

**Aus dem Institut für Pathologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Prof. Dr. H.E. Gabbert

**Hypermethylierung der Tumorsuppressorgene *P14*, *P16*, *APC* und
des DNA-Reparaturgens *hMLH1* in Adenokarzinomen des oberen
Gastrointestinaltraktes**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Erol Iskender

2005

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

gez. Prof. Dr. Raab
Dekan

Referent: Prof. Dr. Sarbia

Korreferent: Prof. Dr. Schulz

Abkürzungen

ADC	Adenocarcinoma
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
CDK4	Cyclin Dependent Kinase 4
CpG	Cytosin-phospho-Guanin
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate, DNA-Basen zusammengesetzt aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP , A=Adenosin, C=Cytosin, G=Guanin, T=Thymin
DAP-Kinase	Death Associated Protein Kinase
DNA	Deoxyribonucleic Acid
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1
hMLH1	Humanes MutL Homolog 1
INK4a	Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase 4a
kbp	Kilobasenpaare

LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin
Mdm2	Murine Double Minute Gen 2
MMR	Mismatch Repair
MSP	Methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion
MTHFR	Methylenetetrahydrofolate Reductase
MYOD1	Myogenic Differentiation 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
TSG	Tumorsuppressorgen

Inhalt	Seite
1. Einleitung	
1.1 Das Ösophaguskarzinom	1
1.2 Das Kardiakarzinom	2
1.3 Das Magenkarzinom	3
1.4 DNA-Hypermethylierung in der Karzinogenese	5
1.5 Die Tumorsuppressorgene <i>P16</i> , <i>P14</i> , <i>APC</i> und das DNA-Reparaturgen <i>hMLH1</i>	7
1.5.1 <i>P16</i> und <i>P14</i>	7
1.5.2 <i>APC</i>	8
1.5.3 <i>hMLH1</i>	9
2. Aufgabenstellung	10
3. Material und Methoden	
3.1 Untersuchungskollektiv	11
3.2 Histologische Untersuchungen	12

3.3	Molekulargenetische Untersuchungen	
3.3.1	DNA-Präparation	14
3.3.2	DNA-Modifikation	15
3.3.3	Real-time methylierungsspezifische PCR	16
3.3.4	TaqMan-Sonden	21
3.4	<i>P16</i> und <i>hMLH1</i> Immunhistochemie	22
3.5	Statistik	22
3.6	Verwendete Materialien und Geräte	23
4.	Ergebnisse	
4.1	Hypermethylierung von <i>P16</i>	25
4.2	Hypermethylierung von <i>P14</i>	26
4.3	Hypermethylierung von <i>APC</i>	27
4.4	Hypermethylierung von <i>hMLH1</i>	29
4.5	Expression von <i>P16</i>-Protein	30
4.6	Korrelation zwischen <i>P16</i>-Proteinexpression und Genhypermethylierung	31
4.7	Expression von <i>hMLH1</i>-Protein	31
4.8	Korrelation zwischen <i>hMLH1</i>-Proteinexpression und Genhypermethylierung	33

5. Diskussion	35
6. Zusammenfassung	39
7. Literatur	40
8. Lebenslauf	53
9. Erklärung	55
10. Danksagung	56

1. Einleitung

1.1 Das Ösophaguskarzinom

Die Inzidenz des Ösophaguskarzinoms variiert weltweit zwischen 2,5 bis 6 pro 100.000 Männern und 1,5 bis 2,5 pro 100.000 Frauen. Bezogen auf die absolute Zahl der Karzinomerkrankungen zählt das Ösophaguskarzinom damit zu den vergleichsweise seltenen Tumoren. Dennoch ist das Ösophaguskarzinom weltweit die sechsthäufigste Todesursache aller Krebsarten (Pisani *et al.*, 1999). Inzidenz und Prävalenz des ösophagealen Adenokarzinoms, das neben dem Plattenepithelkarzinom der häufigste histologische Subtyp ist, hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen und übertrifft in einigen Regionen der westlichen Welt die des Plattenepithelkarzinoms (Devesa *et al.*, 1998). Die Ursachen für diese deutliche Häufigkeitszunahme des Adenokarzinoms, bei gleich bleibender Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms, sind nicht bekannt. Allerdings kann als gesichert gelten, dass die überwiegende Mehrzahl der Adenokarzinome auf dem Boden einer Refluxerkrankung entsteht. Der chronische gastroösophageale Reflux geht mit chronischer Ösophagitis und nachfolgender Destruktion und Desquamation des ösophagealen Plattenepithels einher. Bei etwa 10% der Patienten mit einer gastroösophagealen Refluxkrankheit kommt es zu einem metaplastischen Ersatz der refluxbedingten Epitheldefekte durch ein vermehrt säureresistentes Dünndarm-ähnliches Zylinderepithel, welches nach dem Erstbeschreiber als Barrett-Ösophagus bezeichnet wird (Barrett, 1950; Spechler *et*

al., 1986; Winters *et al.*, 1987; Talley *et al.*, 1992). Als Ausgangspunkt für diese metaplastische Regeneration wird zum einen das Einwachsen benachbarter Kardiaschleimhaut in den Ösophagus, zum anderen eine Umdifferenzierung von ösophagealen Reservezellen diskutiert (Jankowski *et al.*, 1999). Bei einem Teil der Patienten entwickeln sich im Barrett-Ösophagus geringgradige oder hochgradige intraepitheliale Neoplasien (früher Dysplasien) als präkanzeröse Läsionen. Und so haben Patienten mit einem Barrett-Ösophagus ein 30- bis 125- fach erhöhtes Risiko an einem Adenokarzinom der unteren Speiseröhre, dem Barrettkarzinom, zu erkranken (Haggitt, 1994).

