%) und die Marker D10S587 und D10S209 in 2 Fällen (7%) bzw. der Marker D3S1300 in einem Fall (3%).

Keine Instabilitäten fanden sich bei den Markern D3S1234 und D3S1313. Allerdings ließ sich bei letzterem bei 3 Tumoren ein Allelverlust aufzeigen. Auch die Marker D10S209 und D10S587 waren in jeweils einem Fall positiv im Bezug auf solche Verluste (3%). Ansonsten konnten keine LOHs bei weiteren Markern nachgewiesen werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Anzahl und Prozentzahlen der informativen Fälle mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI) oder Loss of Heterozygosity (LOH)

Locus	Gen	informativ (n)	MSI		LOH	
			(n)	(%)	(n)	(%)
D3S1313		30	0	0	3	10
D3S1300	FHIT	30	1	3	0	0
D3S1234		29	0	0	0	0
D10S209		30	2	7	1	3
D10S212	PTEN	30	3	10	0	0
D10S215		29	3	10	0	0
D10S587		29	2	7	1	3
D2S123	MSH2	30	3	10	0	0
BAT-25	c-kit	30	5	17	0	0

BAT 25
Fall 13

N **T**

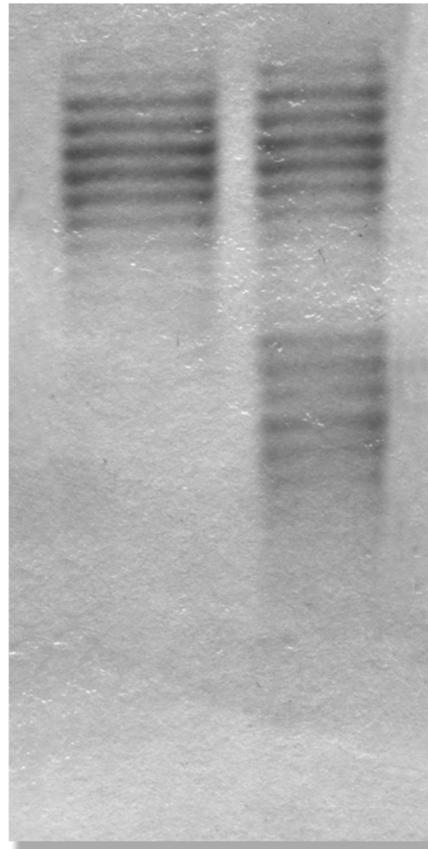


Abb 2: Beispiel einer Mikrosatelliteninstabilität im Mononukleotid-Marker BAT 25; Lokalisiert in der Intron-Sequenz des c-kit-Gens.
Linke Banden: Tumorgewebe; rechte Banden: normale Magenschleimhaut

3.1.1 Korrelation der Mikrosatelliteninstabilität mit klinischen und histopathologischen Parametern

Für keinen der untersuchten histopathologischen Parameter ließen sich signifikante Unterschiede zwischen Tumoren ohne Instabilität (MSS) und solchen mit MSI nachweisen (Tabelle 5).

Bezüglich des Alters der Patienten fanden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten unter oder mit 67 Jahren und solchen, die älter als 67 Jahre waren.

Dies galt auch für das Geschlecht der Patienten.

Tabelle 5: Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Korrelation mit klinischen und histopathologischen Parametern bei 30 untersuchten Magenkarzinomen

	Anzahl (n)	MSS		MSI	
		(n)	(%)	(n)	(%)
Alter					
≤ 67	16	15	94%	1	6%
> 67	14	9	64%	5	36%
Geschlecht					
weiblich	13	11	85%	2	15%
männlich	17	13	77%	4	23%
pT-Kategorie					
pT1 ^a - pT2	19	14	74%	5	26%
pT3 – pT4 ^b	11	10	91%	1	9%
pN-Kategorie					
negativ	8	5	63%	3	37%
positiv	22	19	86%	3	14%
Lymphgefäßinvasion					
negativ	17	15	88%	2	2%
positiv	13	9	69%	4	31%
Blutgefäßinvasion					
negativ	24	19	79%	5	21%
positiv	6	5	83%	1	17%
Lauren-Klassifikation					
intestinal	13	9	69%	4	31%
diffus	12	11	92%	1	8%
gemischt	5	4	80%	1	20%
Diferenzierungsgrad					
G1 ^c / G2	7	4	57%	3	42,9%
G3 / G4 ^d	23	20	87%	3	13,0%

^apT1: nur 3 Tumoren; ^bpT4: nur 1 Tumor; ^cG1: kein Tumor; ^dG4: nur 3 Tumoren

3.2 Expression der DNA-Reparaturproteine hMLH1 und hMSH2

3.2.1 Expression in normaler Magenschleimhaut

Bei allen 38 untersuchten Tumoren fand sich eine Positivität in der benachbarten normalen Magenschleimhaut sowohl für hMLH1 als auch für hMSH2.

3.2.2 Expression in Magenkarzinomen

Auch bei allen 38 Magenkarzinomen konnte immunhistologisch eine nukleäre Expression sowohl von hMLH1 als auch von hMSH2 in den Tumorzellen nachgewiesen werden.

3.3 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

3.3.1 Häufigkeit genetischer Aberrationen in Magenkarzinomen

In der CGH-Analyse (Abb. 3) konnten DNA-Veränderungen bei allen 38 untersuchten Magenkarzinomen mit einer mittleren Anzahl von 7 Zugewinnen (range: 1-13) nachgewiesen werden (Abb. 4 und Tabelle 6), während Verluste sehr viel seltener auftraten (range: 0-2). Mit Ausnahme von Chromosom 16 waren alle Chromosomen, wenn auch mit deutlich unterschiedlicher Häufigkeit, betroffen. Am häufigsten konnten in der CGH-Analyse Zugewinne auf den kurzen Armen von Chromosom 11, 12, 15, 17 und 20 nachgewiesen werden (Tabelle 7). Ein relativ häufiger Verlust von genetischem Material konnte bei 18,4% bzw. bei 13,2% der Karzinomen im Bereich der kurzen Arme von Chromosom 4 und 13 lokalisiert werden. Insgesamt wurden Verluste nur in 14 Fällen auf 7 betroffenen Chromosomen beobachtet (Tabelle 7).

Bei 65,8% der untersuchten Magenkarzinomen (n=25) ließ sich eine umschriebene high-level-Amplifikation im Bereich des langen Armes von Chromosom 20 sowie immerhin noch bei 15,8% (n=6) im Bereich des langen Armes von Chromosom 17 nachweisen mit einer minimalen, gemeinsamen Region von 20q12-13 und 17q21 (Tabelle 7).

Tabelle 6 : DNA -Veränderungen bei 38 Magenkarzinomen in der CGH- Analyse

Fall	UICC	Laurén	Zugewinne	Verluste
1	pT2pN0G3	intestinal	3q21, 7p15, 8q, 10p12-15 , 11q13, 12q24-ter, 13q13-14, 15q23-25 , 17q24-ter, 20 , 21q21	4q12-28, 5q
2	pT3pN2G3	diffus	3p21, 5q34, 11q13, 11q23, 12q24-ter, 15q23, 17q21-ter, 20 , 21q22	
3	pT4pN1G3	diffus	10q22-26, 11q13, 11q23, 12q24-ter, 15q24-ter, 17q12-ter, 20q13-ter	
4	pT2pN0G2	intestinal	3q21, 11q13, 12q24.1-ter, 15q22-25, 17q12-ter, 20p12-ter, 20q11.2-13.2	
5	pT2pN0G3	diffus	2p22-24, 7, 9q31-ter, 12q24-ter, 12p13, 20q	14q23-24
6	pT3pN0G3	gemischt	2q37-ter, 3p21, 5q34-ter, 9q22-ter , 10q22-ter, 11q13, 11q23, 12q23-ter, 17q21 , 20p12-ter, 20q12-ter	
7	pT2pN1G3	diffus	11q13, 12q24-ter, 20q12-ter	
8	pT2pN1G3	diffus	2p22-24, 3q27-29, 7q32-ter, 11q23-ter, 15q23-25, 20p12, 20q12	
9	pT3pN2G3	diffus	12q24, 20q12-ter	4p15-q31, 18p11
10	pT3pN2G3	diffus	2q37, 5q35, 7q22, 11q13, 11q23-ter, 12q24-ter, 15q23-25, 17q24, 20q13-ter	13q21-31
11	pT1pN0G2	intestinal	8p21-23 , 9q21-ter, 10q22-ter, 17q12-ter, 18q11.2-12 , 20p11.2-ter, 20q11.2-13.3	13q21-22
12	pT2pN1G3	intestinal	2q37-ter, 5q31-32, 5q34-ter, 11q13, 12q13-14 , 15q23-ter, 17q12-ter, 20q12-ter	4q12-21
13	pT2pN2G2	intestinal	2q37-ter, 5q35-ter, 11q13, 11q23, 12q24-ter, 15q24-25, 17q12-ter, 17q21, 20q12-ter	6q22-24
14	pT2pN2G2	intestinal	3q21-23, 12q24-ter, 20q12-13.2	
15	pT2pN1G3	gemischt	2q37-ter, 7p13-15, 11q13, 11q23, 12q24.1, 20q11.2-ter	
16	pT2pN0G3	diffus	3p21, 11q13, 12q24.1-2, 15q24	
17	pT2pN1G2	intestinal	11q13, 12q24.1, 15q24, 17q12-ter, 20p12, 20q12-13.2	
18	pT3pN2G3	gemischt	11q13, 12q24-ter, 15q24, 17q12-24, 20q12-ter	
19	pT1pN0G2	intestinal	11q13, 12q24-ter, 15q24, 17q21, 20q12-13.2	
20	pT2pN1G2	intestinal	15q23-24, 17q12-21, 20q11.2-ter	4q26-32, 18q22
21	pT2pN1G3	intestinal	7p15, 11p15-ter, 11q13-23 , 12q24-ter, 17q12, 17q24-ter, 20p12-ter, 20q11.2-ter	
22	pT3pN0G4	diffus	2q37, 4p16, 7p15, 11q23, 20q13.1, 21q22	
23	pT2pN2G3	intestinal	5q34-ter, 12q24-ter, 15q23-24, 17q24, 20q12-ter	
24	pT1pN0G3	diffus	3p21, 7q35-ter, 11q13, 11q24-ter, 12q24-ter , 15q23-25, 17q12-ter, 20q12-ter	
25	pT3pN1G4	gemischt	2p23-25, 2q37-ter, 3p21, 11q13, 15q23-24, 17q21, 17q24-ter, 20q12-ter	5q15-21, 13q22-31
26	pT3pN2G3	intestinal	1q21 , 3p21, 5q31, 11q13, 12q24-ter, 17q21, 17q24-ter, 20q11.2-ter	4q27-28
27	pT3pN2G3	gemischt	4p16, 7q34-ter, 11q13, 15q23, 20q12-ter	
28	pT2pN1G3	intestinal	1q41-ter, 2q36-ter, 4p16, 5p14-15, 7q21, 7q32-ter, 11q24-ter, 12p12, 17q12-25, 20q12-13	
29	pT3pN1G3	diffus	5q35-ter, 11q13, 11q23-25, 12q24-ter, 15q23-25 , 17q11.2-21, 17q23-ter, 20q11.2-ter	4q26-27, 13q21-31
30	pT2pN2G3	diffus	2p24-25, 3p21, 7q36, 8p22-23, 11q23-25, 12q24.1-3 , 14q31-32, 15q23-25, 17q21, 17q24-ter, 20q12-ter	13q21-22
31	pT2pN2G2	intestinal	2p24-25, 11q23-25, 15q24-25, 17q21, 20q12-ter	
32	pT2pN1G3	diffus	11q13, 12q23-ter, 15q23-24, 17q11-21, 17q24, 20q12-ter	
33	pT2pN2G3	diffus	11q13, 11q23-24, 12q24-ter, 17q21, 17q23-ter, 20q12-13.2	
34	pT2pN0G3	diffus	20q12-13.2	
35	pT2pN0G2	intestinal	4q12-28, 7q22-ter, 11q23-ter, 12q24-ter, 14q31, 15q23, 20p12-ter, 20q11.2-ter	5q15, 6q12-22
36	pT3pN1G3	diffus	2q36-ter, 11q23-ter, 12q23-ter, 15q23 , 17q24-ter, 20q13-ter, 21q22	4q22-26
37	pT2pN2G3	diffus	11q13, 12q24-ter, 15q23-25, 17q12-21, 17q25-ter, 20q13-ter	
38	pT2pN2G4	gemischt	2q37-ter, 12q24-ter, 15q23-24, 17q22, 17q24-ter, 20q12-ter	