Zum Zeitpunkt der Diagnose sind Patienten mit einem Adenokarzinom des distalen Ösophagus durchschnittlich 63 Jahre alt. Es besteht eine deutliche Bevorzugung des männlichen Geschlechtes.

1.2 Das Kardiakarzinom

Das Adenokarzinom der Kardia wurde traditionellerweise als proximales Magenkarzinom angesehen. Jedoch weist das Kardiakarzinom starke ätiologische und epidemiologische Ähnlichkeiten zum Barrettkarzinom auf, wie etwa die Assoziation zur gastroösophagealen Refluxkrankheit und die Prädominanz des männlichen Geschlechts. So nahm auch die Inzidenz der Kardiakarzinome in den letzten zwei Dekaden in den Industriestaaten zu, während die Inzidenz der distalen Magenkarzinome abnimmt (Wayman *et al.*, 2001; Dolan *et al.*, 1999).

Diese Erkenntnisse haben zur Definition des Kardiakarzinoms als eigenständige Entität geführt (Tajima *et al.*, 2001; Wijnhoven *et al.*, 1999). Gestützt wird diese Auffassung durch molekulargenetische Untersuchungen, die größere Ähnlichkeiten des Kardiakarzinoms zum Ösophaguskarzinom als zum Magenkarzinom zeigen konnten (El-Rifai *et al.*, 2001; Stocks *et al.*, 2001). Dem Konzept, Barrett- und Kardiakarzinom als Adenokarzinom des gastroösophagealen Überganges zusammenzufassen (Hamilton *et al.*, 2000), ist jedoch durch mehrere Studien widersprochen worden (Taniere *et al.*, 2001; Wijnhoven *et al.*, 1999).

Die Prognose der Kardiakarzinome ist außerordentlich schlecht. Möglicherweise ist die häufig späte Diagnose, neben der Symptomarmut des Tumors, auch dadurch mitbedingt, dass die subkardiale Region endoskopisch schwer einzusehen ist. Das sehr verzweigte Lymphabfluss-System nach mediastinal, abdominal und retroperitoneal erklärt z.T. die hohe Frequenz lymphogener Metastasen (Hohenberger *et al.*, 2003).

1.3 Das Magenkarzinom

Das Magenkarzinom ist weltweit die zweithäufigste Todesursache aller Krebserkrankungen, mit einer starken regionalen Häufung in Japan und China. Die Inzidenz in Europa beträgt derzeit ca. 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Wayman *et al.*, 2001; Terry *et al.*, 2002). Während der letzten 50

Jahre nahm nicht nur die Mortalität, sondern auch die Inzidenz des Magenkarzinoms weltweit, insbesondere in den Industrienationen, ab (Wayman *et al.*, 2001; Parker *et al.*, 1997). Dies ist nicht nur auf verbesserte Lebens- und Ernährungsbedingungen zurückzuführen, sondern auch auf die Einführung der Antibiotikatherapie der *Helicobacter-pylori*-Infektion, seit bekannt ist, dass diese Infektion eine Prädisposition für das Magenkarzinom darstellt (Correa *et al.*, 2000). Unabhängig von ethnischer Zugehörigkeit oder Geschlecht existiert ein enger Zusammenhang zwischen Magenkarzinomen und Alter, wobei der Häufigkeitsgipfel jenseits des 50. Lebensjahres liegt (Wayman *et al.*, 2001; Kranenbarg *et al.*, 1998).

Die bereits im Jahre 1965 durch Lauren eingeführte histologische Klassifikation der Magenkarzinome in einen diffusen und intestinalen Typ hat sich bis heute bewährt, vor allem auch wegen seinen therapeutischen Implikationen (Lauren, 1965). Der intestinale Typ tritt eher im distalen Abschnitt des Magens und bei älteren Patienten auf, während der diffuse Typ häufiger jüngere Menschen betrifft und keine bevorzugte Lokalisation aufweist. (La Vecchia *et al.*, 1992).

1.4 DNA-Hypermethylierung in der Karzinogenese

Neoplasien können nicht nur durch die fehlerhafte Aktivierung von Onkogenen, sondern auch durch die fehlerhafte Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (TSG) entstehen (DePinho *et al.*, 2001; Hakem *et al.*, 2001; Knudson *et al.*, 2001). Tumorsuppressorgene sind Gene, deren Proteinprodukte das Tumorwachstum supprimieren können. Sie sind durch unterschiedliche Funktionen an einer restriktiven Regulation des Zellzyklus beteiligt und wirken dadurch etwaigen Tendenzen zu unkontrolliertem Zellwachstum entgegen.