(fett gedruckt: high-level-Amplifikationen)

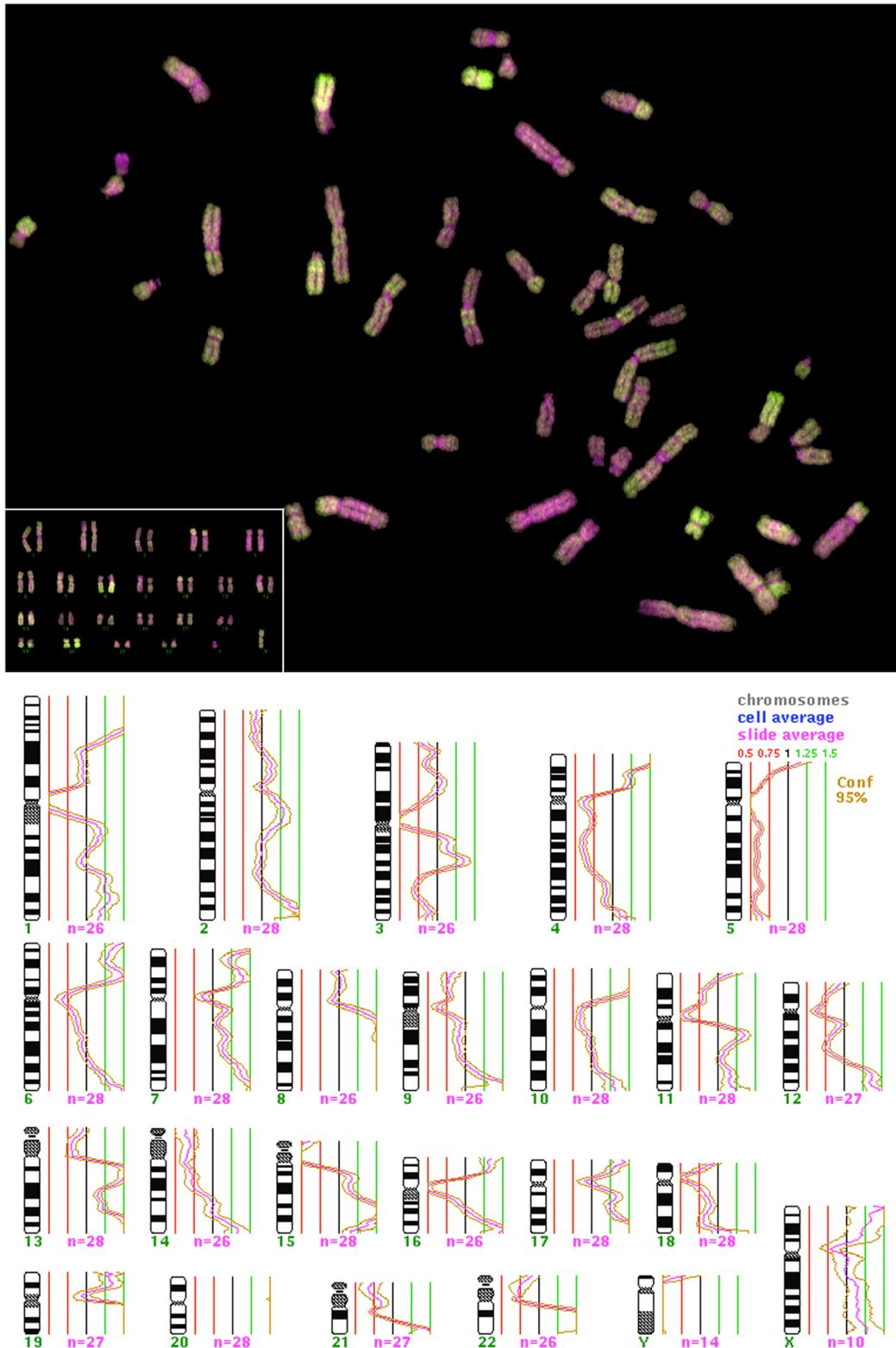


Abb. 3: Hybridisierte Metaphase mit FITC-markierter Tumor-DNA und TRITC-markierter Referenz-DNA eines Magenkarzinoms vom intestinalen Typ (Fall 1) sowie darunter das entsprechende Profil der Fluoreszenzratio mit high-level Amplifikation des gesamten Chromosoms 20.

Tabelle 7: Die häufigsten in der CGH-Analyse entdeckten Zugewinne und high-level Amplifikationen sowie sämtliche Verluste bei 38 Magenkarzinomen

Zugewinne		High-level Amplifikationen		Verluste	
Lokalisation ¹	n (%)	Lokalisation ¹	n (%)	Lokalisation	n (%)
20q12-13	37 (97)	20q12-13	25 (66)	4q	7 (18)
12q24	28 (74)	17q21	6 (16)	13q	5 (13)
17q21-25	27 (71)	12q24	5 (13)	5q	3 (8)
15q23-25	25 (66)	15q23-25	3 (8)	6q	2 (5)
11q13	23 (61)			18p	1 (3)
11q23-25	17 (45)			18q	1 (3)
2q37	10 (26)			4p	1 (3)
3p21	7 (18)				
5q34-35	7 (18)				
7q34-36	7 (18)				

¹ minimale gemeinsame Region

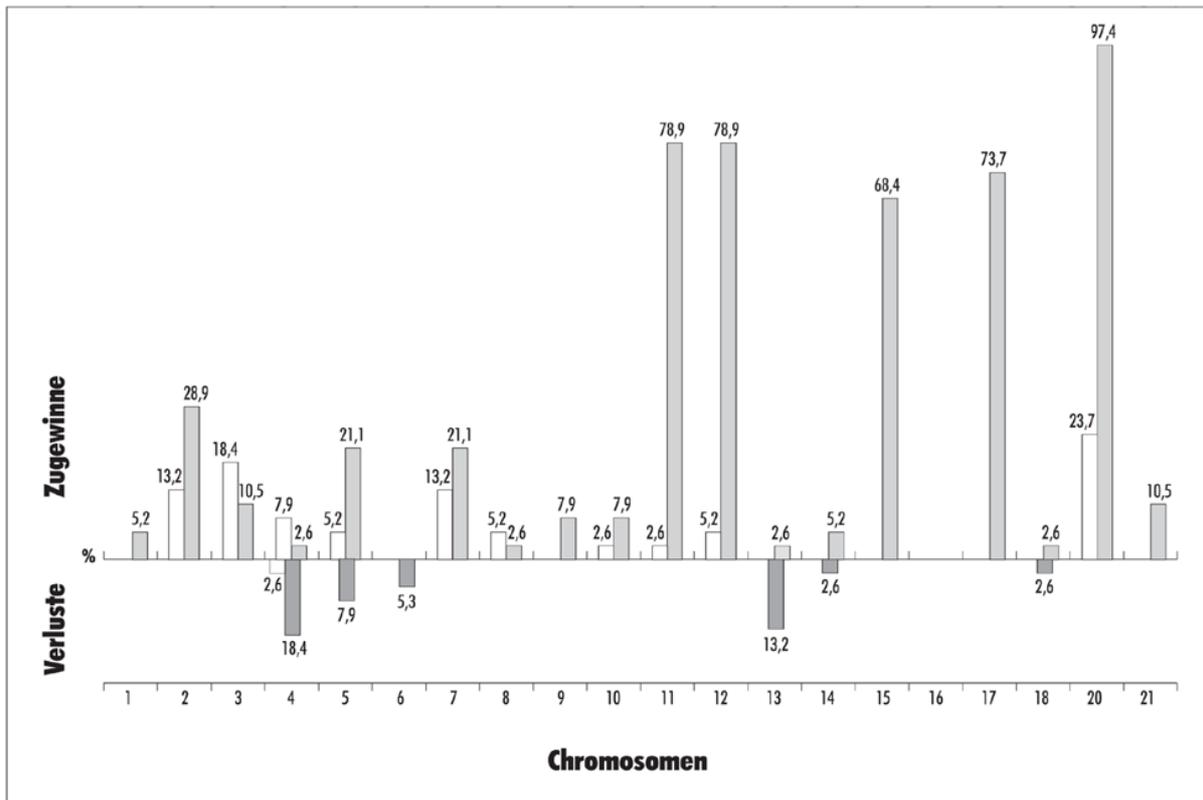


Abb. 4: Häufigkeit der DNA-Veränderungen in der CGH-Analyse. Helle Balken entsprechen Veränderungen auf den kurzen und dunkle Balken auf den langen Chromosomenarmen.