In jeder normalen Zelle wird die Genaktivität durch Methylierung cytosin- und guaninreicher DNA-Abschnitte (CpG-Inseln) der Promotoren reguliert. Nach Anbringung einer Methylgruppe an eine Cytosinbase durch die DNA-Methyltransferasen können Transkriptionsfaktoren, vermutlich aufgrund einer sterischen Behinderung, nicht mehr an den Promotor binden und das Gen ist somit funktionell inaktiviert (Tate *et al.*, 1993; Kass *et al.*, 1997; Iguchi-Arigo *et al.*, 1989). Ein weiterer plausibler Mechanismus, durch den DNA-Hypermethylierung die Genexpression regulieren kann ist mit Hilfe von Proteinen, die bevorzugt methylierte Promotoren binden und somit die Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre Zielgene verhindern (Schwarz *et al.*, 1997; Jost *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1984). Dieser Mechanismus ist nach heutigem Stand der Wissenschaft wichtiger. Die aberrante Methylierung von Promotoren, die die Expression des jeweiligen Genes kontrolliert, stellt einen sehr bedeutenden und effektiven Mechanismus zur Inaktivierung von TSG dar (Baylin *et al.*, 2002). Während bei den Onkogenen häufig die Aktivierung eines Allels zur Tumorpromotion ausreicht, müssen bei den

TSG beide Allele strukturell oder funktionell ausgeschaltet sein (Sager, 1989). Neben der Methylierung beider Allele ist auch die Methylierung eines Allels in Kombination mit einer Deletion oder Mutation des anderen Allels möglich (Laird *et al.*, 1996; Herman, 1999; Momparler *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002; Esteller, 2002).

Die aberrante Methylierung (Hypermethylierung) verschiedener TSG ist in einer Vielzahl humaner Malignome zu finden. Dabei scheint es ein für jeden Tumortyp spezifisches Muster der Hypermethylierung verschiedener TSG zu geben (Esteller *et al.*, 2002; Paz *et al.*, 2003). In Studien zum oberen Gastrointestinaltrakt fand sich in Adenokarzinomen des Ösophagus häufig eine Hypermethylierung von *APC* und *P16*, aber nur selten eine Hypermethylierung von *P14*. Im Magenkarzinom sind dagegen die Gene *APC*, *P16*, *P14* und *hMLH1* häufig hypermethyliert (Kawakami *et al.*, 2000; Eads *et al.*, 2000; Esteller *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2001; Iida *et al.*, 2000; To *et al.*, 2002; Kuismanen *et al.*, 1999; Fleisher *et al.*, 1999). Die angegebenen Häufigkeiten variieren je nach Studie und können, zumindest zum Teil, durch methodische Unterschiede erklärt werden. Eine vergleichende Analyse der Methylierungsmuster von Ösophagus- und Magenkarzinomen innerhalb einer Studie unter Verwendung der gleichen Methoden wurde jedoch bisher nicht durchgeführt. Ferner wurde die Prävalenz der Hypermethylierung von *APC*, *P16* und *P14* in Adenokarzinomen der Kardia bisher noch nicht untersucht. Somit ist es gegenwärtig unklar, ob signifikante Unterschiede in den Methylierungsmustern dieser TSG zwischen Adenokarzinomen des Ösophagus, der Kardia und des Magens existieren. Außerdem ist es unbekannt, ob ein Methylierungsmuster mit

einem histologischen Subtyp korreliert ist, wie es z.B. beim Mammakarzinom gezeigt werden konnte (Lehmann *et al.*, 2002).

1.5 Die Tumorsuppressorgene *P16*, *P14*, *APC* und das DNA-Reparaturgen *hMLH1*

1.5.1 *P16* und *P14*

Die INK4a-Region auf Chromosom 9q21 kodiert durch alternatives Splicing sowohl für das *P16*-Protein als auch für das *P14*-Protein (Duro *et al.*, 1995; Mao *et al.*, 1995). Die durch verschiedene Leseraster generierten Proteine sind einander in ihrer Struktur ähnlich und haben jeweils eine inhibitorische Wirkung im Zellzyklus (Quello *et al.*, 1995).

Das *P16*-Genprodukt ist ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase 4 (CDK4), welches die Serin/Threonin-Reste des Retinoblastoma-Proteins phosphoryliert (Sherr, 1994; Weinberg, 1995). Durch Erhaltung des Retinoblastoma-Proteins in einem unphosphorylierten Zustand verhindert *P16* den Übergang in die S-Phase und somit die Proliferation. *P14* hemmt dagegen das Zellwachstum, indem es die *MDM2*-Inhibition (murine double minute Gen 2) von *P53* aufhebt und dadurch die *P53*-vermittelte Apoptose erleichtert (Zhang *et al.*, 1998).

1.5.2 APC

Das APC-Gen (Adenomatöse Polyposis Coli) liegt auf Chromosom 5q21 (Bodmer, 1987). Es besteht aus 8535 Basenpaaren, die sich über 21 Exone erstrecken (Thliveris, 1996) und für ein Protein mit 2843 Aminosäuren kodieren (Horii *et al.*, 1993). Das APC-Gen hat 2 Promotorregionen: 1A und 2B, wobei in erster Linie Promotor 1A aktiv ist (Lambertz *et al.*, 1993). Neben Mutationen des APC-Gens, die sehr früh in der Entwicklung von Neoplasien auftreten (Powell *et al.*, 1992) und mit der Entwicklung von familiären und sporadischen intestinalen Neoplasien assoziiert sind (Wong *et al.*, 1996), wurde eine Hypermethylierung der APC-Promotorregion in einer Reihe von gastrointestinalen Tumoren beobachtet, v.a. im Kolonkarzinom, Ösophaguskarzinom und Magenkarzinom (Esteller, 2000; Tsuchiya, 2000). Die Inaktivierung des APC-Gens kann zu einer Aktivierung des Proto-Onkoproteins β -Catenin führen.