3.3.2 Korrelation mit histopathologischen Parametern

Hinsichtlich der Tumorphistologie nach der Laurén-Klassifikation ließen sich nur geringe Unterschiede bezüglich der Häufigkeit und des Charakters der chromosomalen Veränderungen feststellen, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichten (Abbildungen 5 und 6). So fand sich bei Tumoren des intestinalen Typs eine durchschnittliche Anzahl von 7 DNA-Veränderungen bei einer Spannweite von 1-12, beim diffusen Typ eine mittlere Anzahl von 8 DNA-Veränderungen mit einer Spannweite von 3-13. Im Bereich des langen Arms von Chromosom 17 konnte mit einer gemeinsamen, minimalen Region von 17q21-25 ein Zugewinn in diesem Bereich bei intestinalen Karzinomen häufiger als bei diffusen Karzinomen (86,7% versus 58,8) nachgewiesen werden (Tabelle 8). Jedoch auch dieser Unterschied erreichte keine statistische Signifikanz. Auch im Bezug auf die Prognosefaktoren Invasionstiefe (pT) und Lymphknotenbefall (pN) konnten keine signifikanten Unterschiede, die Häufigkeit und das Verteilungsmuster der DNA-Veränderungen betreffend, nachgewiesen werden (Tabelle 8). Verglichen mit den fortgeschrittenen Tumoren der Stadien pT3 und pT4, fanden sich schon in Magenfrühkarzinomen beziehungsweise in wenig fortgeschrittenen Tumoren (pT1/pT2) DNA-Veränderungen in ähnlicher Häufigkeit und Verteilung. Ähnliches ließ sich auch für den Lymphknotenstatus beobachten. Auch hier fehlten signifikante Unterschiede zwischen nodal negativen Tumoren (pN0) und solchen mit Lymphknotenmetastasen (pN1/pN2), sowohl was die Zugewinne als auch was die Verluste von chromosomalem Material anging.

Tabelle 8: Korrelation der häufigsten DNA-Veränderungen mit histopathologischen Parametern

Genort		Invasionstiefe		Lymphknotenbefall		Laurén	
		pT1/T2 (n=26) n (%)	pT3/T4 (n=12) n (%)	pN0 (n=11) n (%)	pN1/N2 (n=27) n (%)	intestinal (n=15) n (%)	diffus (n=17) n (%)
Verlust	4q	3 (12)	4 (33)	1 (9)	6 (22)	4 (27)	3 (18)
	13q	2 (8)	3 (25)	1 (9)	4 (15)	1 (7)	3 (18)
	5q	2 (8)	1 (8)	2 (18)	1 (4)	2 (13)	0 (0)
Zugewinne	20q12-13	25 (96)	12 (100)	10 (91)	27 (100)	15 (100)	16 (94)
	12q24	19 (73)	9 (75)	8 (73)	20 (74)	10 (67)	14 (82)
	17q21-25	18 (69)	9 (75)	6 (55)	21 (78)	13 (87)	10 (59)
	15q23-25	17 (65)	8 (66)	6 (55)	19 (70)	10 (67)	11 (65)
	11q13	14 (54)	9 (75)	6 (55)	17 (63)	8 (53)	10 (59)
	11q23-25	10 (39)	7 (58)	4 (36)	13 (48)	5 (33)	10 (59)
	2q37	5 (19)	5 (42)	2 (18)	8 (30)	3 (20)	3 (18)
	3p21	3 (12)	4 (33)	3 (27)	4 (15)	1 (7)	4 (24)
	5q34-35	3 (12)	4 (33)	1 (9)	6 (22)	3 (20)	3 (18)
	7q34-36	6 (23)	1 (8)	3 (27)	4 (15)	2 (13)	4 (24)

Intestinaler Typ (n = 15)

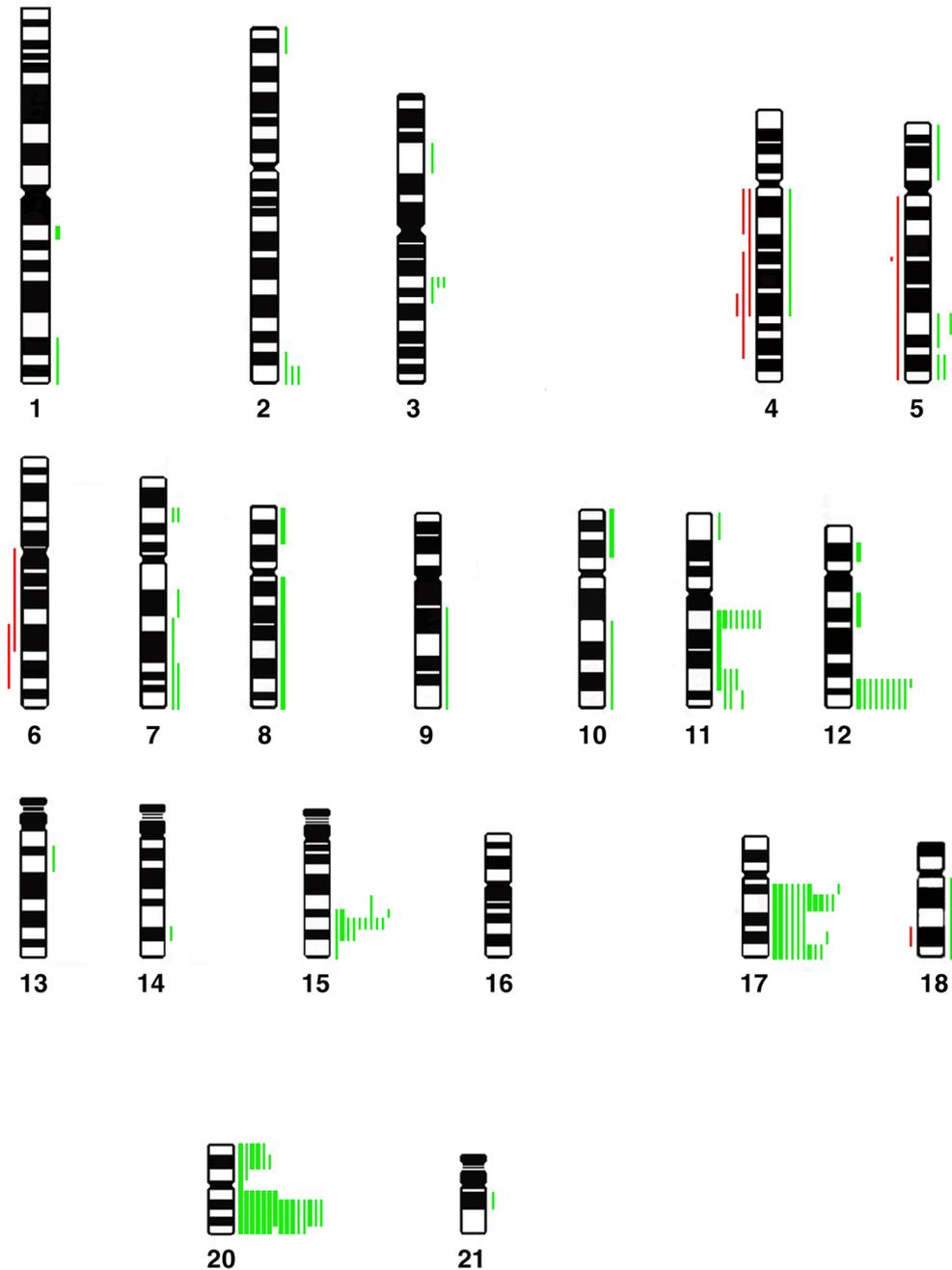


Abb. 5: Verteilung der Zugewinne (rechts) und Verluste (links) der Tumor DNA bei Magenkarzinomen von intestinalen Typ (n=15). Breite Balken entsprechen high-level Amplifikationen.

Diffus (n = 17)

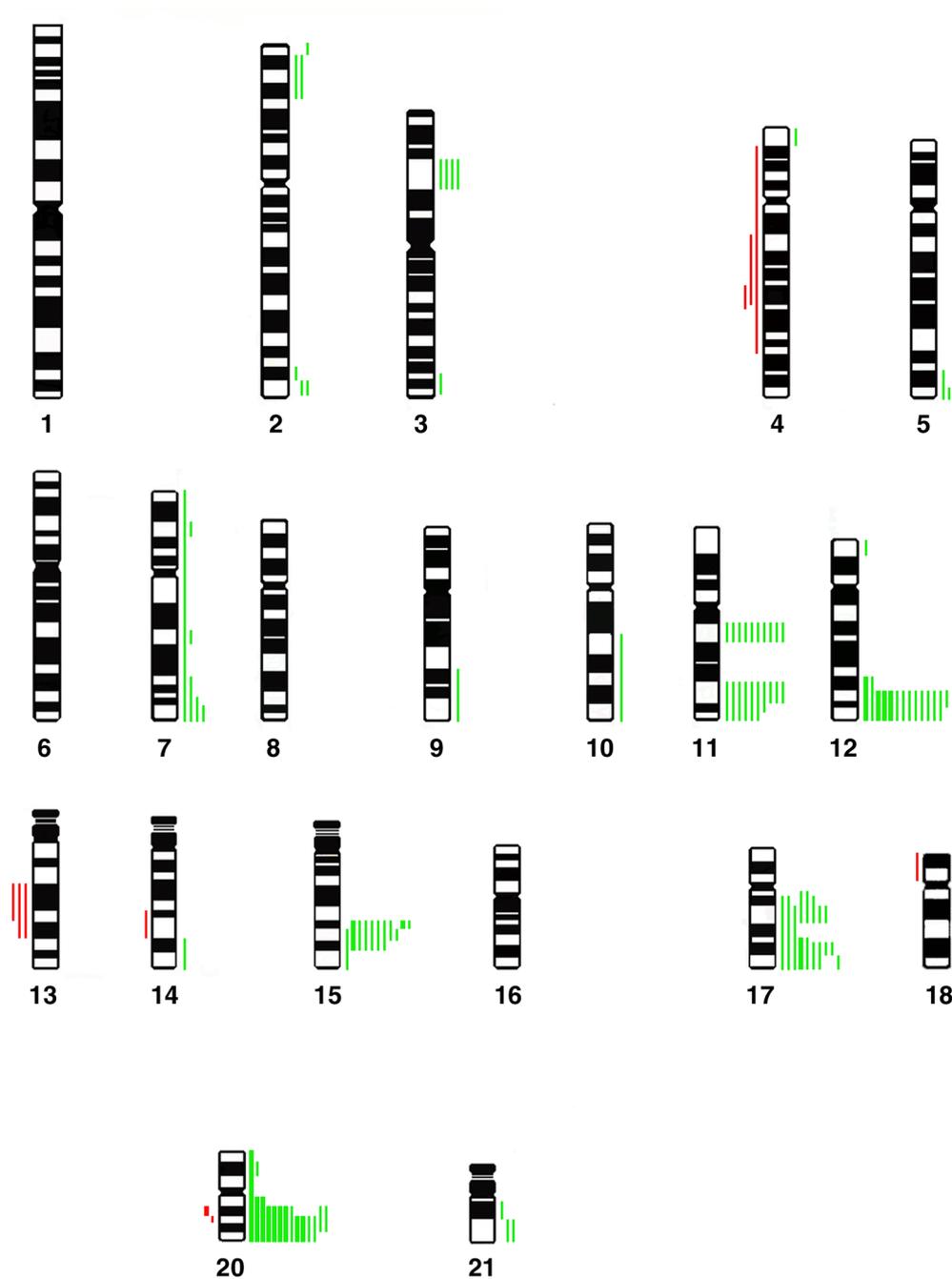


Abb. 6: Verteilung der Zugewinne (rechts) und Verluste (links) der Tumor-DNA bei Magenkarzinomen von diffusen Typ (n=17). Breite Balken entsprechen high-level-Amplifikationen.