1.5.3 *hMLH1*

Das *hMLH1*-Gen liegt auf Chromosom 3p21. Es besteht aus 100 kbp (Kilobasenpaaren), die sich über 19 Exone erstrecken und codiert für ein 756 aminosäurenlanges Protein. *hMLH1* gehört zu der Gruppe der DNA-Mismatch Repair (MMR) Gene (Fishel *et al.*, 1993; Papadopoulos *et al.*, 1994). Diese MMR-Gene können fehlerhaft replizierte DNA-Basen erkennen und durch die richtigen Nukleotide ersetzen. So wird die Genauigkeit der DNA-Replikation deutlich erhöht. Die Inaktivität dieser zellulären Schutzsysteme führt zu erhöhten Mutationsraten und genetischer Instabilität, was als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet wird (Modrich *et al.*, 1996). So findet sich bei primären nicht-hereditären Kolonkarzinomen mit Mikrosatelliteninstabilität eine Hypermethylierung der Promotorregion des *hMLH1*-Gens und ein Verlust der Proteinexpression (Kane *et al.*, 1997).

2. Aufgabenstellung

In der aktuellen Studie haben wir die Hypermethylierung der TSG *P16*, *P14*, *APC* und des DNA-Reparaturgens *hMLH1* in 50 Adenokarzinomen des Ösophagus, 50 Adenokarzinomen der Kardia und in 50 Adenokarzinomen des Magens, unter Berücksichtigung verschiedener histologischer Subtypen, untersucht.

Zusätzlich haben wir die Expression des *P16*-Proteins und des *hMLH1*-Proteins immunhistologisch bestimmt und mit dem Methylierungsstatus verglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungskollektiv

Das 150 Patienten umfassende Kollektiv dieser Untersuchung bestand aus jeweils 50 Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus, der Kardia und des Magens. Die Resektionen des Primärtumors erfolgten zwischen dem 1.1.1987 und 31.12.2001 ohne präoperative Chemo- oder Radiotherapie. Die Patienten mit Ösophaguskarzinom waren mehrheitlich männlich (45 von 50, 90%) und zwischen 35 und 81 Jahren alt (Median 62 Jahre). Bei den Patienten mit Kardiakarzinom fand sich eine nahezu identische Verteilung: 45 von 50 Patienten waren männlich (90%) und zwischen 38 und 79 Jahren alt (Median 63 Jahre). Im Gegensatz dazu waren die Patienten mit Magenkarzinom deutlich älter (37 bis 89 Jahre, Median 70) und wiesen mit 23 männlichen und 27 weiblichen Patienten ein nahezu ausgeglichenes Geschlechterverhältnis auf.

3.2 Histologische Untersuchungen

Die Resektate von Ösophagus, Kardia und Magen wurden für eine routinemäßige histologische Untersuchung in 10%igem, gepuffertem Formalin fixiert, zugeschnitten und in Paraffin eingebettet. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

Die Unterscheidung zwischen Adenokarzinomen des Ösophagus und der Kardia wurde gemäß von Standardkriterien durchgeführt (Siewert *et al.*, 1998). Die pT-Kategorie und pN-Kategorie der Tumore wurde gemäß der aktuellen TNM-Klassifikation bestimmt (Sobin *et al.*, 2002). Dabei wurden die Kardiakarzinome im TNM-System wie Magenkarzinome klassifiziert, da bislang kein alternatives Klassifikationssystem vorliegt.

Das Tumorgrading wurde für alle Karzinome gemäß der WHO-Klassifikation bestimmt (Hamilton *et al.*, 2000). Alle Magenkarzinome mit einem Siegelringzell-Anteil von mehr als 5% wurden als G3 klassifiziert. Auch Ösophagus- und Kardiakarzinome wurden nach diesem Schema klassifiziert, da keine anderen Klassifizierungssysteme vorliegen. Die Patienten- und Tumoreigenschaften sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Klinisch-pathologische Parameter von 150 untersuchten Adenokarzinomen (ADC)

	ADC des Ösophagus	ADC der Kardia	ADC des Magens
Alter			
Median (Spanne)	62 (33 - 81)	63 (38 - 79)	70 (37 - 89)
Geschlecht			
Männlich	45 (90%)	45 (90%)	23 (46%)
Weiblich	5 (10%)	5 (10%)	27 (54%)
pT Kategorie			
1	16 (32%)	6 (12%)	13 (26%)
2	10 (20%)	25 (50%)	22 (44%)
3	23 (46%)	13 (26%)	13 (26%)
4	1 (2%)	6 (12%)	2 (4%)
pN Kategorie			
0	21 (42%)	13 (26%)	18 (36%)
1 - 3	29 (58%)	37 (74%)	32 (64%)
Grading			
1	2 (4%)	1 (2%)	2 (4%)
2	20 (40%)	14 (28%)	15 (30%)
3	28 (56%)	35 (70%)	33 (66%)
WHO-Klassifikation			
Adenokarzinome	47 (94%)	45 (90%)	32 (64%)
Siegelringzellkarzinome	3 (6%)	5 (10%)	18 (36%)
Lauren-Klassifikation			
Intestinal	44 (88%)	38 (76%)	25 (50%)
Diffus	0	1 (2%)	13 (26%)
Gemischt	6 (12%)	11 (22%)	12 (24%)