4 Diskussion

4.1 Komparative genomische Hybridisierung

Die CGH-Analyse als zytogenetische Methode, die den Einblick in genetische Veränderungen eines Tumors ermöglicht, hat sich in letzter Zeit beim Nachweis genetischer Aberrationen bei verschiedenen Tumoren bewährt. Dazu gehören unter anderen das Mammakarzinom (Isola et al., 1995), das kleinzellige Bronchialkarzinom (Levin et al., 1995), sowie auch das Prostatakarzinom (Visakorpi et al., 1995), das Nierenkarzinom (Moch et al., 1996; Jiang et al., 1998) und das Harnblasenkarzinom (Richter et al., 1997; Simon et al., 1998). Zum Teil ließen sich bestimmte genetische Alterationen mit pathohistologischen Parametern wie der Tumorprogression oder der Prognose korrelieren.

Auch im Bezug auf das Magenkarzinom liegen Untersuchungen an verschiedenen Patientenkollektiven vor. So untersuchte die Gruppe um Koizumi (Koizumi et al., 1997) ausschließlich japanische Patienten, während sich die Gruppe um Kokkola (Kokkola et al., 1997) auf europäisches Patientengut konzentrierte, wie es auch in der vorliegenden Studie der Fall war.

Bei allen 38 hier untersuchten Magenkarzinomen konnten chromosomale Aberrationen beobachtet werden, wobei hauptsächlich DNA-Zugewinne (alle 38 Fälle) und nur relativ selten DNA-Verluste (14 Fälle) auftraten. Diese Feststellung ist im wesentlichen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Koizumi und Kokkola.

Tabelle 9: CGH-Analysen beim Magenkarzinom

Literatur	(n)	Zugewinne	Verluste	Progression	Histologie
Kokkola et al., 1997	35	20q, 17q, 8q	4q, 18q	-	- ¹⁾
vorliegende Untersuchung	38	20q, 17q, 12q, 15q, 11q	4q, 13q	-	- ¹⁾
Koizumi et al., 1997	33	2p, 3q, 7p, 13q,	1p, 6p, 17p, 19q, Yp, Yq	+	+ ²⁾

+: Korrelation, -: keine Korrelation

¹⁾ Lauren-Klassifikation

²⁾ differenziert versus undifferenziert

Bei den Zugewinnen konnte eine häufige Beteiligung der Chromosomen 11, 12, 15, 17 und 20 (in 45%-97% der Fälle) nachgewiesen werden, wohingegen DNA-Verluste besonders die Chromosomen 4 und 13 betrafen. Insgesamt konnte keine Korrelation der Aberrationen mit der Invasionstiefe (pT-Kategorie), dem Lymphknotenbefall (pN-Kategorie) oder anderen histopathologischen Parametern wie dem Differenzierungsgrad oder dem histologischen Typ entsprechend der Lauren-Klassifikation gefunden werden.

Zu vergleichbaren Ergebnissen ist man auch in der finnischen Arbeitsgruppe um Kokkola gekommen, die ebenfalls häufige Zugewinne auf den Chromosomen 17 und 20 und DNA-Verluste auf Chromosom 4 aufzeigen konnte. Eine Korrelation mit der Tumorprogression ließ sich aber auch dort nicht nachweisen. Dies deutet daraufhin, daß eine genetische Instabilität sich nicht erst in späten Phasen der Karzinogenese, sondern schon in frühen Tumorstadien durch DNA-Zugewinne oder Verluste auf den entsprechenden Chromosomen manifestiert. Allerdings konnten Zugewinne nur bei Tumoren vom intestinalen Typ nachgewiesen werden, während sie in der jetzigen Studie mit 58,8% auch bei diffusen Magenkarzinom auftraten

Im Gegensatz dazu beschreibt die japanische Arbeitsgruppe (Koizumi et al., 1997), DNA-Zugewinne hauptsächlich für die Chromosomen 2, 3, 7 und 13 und Verluste häufig für die Chromosomen 1, 6, 19 und Y. Die in der vorliegenden Untersuchung und auch bei Kokkola so wichtig erscheinenden Chromosomen 17 und 20 spielten, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle. Falls sich diese Ergebnisse in Zukunft bestätigen, könnte dies auf eine unterschiedliche Karzinogenese in Populationen mit relativ geringem Risiko wie Europa und Hochrisiko-Populationen wie Japan hinweisen. Auch die von Koizumi gefundenen Hinweise auf einen möglichen Einfluß dieser genetischen Aberrationen auf die Tumorprogression oder Prognose sind ein Aspekt, der erst durch weitere Untersuchungen bestätigt werden muß, da die Ergebnisse der japanischen Arbeitsgruppe bisher noch nicht ausreichend statistisch belegt sind.

Tabelle 10. Häufigkeit von Zugewinnen und high-level-Amplifikationen betroffene chromosomale Abschnitte bei 38 Magenkarzinomen

Lokalisation	bislang bekannte Gene
20q	AIB, E2F-1, MMP-9, PTPN1
17q	erbB-2, Gastrin, BRCA-1, nm23
15q	FGF-7
12q	CDK-2, CDK-4, MDM-2, IGF-1, erbB3
11q	Cyclin D1, int-2, hst-2, MMPs, Pepsinogen, VEGF-B
7q	CDK-5, HGF, c-met
5q	Cyclin G1, Cyclin B1, cdc25c, c-fms, FGF-1, FGF-R4, MSH-3
3q	cdc25a, VHL, FHIT, MLH-1, RAF-1, TGF β -RII, WNT

AIB1: amplified in breast cancer; FGF: fibroblast growth factor; FHIT: fragile histidine triad; HGF: hepatocyte growth factor; MMP: matrix metalloproteinase; TGF: transforming growth factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; VHL: von-Hippel-Landau

Wenn man die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit der Lokalisation bislang bekannter Onkogene und Tumorsuppressorgene vergleicht, so fällt auf, daß die Regionen 20q und 17q die Sitze wichtiger Genabschnitte sein könnten, die nicht nur beim Magenkarzinom überexprimiert werden. Es finden sich hier kodierende Gene für Zellzyklusproteine, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sowie Proteasen, die für die Tumorprogression und Prognose von Bedeutung sein können. Diese Abschnitte, die in der vorliegenden Studie am häufigsten Zugewinne und high-level-Amplifikationen aufwiesen, sind auch in anderen Untersuchungen aufgefallen. So stimmen die Ergebnisse mit denen von Kokkola (1997), Nessling (1998) und Vidgren (1999) überein, die hier ebenfalls hochfrequente genetische Veränderungen beobachteten.

Im Bereich von 17q21-25 und in der nahen Umgebung liegen verschiedenen Gene, unter denen einige für die Zellregulation wichtig sind und andere für Wachstumsfaktoren kodieren. Dazu gehören unter anderem erbB-2, welches für ein Membran-Rezeptorprotein, stark homolog zum „epidermal growth factor“, kodiert und auch beim Magenkarzinom bei einem Teil der Fälle überexprimiert ist (Park et al., 1989; Tsugawa et al., 1993; Tahara et al., 1995). Auch BRCA1, nm23 und das

Gastrin-Gen (verantwortlich für die Wachstumsregulation (Watson et al., 1989)) sind möglicherweise für die Karzinogenese und Tumorprogression des Magenkarzinoms von großer Bedeutung. Hier lokalisierte Amplifikationen konnten unter anderen auch beim Lungenkarzinom (Petersen et al., 1997; Balsara et al., 1997) und beim Mammakarzinom beschrieben werden (Ried et al., 1995; Isola et al., 1995; Kallioniemi et al., 1994).

Auch im Bereich um 20q12-13 liegen unter anderen das PTPN-Gen, welches bei einer Mammakarzinomstudie in 70% der Fälle überexprimiert wurde (Wiener et al., 1994) und das AIB1-Gen. Auch hier konnte schon beim Mammakarzinom (Kallioniemi et al., 1994) und beim Kolonkarzinom (Ried et al., 1996) gehäuft genetische Aberrationen festgestellt werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurden auch für die Chromosomen 11, 12 und 15 häufig chromosomale Veränderungen beobachtet, die bisher noch von keiner der anderen Arbeitsgruppen beim Magenkarzinom berichtet wurden. Allerdings sind diese Loci im Zusammenhang mit dem Mammakarzinom bekannt (Moore et al., 1999) und schließen verschiedene Onkogene (mdm2, int-2, erbB3, hst-1) und Zellzyklusassoziierte Gene (Cyclin D1, cdk2) sowie Wachstumsfaktoren ein.

Diese Beobachtungen legen nahe, daß auch hier bislang noch unbekanntes, sowohl für die Tumorgenese des Magenkarzinoms als auch anderer Tumoren, wichtige Gene lokalisiert sein können.

In der vorliegenden Untersuchung wurden 30 Magenkarzinome auf das Vorliegen von MSI untersucht. Dazu wurden bis zu 10 Loci analysiert. Entsprechend der Einteilung für MSI beim kolorektalen Karzinom (Thibodeau et al., 1993, Peltomäki et al., 1993; Aaltonen et al., 1993) wurde hier ein Tumor als „mutator-phenotype“-Karzinom klassifiziert, wenn eine MSI an mindestens zwei Loci auftrat. Auf der Grundlage dieser Definition konnten 5 Karzinome (17%) als Tumoren vom „mutator phenotype“ identifiziert werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Untersuchungen zur MSI beim Magenkarzinom (Strickler et al., 1994; Mironov et al., 1994; Keller et al., 1995; Wirtz et al., 1998).

Hinsichtlich des Musters chromosomaler Aberrationen ließen sich in der CGH-Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumoren vom Mutator-Phänotyp und MSI-negativen Magenkarzinomen nachweisen. Allerdings muß hier auf die geringe Anzahl MSI-positiver Tumoren (n=5) in der vorliegenden Untersuchung hingewiesen werden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse aus der CGH-Analyse läßt sich abschließend sagen, daß sich zwischen der Niedrigrisikopopulation in Europa und der Hochrisikopopulation in Japan unterschiedliche chromosomale Aberrationsmuster aufzeigen lassen. Diese, sofern sie sich in weiteren Studien mit einer größeren Anzahl von Magenkarzinom-Patienten der Hochrisikopopulation (z.B. in Japan) verifizieren lassen, könnten als weiterer Hinweis auf die schon länger vermutete unterschiedliche Karzinogenese des Magenkarzinoms und das unterschiedliche Risiko in verschiedenen Bevölkerungsgruppen gewertet werden.