3.3 Molekulargenetische Untersuchung

3.3.1 DNA-Präparation

Zunächst wurde auf der Grundlage der vorangegangenen histologischen Untersuchungen von jedem der 150 Resektate je ein Paraffinblock mit Normalgewebe und mit Karzinomgewebe ausgewählt. Von diesem Paraffinblock wurden jeweils 5 x 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden in Xylol entparaffiniert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe in das wässrige Milieu gebracht. Später wurden die Schnitte leicht mit Hämatoxylin gegengefärbt. Nach Identifikation der interessierenden Gewebeareale wurden diese unter mikroskopischer Kontrolle mit einem sterilen Skalpell vom Objektträger abgekratzt und in ein steriles PCR-Reaktionsgefäß (1.5 ml Volumen) mit 200 µl TE-Puffer überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass immer etwa gleichgroße Areale verwendet wurden. Anschließend wurde das Gewebe mit 20 µl Proteinase K (25 mg/ml) über Nacht (16h) bei 55 °C im Thermoinkubator verdaut. Durch achtminütige Erhitzung auf 94°C wurde die Proteinase K schließlich inaktiviert. 2 µl dieser DNA-Präparation wurden hiernach ohne weitere Aufreinigung für die nachfolgende Bisulfitumwandlung eingesetzt.

3.3.2 DNA-Modifikation

Zur Analyse des Methylierungsstatus wurde die methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion (MSP) benutzt, wie sie von Herman et al. (1996) beschrieben wurde.

Sie beruht auf der Beobachtung, dass durch Natriumbisulfit in genomischer DNA unmethyliertes Cytosin zur Base Uracil deaminiert wird, welches bei den nachfolgenden Amplifikationsschritten homolog zu Thymin ist. Bei methyliertem Cytosin findet dagegen keine chemische Änderung statt. Letztlich wird dadurch in Abhängigkeit vom bestehenden Methylierungsstatus die Basensequenz der DNA geändert. Die Amplifikation in der anschließenden PCR erfolgt durch speziell designte Primer, die entweder nur an veränderte (d.h. vorher unmethylierte) oder unveränderte (d.h. vorher methylierte) DNA-Abschnitte binden.

Der Vorteil der Untersuchungen, die auf Natriumbisulfit basieren, ist, dass nur sehr kleine Mengen an DNA benötigt werden. Somit sind sie auch für Untersuchungen geeignet, bei der die DNA aus Paraffinmaterial präpariert wurde.

3.3.3 Real-time methylierungsspezifische PCR

Die Echtzeit-MSP wurde in einem LightCycler durchgeführt (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).



Abb. 1 und 2 : LightCycler

Für die MSP wurde 2 μ l genomischer DNA wie oben beschrieben, mit Hilfe eines CpG-Modifikationskit (CpG Genome, DNA modification kit, Intergen, Purchase, New York, USA) nach den Anweisungen des Herstellers modifiziert.

3. Material und Methoden

Die MSP für die Zielgene *P16*, *P14*, *APC* und *hMLH1* wurde mit einem Endvolumen von 20 μ l durchgeführt.

Darin enthalten waren:

10,2	μ l	Aqua destillata
2,0	μ l	MgCl
2,0	μ l	Hot Star Polymerase
1,2	μ l	vom jeweiligen Primer
1,0	μ l	Taqman P
0,4	μ l	dUTP
<hr/>		
18	μ l	Mastermix
2 μ l bisulfitbehandelter DNA enthalten 100 ng DNA		

Der fertig gestellte Mastermix wurde zentrifugiert und 18 μ l hiervon in die Glaskapillaren gefüllt. Dann kam in jede Glaskapillare 2 μ l der jeweiligen DNA hinzu bzw. in eine Glaskapillare destilliertes Wasser als Negativkontrolle. Jedes Experiment beinhaltete auch eine Positivkontrolle mit bekannter Hypermethylierung des jeweiligen Gens. Nach der Zentrifugation wurden die Glaskapillaren in das LightCycler-Karussell eingesetzt, das entsprechende Programm für jedes Gen aufgerufen und der LightCycler gestartet. Für die

Analyse der MSP-Ergebnisse wurde die LightCycler-Software Version 3.5 benutzt (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

Jede Probe, die ein typisches s-förmiges Fluoreszenzsignal zeigte, wurde als hypermethyliert gewertet.

Vor der Analyse der Zielgene wurde das Vorhandensein von intakter, amplifizierbarer DNA geprüft. Dies geschah für jede Probe mit Hilfe der Amplifizierung des Referenzgens *MYOD1* (Myogenic Differentiation 1) mit dem gleichen MasterMix wie für die Zielgene. Die Primer und Sonden für das *MYOD1*-Gen sind in einem Gebiet ohne CpG-Nukleotide lokalisiert, so dass die Amplifizierung von *MYOD1* durch MSP unabhängig vom Methylierungsstand der CpG-Inseln auftritt.