In der vorliegenden Untersuchung läßt sich aber eine Korrelation bestimmter chromosomaler Aberrationen weder mit der Tumorprogression noch mit anderen histopathologischen Parametern aufzeigen.

Ob die hier für das Magenkarzinom gehäuft nachgewiesenen Veränderungen tatsächlich Genorte betreffen, die bei der Karzinogenese des Magenkarzinoms eine Rolle spielen, läßt sich allein aus der CGH-Analyse nicht schlußfolgern, sondern bedarf noch einer genaueren Charakterisierung durch weiterführende Untersuchungen.

4.2 FHIT-Gen und PTEN-Gen

In der vorliegenden Arbeit ließ sich bei 30 untersuchten Magenkarzinomen ein LOH im Bereich des FHIT-Gens bei 10% (n=3) nachweisen. Allerdings konnten Veränderungen im Bereich des FHIT-Gens auch schon bei Kolonkarzinomen (Ohta et al., 1996), bei Bronchialkarzinomen (Sozzi et al., 1996; Marchetti et al., 1998; Sozzi et al., 1997), Mamma-, Ovarial- und Zervixkarzinomen festgestellt werden (Man et al., 1996; Panagopoulos et al., 1996; Hendricks et al., 1997; Greenspan et al., 1997). Diese Ergebnisse könnten auf eine Bedeutung des FHIT-Gens für die Entstehung humaner, maligner Tumoren hinweisen, ähnlich dem p53-Gen, zumal auch für das FHIT-Gen eine Aktivität als Tumorsuppressorgen festgestellt werden konnte (Siprashvili et al., 1997). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Tamura (Tamura et al., 1997) und Noguchi (1999), die ein LOH des FHIT-Gens in 13% bzw. in 16% der informativen Magenkarzinome nachweisen konnten, ist die LOH-Häufigkeit der vorliegenden Untersuchung. Ebenso entsprechen sie den Ergebnissen

von Thiagalingam und Mitarbeitern (1996), die Allelverluste bei 22% der untersuchten kolorektalen Karzinome nachweisen konnten. In der Studie von Ohta und Mitarbeiter (1996) konnte sogar bei 50% der untersuchten Magenkarzinome aberrante Transkripte des FHIT-Gens gezeigt werden. Allerdings bezog die Studie lediglich 9 Magentumoren ein. Ein Allelverlust von 42% im Bereich des FHIT-Gens konnten Gemma und seine Mitarbeiter bei 38 untersuchten Magenkarzinomen aufzeigen, wobei es sich bei den meisten (n=35) jedoch schon um ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit Lymphknotenmetastasen oder sogar Fernmetastasen handelte. Allerdings fehlen Informationen der Autoren dieser Arbeit bezüglich der Häufigkeit des Auftretens einer MSI im Bereich der untersuchten Marker, die eine Auswertung des Allelverlustes einschränkt bzw. nicht mehr ermöglicht. Ebenso beschrieben Kastury und Mitarbeiter (1996) in 46% der untersuchten Magenkarzinome ein LOH des FHIT-Gens, jedoch wurden auch hier nur 37 Tumoren in die Untersuchung mit eingeschlossen. Auch sind die fehlenden Angaben zu den meisten dieser Tumoren bezüglich des Tumorstadiums sowie die Herkunft der Proben aus unterschiedlichen Institutionen auffällig, so daß ein Vergleich der unterschiedlichen Ergebnisse durch die als nicht sicher gewährleistet anzusehende Homogenität nur bedingt möglich ist. Noch heute ist die genaue Funktion des FHIT-Gens ungeklärt, so daß nach wie vor die Frage, ob das FHIT-Gen selbst oder aber möglicherweise auch ein anderes benachbartes Gen die Tumorgenese beeinflussen, nicht beantwortet ist. Auch weitere Aussagen zu möglichen Mutationen im verbleibenden Allel oder posttranskriptionelle Genveränderungen lassen sich nicht allein über den Nachweis eines Allelverlustes des FHIT-Gens erklären. Allerdings konnten Tamura und Mitarbeiter (1997) zeigen, daß bei keinem der 23 von ihnen untersuchten Magenkarzinome abnorme FHIT-Transkripte vorlagen.

Aufgrund der geringen Anzahl LOH-positiver Tumoren in der vorliegenden Untersuchung lassen sich Unterschiede hinsichtlich des histopathologischen Profils zwischen den beiden Gruppen von LOH-positiven und LOH-negativen Tumoren nicht beurteilen. Gemäß den vorliegenden Ergebnissen stellt ein Allelverlust im Bereich des FHIT-Gens jedoch ein relativ seltenes Ereignis in der Tumorgenese des Magenkarzinoms dar, wobei diese genetische Auffälligkeit im wesentlichen nur bei einer kleinen Gruppe von Magenkarzinomen von Bedeutung zu sein scheint.

Neben dem FHIT-Gen wurde in dieser Untersuchung auch das PTEN-Gen auf seine mögliche Bedeutung für die Tumorgenese des Magenkarzinoms untersucht. Auch bei diesem Gen, das auf dem langen Arm von Chromosom 10 (10q23) liegt, wird vermutet, daß es aufgrund seiner Struktur zu den Tumorsuppressorgenen gehört und Tumorinvasion und Metastasierung beeinflusst.

In der vorliegenden Untersuchung fanden sich Allelverluste des PTEN-Gens lediglich in 2 Fällen (7%). In anderen Studien wurde eine sehr viel höhere Anzahl an Allelverlusten berichtet. So betrug sie bei Kang und seinen Mitarbeitern 73% der Magenkarzinome (Kang et al., 2002). Auch die Arbeitsgruppe um Fei berichtet über eine reduzierte PTEN-Expression in 81% der Fälle (Fei et al., 2002). Es liegen jedoch auch Untersuchungen vor, bei denen für das PTEN-Gen keine wesentlichen Veränderungen festgestellt werden konnten (Sato et al., 2001; Chang et al., 1999).

Hinsichtlich anderer maligner Tumoren konnten Allelverluste des PTEN-Gens bei Glioblastomen in 31%, bei Mammakarzinomen in 6% und bei Prostatakarzinomen in 100% der Fälle beobachtet werden, wobei es sich bei letzteren jedoch um eine nur sehr geringe Fallzahl handelte (Li et al., 1997). Allerdings traten diese Allelverluste zum Teil erst zu einem späteren Zeitpunkt der Tumorgenese auf.

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, daß allelischen Imbalancen des PTEN-Gens beim Magenkarzinom nur eine untergeordnete Rolle im Rahmen der Tumorentstehung zuzukommen scheint.

5 Zusammenfassung

Obwohl das Magenkarzinom weltweit auch heute noch den zweithäufigsten malignen epithelialen Tumor darstellt, ist seine molekulare Karzinogenese bislang zumindest teilweise noch unklar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung des Musters chromosomaler Alterationen bei 38 Magenkarzinomen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) sowie der Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI).

Darüber hinaus wurde der immunhistochemischen Nachweis der Proteinexpression der MMR-Gene hMLH1 und hMSH2 durchgeführt.

Bei sämtlichen untersuchten Magenkarzinomen waren DNA-Veränderungen nachweisbar, die im wesentlichen Zugewinnen entsprachen, während Verluste sehr viel seltener zu beobachten waren. Insbesondere die Chromosomen 20,17,12,15 und 11 wiesen in 45-97% der Tumoren Zugewinne auf. Eine Korrelation der Zugewinne und der Verluste konnte jedoch weder mit der Laurén-Klassifikation noch mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren nachgewiesen werden.

Auch zwischen Tumoren mit MSI und solchen ohne fand sich kein signifikanter Unterschied im Muster der DNA-Veränderungen in der CGH-Analyse.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit einer europäischen Studie aus Finnland, während zur Hochrisikopopulation Japans deutliche Unterschiede im chromosomalen Aberrationsmuster bestehen, die möglicherweise auf Unterschiede in der Karzinogenese des Magenkarzinoms hindeuten.

Im Bereich des FHIT- und des PTEN-Gens, für die bei verschiedenen malignen Tumoren eine Rolle im Sinne von Tumorsuppressorgenen diskutiert wird, konnten Allelverluste lediglich bei 10% bzw. bei 7% der untersuchten Magenkarzinome nachgewiesen werden. So scheinen nach den vorliegenden Ergebnissen Allelverluste dieser Gene für die Karzinogenese des Magenkarzinoms, wenn überhaupt, dann nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Untersuchung keine Korrelation des chromosomalen Aberrationsmusters der CGH-Analyse mit der Tumorprogression nachgewiesen werden. Allerdings weisen die betroffenen Chromosomenabschnitte auf eine Reihe möglicher neuer Kandidatengene hin, die für die Tumorbiologie eine entscheidende Rolle spielen könnten und einer weiteren Charakterisierung bedürfen.

6 Literaturverzeichnis

Aaltonen L.A., Peltomäki P., Leach F.S., Sistonen P., Pylkkanen L., Mecklin J.-P., Jarvinen H., Powell S.M., Jen J., Hamilton S.R., Petersen G.M., Kinzler K.W., Vogelstein B., de laChapelle A. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 260: 812-816.

Ahmadian M., Wistuba I.I., Fong K.M., Behrens C., Kodagoda D.R., Saboorian M.H., Shay J., Tomlinson G.E., Blum J., Minna J.D., Gazdar A.F. (1997). Analysis of the FHIT gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands. *Cancer Res.*, 57: 3664-3668.

Balsara B.R., Sonoda G., du Manoir S., Siegfried J.M., Gabrielson E., Testa J.R. (1997). Comparative genomic hybridization analysis detects frequent, often high-level overrepresentation of DNA sequences at 3q, 5p, 7p, and 8q in human non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.*, 57:2116-2120.

Barnes L.D., Garrison P.N., Siprashvili Z., Guranowski A., Robinson A.K., Ingram S.W., Croce C.M., Ohta M., Huebner K. (1996). FHIT, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5'-5''-P¹,P³-triphosphate hydrolase. *Biochemistry*, 35: 11529-11535.

Becker N., Wahrendorf J. (1998). *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Birck A., Ahrenkiel V., Zeuthen J., Hou-Jensen K., Guldberg P. (2000). Mutation and allelic loss of the PTEN/MMAC1 gene in primary metastatic melanoma biopsies. *J. Invest. Dermatol.*, 114: 277-280.

Bockmühl U., Petersen S., Schmidt S., Wolf G., Jahnke V., Dietel M., Petersen I. (1997). Pattern of chromosomal alterations in metastasizing and nonmetastasizing primary head and neck carcinomas. *Cancer Res.*, 57: 5213-5216.