Die Sequenzen der Primer und Sonden und die MSP Bedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2. Primer und Sonden für die untersuchten Genorte und Bedingungen der methylierungsspezifischen PCR (MSP)

Gen	Primer und Sonden (5'FAM und 3'TAMRA)	MSP-Bedingungen
APC	F: GAA CCA AAA CGC TCC CCA T R: TTA TAT GTC GGT TAC GTG CGT TTA TAT Sonden: CCC GTC GAA AAC CCG CCG ATT A	1. 10 Min 95 °C, 2. 10 Sek 95 °C, 3. 5 Sek 58 °C, 4. 8 Sek 72 °C, 5. → 60 Zyklen 2.-4. 6. 30 Sek 40 °C
P16^{INK4A}	F: TGG AGT TTT TGG TTG ATT GGT T R: AAC AAC ACC CAC ACC TCC T Sonden: ACC CAA CCC CAA ACC ACA	1. 10 Min 95 °C, 2. 10 Sek 95 °C 3. 5 Sek 58 °C 4. 8 Sek 72 °C 5. → 50 Zyklen 2.-4. 6. 30 Sek 40 °C
P14^{ARF}	F: ACG GGC GTT TTC GGT AGT T R: CCG AAC CTC CAA AAT CTC GA Sonden: CGA CTC TAA ACC CTA CGC ACG CAA AA	1. 10 Min 95 °C, 2. 10 Sek 95 °C, 3. 5 Sek 60 °C, 4. 8 Sek 72 °C, 5. → 50 Zyklen 2.-4. 6. 30 Sek 40 °C
hMLH1	F: CGT TAT ATA TCG TTC GTA GTA TTC GTG TTT R: CTA TCG CCG CCT CAT CGT Sonden: CGC GAC GTC AAA GC CAC TAC G	1. 10 Min 95 °C 2. 10 Sek 95°C 3. 5 Sek 65°C 4. 8 Sek 72°C 5. → 50 Zyklen 2.-4. 6. 30 Sek 40 °C
MYOD1	F: GGA TTT ATA TTT ATG TGG TGG GTG G R: CCA ACT CCA AAT CCC CTC TCT AT Sonden: GTT AGG GGA TAG AGG GAG GTA TTT AGG TTG	1. 10 Min 95 °C, 2. 10 Sek 95 °C, 3. 5 Sek 61 °C, 4. 8 Sek 72 °C, 5. → 60 Zyklen 2.-4. 6. 30 Sek 40 °C

Bei der LightCycler PCR wird die Temperaturverteilung mit Hilfe von Luft erreicht. Ein Ventilator stellt sicher, dass die erhitzte Luft gleichmäßig in der thermischen Kammer verteilt wird und dass an jeder Position des Rotors die gleiche Temperatur herrscht. Auf diese Weise kann eine programmierte Temperaturgenauigkeit von +/- 0,3 °C erzielt werden. Die Temperaturen in der Kammer können durch eine sehr schnelle Temperaturverteilungsrate von bis zu 20 °C pro Sekunde, innerhalb weniger Sekunden, erreicht werden. Die PCR findet in speziell angefertigten Glaskapillaren statt, die Platz für bis zu 20 µl Reaktionsansatz bieten. Bis zu 32 Glaskapillaren können in einem einzigen Lauf in ein Karussell eingesetzt werden, das in der Kammer rotiert. Die optimale Position, sowohl für das Karussell als auch für die optische Einheit, wird für jede einzelne Glaskapillare in einem Suchprozess vor jedem PCR-Lauf durchgeführt. Durch die Kombination von, einerseits Luft zur schnellen Temperaturverteilung und andererseits günstige Oberflächen zum Volumenverhältnis der Glaskapillaren, dauert ein PCR-Zyklus weniger als 30 Sekunden. Ein kompletter PCR-Lauf mit 30 - 40 Zyklen kann so in 20 - 30 Minuten durchgeführt werden

3.3.4 TaqMan-Sonden

Zum Nachweis der MSP-Produkte wählten wir TaqMan-Sonden. Das sind kurze Oligonukleotide, die mit einem mittleren Bereich der Test-DNA hybridisieren. Sie tragen an einem Ende einen Reporterfarbstoff und am anderen einen Quencher. Quencher sind Moleküle, welche die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe unterdrücken. Die Polymerasen im PCR-Ansatz sind in der Lage die TaqMan-Sonden bei der Verdopplung der DNA-Vorlage abzubauen. Dabei setzen sie zunächst den Reporterfarbstoff frei, welcher somit aus dem Einflussbereich des Quenchers gelangt. Auf diese Weise wird die Fluoreszenz des Farbstoffs nur dann messbar, wenn die Polymerase tatsächlich den gewünschten DNA-Strang kopiert hat. Jedes freigesetzte Molekül an Rezeptorfarbstoff steht dabei für einen gebildeten DNA-Strang. Daher kann man mit TaqMan-Sonden tatsächlich jederzeit die Menge gebildeter DNA nachweisen (Mullis *et al.*, 1987; Higuchi *et al.*, 1992; Wilfingseder *et al.*, 2002; Reidhaar-Olsen *et al.*, 2001).