Brentnall T.A., Chen R., Lee J.G., Kimmey M.B., Bronner M.P., Haggitt R.C., Kowdley K.V., Hecker L.M., Byrd D.R. (1995). Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. *Cancer Res.*, 55: 4264-4267.

Bronner C.E., Baker S.M., Morrison P.T., Warren G., Smith L.G., Lescoe M.K., Kane M., Earabino C., Lipford J., Lindblom A.N., Tannergård P., Bollag R.J., Godwin A.R., Ward D.C., Nordenskjöld M., Fishel R., Kolodner R., Liskay R.M. (1993). Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH 1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 368: 258-261.

Bubb V.J., Curtis L.J., Cunningham C., Dunlop M.G., Carothers A.D., Morris R.G., White S., Bird C.C., Wyllie A.H. (1996). Microsatellite instability and the role of hMSH 2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene*, 12: 2641-2648.

- Cairns P., Okami K., Halachmi S., Halachmi N., Esteller M., Herman J.G., Jen J., Sidranski D. (1997). Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res.*, 57: 5356-5359.
- Carduff R., Johnston C.M., Svoboda-Newman S.M., Poy E.L., Merajver S.D., Frank T.S. (1996). Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 148: 1671-1678.
- Cawkwell I., Li D., Lewis F.A., Martin I., Dixon M.F., Quirke P. (1995). Microsatellite instability in colorectal cancer: improved assesment using fluorescent polymerase chain reaction. *Gastroenterology*, 109: 465-471.
- Chang J.G., Chen Y.J., Perng L.I., Wang N.M., Kao M.-C., Yang T.-Y., Chang C.-P., Tsai C.-H. (1999). Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in cancers of the digestive tract. *Eur. J. Cancer*, 35: 647-651.
- Chong J.M. Fukayama M., Hayashi Y., Takizawa T., Koike M., Konishi M., Kikuchi-Yanoshita R., Miyaki M. (1994). Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res.*, 54: 4595-4597.
- Cunningham J.M., Shan A., Wick M.J., McDonnell S.K., Schaid D.J., Tester D.J., Qian J., Takahashi S., Jenkins R.B., Bostwick D.G., Thibodeau S.N. (1996). Allelic imbalance and microsatellite instability in prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 56: 4475-4482.
- Ding S.F., Habib N.A. (1995). Loss of heterozygosity in liver tumors. *J. Hepatol.*, 22: 230-238.
- Druck T., Hadaczek P., Fu T.-B. Ohta M., Siprashvili Z., Baffa R., Negrini M., Kastury K., Veronese M.L., Rosen D., Rothstein J., McCue P., Cotticelli m.G., Inoue H., Croce C.M., Palazzo J., Huebner K. (1997). Structure and expression of the human FHIT gene in normal and tumor cells. *Cancer Res.*, 57: 504-512.
- du Manoir S., Kallioniemi O.-P., Lichter P., Piper J., Benedetti P.A., Carothers A.D., Fantes J.A., Garcia-Sagredo J.M., Gerdes T., Giolant M., Hemery B., Isola J., Maahr J., Morrison H., Perry P., Stark M., Sudar D., van Vliet I.J., Verwoerd N., Vrolijk J. (1995a). Hardware and Software requirements for quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 19: 4-9.
- du Manoir S., Schröck E., Bentz M., Speicher M.R., Joos S., Ried T., Lichter P., Cremer T. (1995b). Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19: 27-41.
- Fearon E.R., Vogelstein B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-767.
- Fei G., Ebert M.P., Mawrin C., Leodolter A., Schmidt N., Dietzmann K., Malfertheiner P. (2002). Reduced PTEN expression in gastric cancer and in the gastric mucosa of gastric cancer relatives. *Eur. J. Gastroenterol. Hepathol.*, 14: 297-303.

- Fishel R., Lescoe M.K., Rao M.R.S., Copeland N.G., Jenkins N.A., Garber J., Kane M., Kolodner R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 75: 1027-1038.
- Frank S., Müller J., Plaschke J., et al. (1997). The putative tumor suppressor gene FHIT at 3p14.2 is rarely affected by loss of heterozygosity in primary human brain tumours. *Cancer Res.*, 57: 2638-2641.
- Gabbert H.E., Meier S., Gerharz C.D., Hommel G. (1991). Incidence and prognostic significance of vascular invasion in 529 gastric cancer patients. *Int. J. Cancer*, 49: 203-207.
- Gemma A., Hagiwara K., Ke Y., Burke L.M., Khan M.A., Nagashima M., Bennett W.P., Harris C.C. (1997). FHIT mutations in human primary gastric cancer. *Cancer Res.*, 57: 1435-1437.
- Greenspan D.L., Connolly D.C., Wu R., Lei R.Y., Vogelstein J.T.C., Kim Y.-T., Mok J.E., Munoz N., Bosch F.X., Shah K., Cho K.R. (1997). Loss of FHIT expression in cervical carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res.*, 57: 4692-4698.
- Gronwald J., Störkel S., Holtgreve-Grez H., Hadaczek P., Brinckschmidt C., Jauch A., Lubinski J., Cremer T. (1997). Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinoma and metastatic sites: Importance of 1q and 3q copy number changes in metastatic events. *Cancer Res.*, 57: 481-487.
- Hahn S.A., Schutte M., Hoque A.T.M.S., Moskaluk C., da Costa L.T., Rozenblum F., Weinstein C.L., Fisher A., Yeo C.J., Hruban R.H., Kern S.E. (1996). DCP4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*, 271: 350-353.
- Hahn S.A., Kern S.E., Schmiegel W.-H. (1997). Neue molekularbiologische Erkenntnisse aus der Pankreasforschung. *Dt. Ärztebl.*, 94: A-3342-3350.
- Han H.J., Yanagisawa A., Kato Y., Park J.G., Nakamura Y. (1993). Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res.*, 53: 5087-5089.
- Hartwell L. (1992). Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, 71: 543-46.
- Hayashi S., Tanimoto K., Hajiro-Nakanishi K., Tsuchiya E., Kurosumi M., Higashi Y., Imai K., Suga K., Nakachi K. (1997). Abnormal FHIT transcripts in human breast carcinomas: a clinicopathological and epidemiological analysis of 61 japanes cases. *Cancer Res.*, 57:1881.1985.
- Hendricks D.T., Taylor R., Reed M., Birrer M.J. (1997). FHIT expression in human ovarian, endometrial, and cervical cancer cell lines. *Cancer Res.*, 57: 2112-2115.
- Herbst R.A., Weiss J., Ehnis A., Cavenee W.K., Arden K.C. (1994). Loss of heterozygosity for 10q22-qter in malignant melanoma progression. *Cancer Res.*, 54: 3111-3114.

- Hermanek P., Scheibe O., Beahrs O.H., Hutter R.V.P., Spiessl B., Sobin L.H., Wagner G. (1992): UICC - International Union Against Cancer, TNM-Klassifikation der malignen Tumoren. 4.Auflage Springer; Berlin; Heidelberg; New York.
- Huang H., Cheville J.C., Pan Y., Roche P.C., Schmidt L.J., Tindall D.J. (2001). PTEN induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression. *J. Biol. Chem.*, 276: 38830-38836.
- Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S., Shibata D., Perucho M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, 363: 558-561.
- Isola J., De Vries S., Chu L., Ghazvini S., Waldmann F. (1994). Analysis of changes in DNA-sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am. J. Pathol.*, 145: 1301-1308.
- Isola J.I., Kallioniemi O.-P., Chu L.W., Faqua S.A.W., Hilsenbeck S.G., Osborne C.K., Waldmann F.M. (1995). Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *Am. J. Pathol.*, 147: 905-911.
- Iwabuchi H., Sakamoto M., Sakunga H., Ma Y.-Y., Carcangiu M.L., Pinkel D., Yang-Feng T.L., Gray J.W. (1995). Genetic analysis of benign, low-grade and high-grade ovarian tumors. *Cancer Res.*, 55: 6172-6180.
- Jiang F., Richter J., Schraml., Bubendorf L., Gasser T., Sauter G., Mihatsch M.J., Moch H. (1998). Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma. Genetic differences between histological subtypes. *Am. J. Pathol.*, 153: 1467-1473.
- Kallioniemi A., Kallioniemi O.-P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J.W., Waldmann F., Pinkel D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258: 818-821.
- Kallioniemi A., Kallioniemi O.-P., Piper J., Tanner M., Stokke T., Chen L., Smith H.S., Pinkel D., Gray J.W., Waldmann F.M. (1994). Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 2156-2160.
- Kallioniemi O.-P., Kallioniemi A., Piper J., Isola J., Waldmann F.M., Gray J.W., Pinkel D. (1994). Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 10:231-243.
- Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Citro G., Devris S., Kerschmann R., Carroll P., Waldmann F. (1994). Identification of gains and losses of DNA sequence in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*; 12: 213-219.

- Kallioniemi A., Kallioniemi O.-P., Citro G., Sauter G., De Vries S., Kerschmann R., Caroll P., Waldman F. (1995). Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 12: 213-219.
- Kang Y.-H., Lee H.S., Kim W.H. (2002). Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab. Invest.*, 82: 285-291.
- Kastury K., Baffa R., Druck T., Ohta M., Cotticelli M.G., Inoue H., Negrini M., Rigge M., Huang D., Croce C.M., Palazzo J., Huebner K. (1996). Potential gastrointestinal tumor suppressor locus at the 3p14.2 FRA3B site identified by homozygous deletions in tumor cell lines. *Cancer Res.*, 56:978-983.
- Keller G., Rotter M.; Vogelsang H., Bischoff P., Becker K:F.; Mueller J., Brauch H., Siewert J.R., Höfler H. (1995). Microsatellite instability in adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract: relation to clinicopathological data and family history. *Am. J. Pathol.*, 147: 593-600.
- Knudson A.G. (1971). Mutation and cancer. Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68: 820-823.
- Knuutila S., Björkqvist A.-M., Autio K., Tarkkanen M., Wolf M., Monni O., Szymanska J., Larramendy M.L., Tapper J., Pere H., El-Rifai W., Hemmer S., Wasenius V.-M., Vidgren V., Zhu Y. (1998). DNA copy number amplifications in human neoplasmas. Review of comparative genomic hybridization studies. *Am. J. Pathol.*, 152: 1107-1123.
- Kohno T., Takahashi M., Manda R., Yokota J. (1998). Inactivation of the PTEN/MMAC1/TEP1 gene in human lung cancers. *Genes Chromosomes Cancer*, 22: 152-156.
- Koizumi Y., Tanaka S.I., Mou R., Koganei H., Kokawa A., Kitamura R., Yamauchi H., Ookubo K., Saito T., Tominaga S., Matsumura K., Shimada H., Tsuchida N., Sekihara H. (1997). Changes in DNA copy number in primary gastric carcinoma by comparative genomic hybridization. *Clin. Cancer Res.*, 3: 1067-1076.
- Kokkola A., Monni O, Puolakainen P., Larramendy M.L., Victorzon M., Nordling S., Haapiainen R., Kivilaakso E., Knuutila S. (1997). 17q12-21 amplicon, a novel recurrent genetic change in intestinal type of carcinoma: a comparative hybridization study. *Genes Chromosomes Cancer*, 20: 38-43.
- Kraus J.A., Glesmann N., Beck M., Krex D., Klockgether T., Schackert G., Schlegel U. (2000). Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.*, 48: 89-94.
- Larramendy M.L., Tarkkanen M., Blomqvist C., Virolainen M., Wiklund T., Askö-Seljavaara S., Elomaa I., Knuutila S (1997). Comparative genomic hybridization of malignant fibrous histiocytoma reveals a novel prognostic marker. *Am J. Pathol.*, 151: 1153-1161.

- Laurén P. (1965). The two histological main types of gastric carcinomas: diffuse and so-called intestinal-type carcinomas. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 64: 31-49.
- Leach F.S., Nicolaidis N.C., Papadopoulos N., Liu B., Jen J., Parsons R., Peltomäki P., Sistonen P., Aaltonen L.A., Nyström-Lahti M., Guan X.Y., Zhang J., Meltzer P.S., Yu J.W., Kao F.T., Chen D.J., Cerosaletti K.M., Fournier R.E.K., Todd S., Lewis T., Leach R.J., Naylor S.L., Weissenbach J., Mecklin J.P., Järvinen H., Petersen G.M., Hamilton S.R., Lynch H.T., Trent J.M., de la Chapelle A., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1993). Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 75: 1215-1225.
- Levin N.A., Brzoska P.M., Warnock M.L., Gray J.W., Christman M.F. (1995). Identification of novel regions of altered DNA copy number in small cell lung tumors. *Genes, Chromosomes, Cancer*, 13: 175-185.
- Li D.M., Sun H. (1997). TEP1, encoded by candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res.*, 57: 2124-2129.
- Li D.M., Sun H. (1998). PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 15406-15411.
- Li J., Yen C., Liaw D., Podsypanina K., Bose S., Wang S.I., Puc J., Miliareis C., Rodgers L., McCombie R., Binger S.H., Giovanella B.C., Iltmann M., Tycko B., Hibshoosh H., Wigler M.H., Parsons R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science*, 275: 1943-1947.
- Loeb L.A. (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.*, 51:3075-79.
- Lothe R.A., Peltomäki P., Meling G.I., Aaltonen L.A., Nyström-Lahti M., Pylkkänen L., Heimdal K., Andersen T.I., Møller P., Rognum T.O., Fossa S.D., Haldorsen T., Langmark F., Brøgger A., de la Chapelle A., Børresen A.L. (1993). Genomic instability in colorectal cancer: relation to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res.*, 53: 5849-5852.
- Lundsteen C., Maahr J., Christensen B., Bryndorf T., Bentz M., Lichter P., Gerdes T. (1995). Image analysis in comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19: 42-50
- Lynch H.T., Smyrk T. (1996). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch-Syndrome). *Cancer*, 78: 1149-1167
- Maesawa C., Tamura G., Suzuki Y., Ogasawara S., Sakata K., Kashiwaba M., Satodate R. (1995). The sequential accumulation of genetic alterations characteristic of the colorectal adenoma-carcinoma sequence does not occur between gastric adenoma and adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.*, 176: 249-258.

- Man S., Ellis I.O., Sibbering M., Blamey R.W., Brook J.D. (1996). High levels of allele loss at the FHIT and ATM genes in non-comedo ductal carcinoma in situ and grade I tubular invasive breast cancers. *Cancer Res.*, 56: 5484-5489.
- Mao L., Fan Y.-H., Lotan R., Hong W.K. (1996). Frequent abnormalities of FHIT, a candidate tumor suppressor gene, in head and neck cancer cell lines. *Cancer Res.*, 56: 5128-5131.
- Marchetti A., Pellegrini S., Bertacca G., Buttitta F., Gaeta P., Carnicelli V., Nardini V., Griseri P., Chella A., Angeletti C.A., Bevilacqua G. (1998). FHIT and p53 gene abnormalities in bronchioloalveolar carcinomas. Correlations with clinicopathological data and k-ras mutations. *J. Pathology*, 184: 240-246.
- Meltzer S.J., Yin J., Manin B., Rhyu M.G., Cottrell J., Hudson E., Redd J.L., Krasna M.J., Abraham J.M., Reid B.J. (1994). Microsatellite instability occurs frequently and in both diploid and aneuploid cell populations of Barrett's-associated esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 54: 3379-3382.
- Mironov N.M., Aguelon M.A.M., Potapova G.I., Omori Y., Gorbunov O.V., Klimenkov A.A., Yamasaki H. (1994). Alterations of (CA)_n DNA repeats and tumor suppressor genes in human gastric cancer. *Cancer Res.*, 54: 41-44.
- Moch H., Presti Jr.J.C., Sauter G., Buchholz N., Jordan P., Mihatsch M.J., Waldmann F.M. (1996). Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 56: 27-30.
- Modrich P. (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu. Rev. Genet.*, 25: 229-253.
- Moore E., Magee H., Coyne J., Gorey T., Dervan P.A. (1999). Widespread chromosomal abnormalities in high-grade ductal carcinoma in situ of the breast: comparative genomic hybridization study of pure high-grade DCIS. *J. Pathol.*, 187: 403-409.
- Myers M.P., Stolarov J.P., Eng C., Li J., Wang S.I., Wigler M.H., Parsons R., Tonks N.K. (1997). P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 9052-9057.
- Negrini M., Monaco C., Vorechovsky I., Ohta M., Druck T., Baffa R., Huebner K., Croce C.M. (1996). The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. *Cancer Res.*, 56: 3173-3179.
- Nessling M., Solinas-Toldo S., Wilgenbus K.K., Borchard F., Lichter P. (1998). Mapping of chromosomal imbalances in gastric adenocarcinoma revealed amplified protooncogenes MYCN, MET, WNT2 and erbB-2. *Genes Chromosomes Cancer*, 23: 307-316.
- Noguchi T., Müller W., Wirtz H.-C., Willers R., Gabbert H. E. (1999). FHIT-gene in gastric cancer: association with tumor progression and prognosis. *J. Pathol.*, 188: 378-381.

Ohta M., Inoue H., Cotticelli M.G., Kastury K., Baffa R., Palazzo J., Siprashvili Z., Mori M., McCue P., Druck T., Croce C.M., Huebner K. (1996). The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell*, 84: 587-597.

Oota K., Sobin L.H. (1990). Histological typing of gastric and oesophageal tumors. World Health Organization. International Histological Classification of Tumors, 18, WHO, Geneva.

Orr-Weaver T.L., Weinberg R.A. (1998). A checkpoint on the road to cancer. *Nature*, 192: 223-24.

Park J.-B., Rhim J.S., Park S.-C., Kimm S.W., Kraus M. (1989). Amplification, overexpression, and rearrangement of the erbB-2 protooncogene in primary human stomach carcinomas. *Cancer Res.*, 49: 6605-6609.

Panagopoulos I., Pandis N., Thelin S., Petersson C., Mertens F., Borg A., Kristoffersson U., Mitelman F., Aman P. (1996). The FHIT and PTPRG genes are deleted in benign proliferative breast disease associated with familial breast cancer and cytogenetic rearrangements of chromosome band 3p14. *Cancer Res.*, 56: 4871-4875.

Parsons R., Li G.M., Longley M.J., Fang W., Papadopoulos N., Jen J., de la Chapelle A., Kinzler K.W., Vogelstein B., Modrich P. (1993). Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER⁺ tumor cells. *Cell*, 75: 1227-1236.

Parsons R., Myeroff L.L., Liu B., Willson J.K.V., Markowitz S.D., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1995). Mikrosatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 55: 5548-5550.

Paulovich A.G., Hartwell L.H. (1997). When checkpoints fail. *Cell*, 88: 315-21
Paulson T.G., Wright F.A., Parker B.A., Russack V., Wahl G.M. (1996). Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res.*, 56: 4021-4026.

Pauson T.G., Wright F.A., Parker B.A., Russack V., Wahl G.M. (1996). Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res.*, 56: 4021-4026.

Peiffer S.L., Herzog T.J., Tribune D.J., Mutch D.G., Gersell D.J., Goodfellow P. (1995). Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. *Cancer Res.*, 55: 1922-1926.

Peltomäki P., Lothe R.A., Aaltonen L.A., Pylkkänen L., Nyström-Lahti M., Seruca R., David L., Holm R., Ryberg D., Haugen A., Brogger A., Borresen A.-L., de la Chapelle A. (1993). Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res.*, 53: 5853-5855.

- Percesepe A., Benatti P., Roncucci L., Sassatelli R., Fante R., Ganazzi D., Bellacosa A., Genuardi M., Neri G., Viel A., Ponz de Leon M. (1997). Survival analysis in families affected by hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int. J. Cancer*; 71: 373-376.
- Petersen I., Langreck H., Wolf G., Schwendel A., Psille R., Vogt P., Reichel M.B., Ried T., Dietel M. (1996). Small lung cell cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. *Br. J. Cancer*, 75: 79-86.
- Petersen I., Bujard M., Petersen S., Wolf G., Goeze A., Schwendel A., Langreck H., Gellert K., Reichel M., Just K., du Manoir S., Cremer T., Dietel M., Ried T. (1997). Patterns of Chromosomal Imbalances in Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Cancer Res.*, 57: 2331-2335.
- Piper J., Rutovitz D., Sudar D., Kallioniemi A., Kallioniemi O.-P., Waldmann F.M., Gray J.W., Pinkel D. (1995). Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 19: 10-26.
- Pisani P., Parkin D.M., Bray F., Ferlay J. (1999). Estimates of the worldwide mortality of 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer*, 83: 18-29.
- Rasheed B.K., Fuller G.N., Friedmann A.H., Bigner D.D., Bigner S.H. (1992). Loss of heterozygosity for 10q loci in human gliomas. *Gene Chromosomes Cancer*, 5: 75-82.
- Rhyu M.G., Park W.S., Meltzer S.J. (1994). Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene*, 9: 29-32.
- Ried T., Just K.E., Holtgreve-grez H., du Manoir S., Speicher M.R., Schröck E., Latham C., Blegen H., Zetterberg A., Cremer T., Auer G. (1995). Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res.*, 55: 5415-5423.
- Ried T., Knutzen R., Steinbeck R., Blegen H., Schrock E., Heselmeyer K., du Manoir S., Auer G. (1996). Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 15: 234-245.
- Richter J., Jiang F., Görög J.-P., Sartorius G., Egenter C., Gasser T.C., Moch H., Mihatsch M.J., Sauter G. (1997). Marked genetic difference between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.*, 57: 2860-2864.
- Sato K., Tamura G., Tsuchiya T., Endoh Y., Sakata K., Motoyama T., Usuba O., Kimura W., Terashima M., Nishizuka S., Zou T., Meltzer S.J. (2001). Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gastric cancer. *Virchows Arch.*, 440: 160-165.
- Simon R., Bürger H., Brinkschmidt C., Böcker W., Hertle L., Terpe H.-J. (1998). Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J. Pathol.*, 185: 345-351.