3.4 P16 und hMLH1 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurden gleichfalls 5 µm dicke histologische Schnitte von einem repräsentativen Tumorblock gefertigt. Nach Entparaffinierung und Antigendemaskierung im Dampfdrucktopf wurde der monoklonale P16-Antikörper (Clone: 16P07; Neomarkers, Westinghouse, Fremont, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:50 aufgetragen. Der monoklonale hMLH1-Antikörper (Clone:

G168-728; BD Biosciences, San Diego, CA, USA) wurde dagegen 1:120 verdünnt. Sekundär- und Tertiärantikörper wurden entsprechend einem Standard avidin-biotin-peroxidase Protokoll aufgebracht. Als Nachweissystem wurde die LSAB-Methode (Labeled-Streptavidin-Biotin) benutzt (SkyTek Laboratories, Utah, USA). Die Anzahl der markierten Tumorzellen wurde semiquantitativ bestimmt, wobei jede Probe in einem der drei folgenden Kategorien eingeteilt wurde: 0 (0 – 4 % positive Tumorzellen), I (5 - 56 %), II (51 - 100 %). Die Auswertung der Proteinexpression wurde ohne Kenntnis der Ergebnisse der Methylierungsanalyse bestimmt und umgekehrt.

3.5 Statistik

Der Vergleich zwischen der Methylierungsfrequenz von *P16*, *P14*, *APC* und *hMLH1* in den jeweiligen untersuchten Gruppen wurde mit dem χ^2 -Test durchgeführt. P-Werte von < 0,05 wurden als signifikant bewertet.

3.6 Verwendete Materialien und Geräte

Materialien	Quelle
Aqua dest	Braun
Biotin	Sigma
Borsäure	Merck
Citrat	Merck
Diaminobenzidin	ScyTek
dNTPs	Qiagen
EDTA	Merck
Ethanol	Riedel-de Haen und Merck
Formaldehyd (Formalin)	Merck
H ₂ O ₂	Merck
MgCl	Roche
NaOH	Merck
β-Mercaptoethanol	Calbiochem
TaqMan-Sonden	MWG
Tris	Merck
Hot Star-Fast start	Roche
Proteinase K	Merck
LightCycler	Roche

3. Material und Methoden

Schüttelgerät, MS1 Minishaker	IKA
Drucker	Epson und Hewlett-Packard
Thermoinkubator	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf
Zentrifuge MicroD	Fisher Scientific

4. Ergebnisse

4.1 Hypermethylierung von *P16*

Die Hypermethylierung von *P16* wurde in 27 von 50 (54%) Adenokarzinomen des Ösophagus, in 18 von 50 (36%) Adenokarzinomen der Kardia und in 5 von 50 (10%) Adenokarzinomen des Magens gefunden. Hierbei waren Ösophagus- und Kardiakarzinome jeweils signifikant häufiger hypermethyliert als Magenkarzinome ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0020$). Das korrespondierende Normalgewebe wies keine *P16*-Hypermethylierungen auf (Vgl. Abb. 3). Die Siegelringkarzinome (WHO-Klassifikation) waren signifikant seltener (15,4%) hypermethyliert, als die anderen Typen des Adenokarzinoms (37,1%; $p = 0,0327$). Keiner der 14 Karzinome vom diffusen Typ (Lauren-Klassifikation) wies eine Hypermethylierung auf, wohingegen 36,5% der intestinalen Tumoren und 37,9% der gemischten Tumoren eine Hypermethylierung zeigten ($p = 0,0208$). Eine Korrelation mit der pT- oder pN-Kategorie lag nicht vor.