- Siprashvili Z., Sozzi G., Barnes L.D., McCue O., Robinson A.K., Erynomin V., Sard L., Tagliabue E., Greco A., Fusetti L., Schwartz G., Pierotti M.A., Croce C.M., Huebner K. (1997). Replacement of FHIT in cancer cells suppressed tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 13771-13776.
- Sozzi G., Veronese M.L., Negrini M., Baffa R., Cotticelli M.G., Inoue H., Tornielli S., Pilotti S., De Gregorio L., Pastorino U., Pierotti M.A., Ohta M., Huebner K., Croce C.M. (1996). The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell*, 85: 17-26.
- Sozzi G., Sard L., De Gregorio L., Marchetti A., Musso K., Buttitta F., Tornielli S., Pellegrini S., Veronese M.L., Manenti G., Incarbone M., Chella A., Angeletti C.A., Pastorino U., Huebner K., Bevilacqua G., Pilotti S., Croce C.M., Pierotti M.A. (1997). Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer. *Cancer Res.*, 57: 2121-2123.
- Steck P.A., Pershouse M.A., Jasser S.A., Yung W.K.A., Lin H., Ligon A.H., Langford L.A., Baumgard M.L., Hattier T., Davis T., Frye C., Hu R., Swedlund B., Teng D.H.F., Tavtigian S.V. (1997). Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat. Genet.*, 15: 356-362.
- Strickler J.G., Zheng J., Shu Q., Burgart L.J., Alberts S.R., Shibata D. (1994). P53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: When guardians fail. *Cancer Res.*, 54: 4750-4755.
- Sun H., Lesche R., Li D.M., Liliental J., Zhang H., Gao J., Gavrilova N., Mueller B., Liu X., Wu H. (1999). PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-triphosphate and AKT/protein kinase B signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 6199-6204.
- Tahara E. (1995). Molecular biology of gastric cancer. *World J. Surg.*, 19: 489-490.
- Tahara E. (1995) Genetic alterations in human gastrointestinal cancers: the application to molecular diagnosis. *Cancer*, 75: 1410-1417.
- Tamura G., Sakata K., Nishizuka S., Maesawa C., Suzuki Y., Iwaya T., Terashima M., Saito K., Satodate R. (1997). Analysis of the fragile histidine triad gene in primary gastric carcinomas and gastric carcinoma cell lines. *Genes Chromosom. Cancer*; 20: 98-102.
- Tamura M., Gu J., Matsumoto K., Aota S., Parsons R., Yamada K.M. (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science*, 280: 1614-1617.
- Tashiro H., Blazes M.S., Wu R., Cho K.R., Bose S., Wang S.I., Li J., Parsons R., Ellenson L.H. (1997). Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res.*, 57: 3935-3940.
- Terrell R.B., Wille A.H., Chevillie J.C., Nystuen A.M., Cohen M.B., Sheffield V.C. (1995). Microsatellite instability in adenocarcinoma of the prostate. *Am J. Pathol.*, 147: 799-805.

- Thiagalingam S., Lisitsyn N.A., Hamaguchi M., Wigler M.H., Willson J.K.V., Markowitz S.D., Leach F.S., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1996). Evaluation of the FHIT gene in colorectal cancers. *Cancer Res.*, 56: 2936-2939.
- Thibodeau S.N., Bren G.; Schaid D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, 363: 558-561.
- Tomlinson I.P.M.; Novelli M.R., Bodmer W.F. (1996). The mutation rate and cancer (tumorigenesis/ evolution/ selection/ mutator phenotype/ genomic instability). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 14800-803
- Tsugawa K., Fushida S., Yonemura Y (1993). Amplification of c-erbB2 gene in gastric carcinoma: correlation with survival. *Oncology*, 50: 418-425.
- UICC, TMN classification of malignant tumors. (1987). Springer-Verlag, Berlin, (4th ed.), pp 43-46.
- Visakorpi T., Kallioniemi A.H., Syvanen A.C., Hyytinen E.R., Karhu R., Tammela T., Isola J.J., Kallioniemi O.P. (1995). Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.*, 55: 342-347.
- Voorter C., Joos S., Bringuier P.P., Vallinga M., Poddighe P., Schalken J., Manoir S., Ramaekers F., Lichter P., Hopman A. (1995). Detection of chromosomal imbalances in transitional cell carcinomas of the bladder by comparative genomic hybridization. *Am. J. Pathol.*, 146: 1341-1354.
- Vidgren V., Kokkola A., Monni O., Puolakkainen P., Nordling S., Kallioniemi A., Kivilaakso E., Knuutila S. (1999). Concomitant gastrin and ERBB2 gene amplifications at 17q12-q21 in intestinal type of gastric cancer. *Gene Chromosom Cancer*, 24: 24-29.
- Virgilo L., Shuster M., Gollin S.M., Veronese M.L., Ohta M., Huebner K., Croce C.M. (1996). FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9970-9775.
- Watson S.A., Durrant L.G., Crosbie J.D., Morris D.L. (1989). The in vitro growth response of primary colorectal and gastric cancer cells to gastrin. *Int.J. Cancer*, 43: 692-696.
- Weber J.L., Wong C. (1993). Mutation of short human tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.*, 2: 1123-1128.
- Wen S., Stolarov J., Myers M.P., Su J.D., Wigler M.H., Tonks N.K., Durden D.L. (2001). PTEN controls tumor-induced angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: 4622-4627.
- Wirtz H.-C., Müller W., Noguchi T., Scheven M., Rüschoff J., Hommel G., Gabbert H.-E. (1998). Prognosis value and clinicopathological profile of microsatellite instability in gastric cancer. *Clin. Cancer Res.*, 4: 1749-1754.

Zou T.-T., Lei J., Shi Y.-Q., Yin S., Wang S., Souza R.F., Kong D., Shimada Y., Smolinski K.N., Greenwald B. D., Abraham J.M., Harpaz N., Meltzer S.J. (1997). FHIT gene alterations in esophageal cancer and ulcerative colitis (UC). *Oncogene*, 15: 101-105.

7 Abkürzungen

ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
BVI	Blutgefäßinvasion
BSA	Rinderserum-Albumin
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
DAPI	4,6 Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
G	Tumordifferenzierungsgrad
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
LOH	Verlust der Heterozygotie („loss of heterozygosity“)
LVI	Lymphgefäßinvasion
MMR	Mismatch repair
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
N	Normalgewebe
PBS	Phosphatpuffer ("phosphate buffered saline")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pTNM	Tumor/Nodus/Metastase (pathologische Klassifikation)
SSC	Natrium-Zitrat-Puffer mit NaCl
T	Tumorgewebe
TRITC	Tetraethylrhodamin-Isothiozyanat
UICC	Union International Contre Le Cancer
WHO	Weltgesundheitsorganisation

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die durch ihre Hilfe und Unterstützung zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Dem Direktor des Institutes für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Herrn Professor Gabbert danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. W. Müller danke ich für die Bereitstellung des wissenschaftlichen Themenbereiches sowie für die kompetente und geduldige Unterstützung.

Außerdem danke ich Herrn Dr. C. Wirtz für die Betreuung während meiner praktischen wissenschaftlichen Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

9 Lebenslauf

Nadine Alexandra Maria Buys

Hüttenstraße 25
40215 Düsseldorf

geb. 24. August 1975 in Düsseldorf

ledig

SCHULBILDUNG

1982 – 1986

Pestalozzi – Grundschule, Neuss

1986 – 1994

Marienberg Gymnasium, Neuss
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

HOCHSCHULAUSBILDUNG

10/1994 – 2001

Studium der Humanmedizin
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

08/1996

Physikum

08/1997

1. Staatsexamen

03/2000

2. Staatsexamen

03/2000 –
05/2001

Praktisches Jahr im
Evangelischen Krankenhaus Düsseldorf:

1.Tertial: Gynäkologie und Geburtshilfe bei Prof. Dr. Meier

2.Tertial: Chirurgie bei Prof. Krämling

3.Tertial: Innere Medizin bei Prof. Neuhaus

05/2001

3. Staatsexamen

ÄRZTIN IM PRAKTIKUM

09/2001 –
03/2003

Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
Prof. Dr. Werner Meier

Düsseldorf, im Januar 2003

Genetische Instabilität beim Magenkarzinom

Obwohl das Magenkarzinom weltweit auch heute noch den zweithäufigsten malignen epithelialen Tumor darstellt, ist seine molekulare Karzinogenese bislang zumindest teilweise noch unklar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung des Musters chromosomaler Alterationen bei 38 Magenkarzinomen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) sowie der Nachweis einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI).

Darüber hinaus wurde der immunhistochemische Nachweis der Proteinexpression der MMR-Gene hMLH1 und hMSH2 durchgeführt.

Bei sämtlichen untersuchten Magenkarzinomen waren DNA-Veränderungen nachweisbar, die im wesentlichen Zugewinnen entsprachen, während Verluste sehr viel seltener zu beobachten waren. Insbesondere die Chromosomen 20,17,12,15 und 11 wiesen in 45-97% der Tumoren Zugewinne auf. Eine Korrelation der Zugewinne und der Verluste konnte jedoch weder mit der Laurén-Klassifikation noch mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren nachgewiesen werden.

Auch zwischen Tumoren mit MSI und solchen ohne fand sich kein signifikanter Unterschied im Muster der DNA-Veränderungen in der CGH-Analyse.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit einer europäischen Studie aus Finnland, während zur Hochrisikopopulation Japans deutliche Unterschiede im chromosomalen Aberrationsmuster bestehen, die möglicherweise auf Unterschiede in der Karzinogenese des Magenkarzinoms hindeuten.

Im Bereich des FHIT- und des PTEN-Gens, für die bei verschiedenen malignen Tumoren eine Rolle im Sinne von Tumorsuppressorgenen diskutiert wird, konnten Allelverluste lediglich bei 10% bzw. bei 7% der untersuchten Magenkarzinome nachgewiesen werden. So scheinen nach den vorliegenden Ergebnissen Allelverluste dieser Gene für die Karzinogenese des Magenkarzinoms, wenn überhaupt, dann nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Untersuchung keine Korrelation des chromosomalen Aberrationsmusters der CGH-Analyse mit der Tumorprogression nachgewiesen werden. Allerdings weisen die betroffenen Chromosomenabschnitte auf eine Reihe möglicher neuer Kandidatengene hin, die für die Tumorbologie eine entscheidende Rolle spielen könnten und einer weiteren Charakterisierung bedürfen.