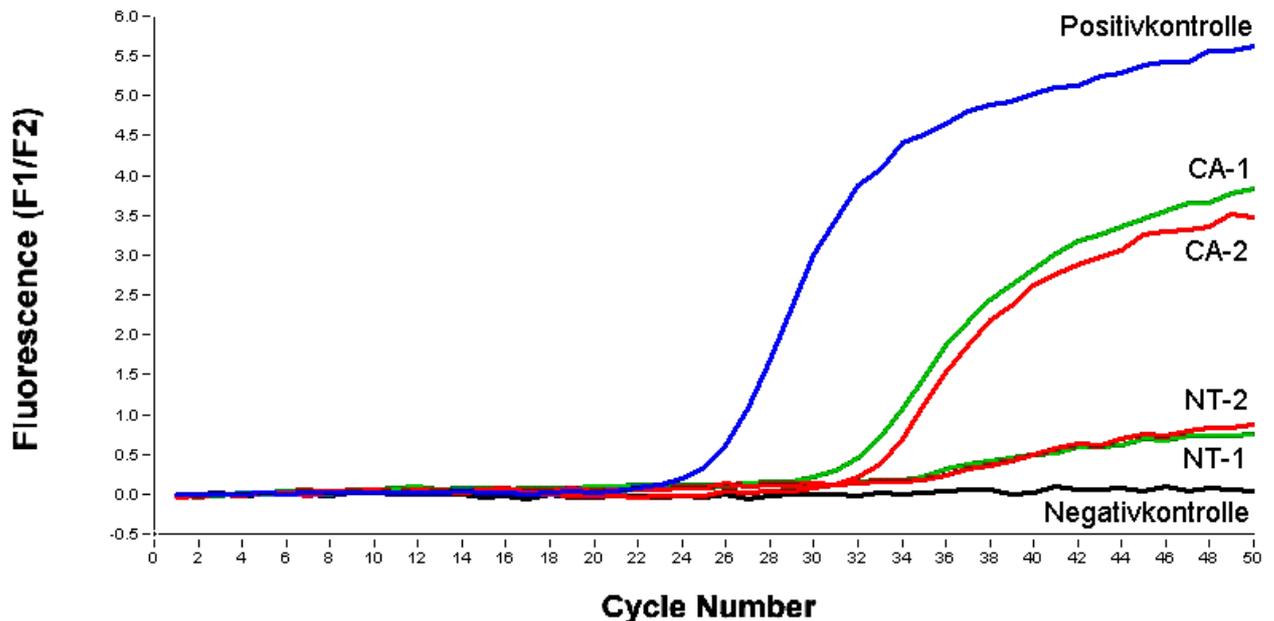


Abb. 3: Fluoreszenzkurven des *P16*-Gens in der Kardial. NT = Normalgewebe, CA = Karzinomgewebe

4.2 Hypermethylierung von *P14*

Die Hypermethylierung von *P14* fehlte in Adenokarzinomen des Ösophagus vollständig und kam nur selten in Adenokarzinomen der Kardial (1 von 50; 2%) und in Adenokarzinomen des Magens (5 von 50; 10%) vor, wobei nur der Unterschied zwischen Adenokarzinomen des Ösophagus und Adenokarzinomen des Magens statistisch signifikant ausfiel ($p=0,0218$). Das korrespondierende Normalgewebe wies keine *P14*-Hypermethylierung auf.

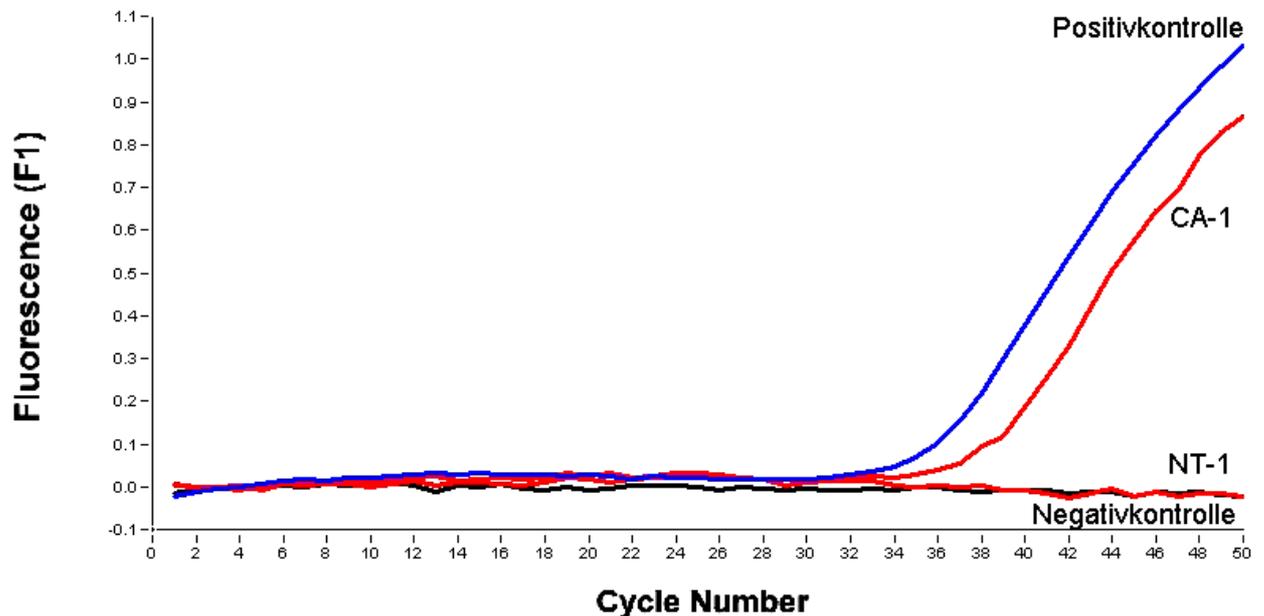


Abb. 4: Fluoreszenzkurven des *P14*-Gens im Magen. NT = Normalgewebe,
CA = Karzinomgewebe

4.3 Hypermethylierung von *APC*

Die Hypermethylierung von *APC* wurde in 39 von 50 (78%) Adenokarzinomen des Ösophagus, in 16 von 50 (32%) Adenokarzinomen der Kardia und in 42 von 50 (84%) Adenokarzinomen des Magens gefunden. Verglichen mit dem Kardiakarzinom waren das Ösophagus- und das Magenkarzinom jeweils signifikant häufiger hypermethyliert (jeweils $p < 0,0001$).

Eine Hypermethylierung von *APC* im jeweilig mit untersuchtem Normalgewebe lag nur bei einem Patienten mit Ösophaguskarzinom und bei einem Patienten mit Magenkarzinom vor. In der Gesamtheit der untersuchten Tumore wurde keine

Korrelation zwischen der Hypermethylierung von *APC* und den Parametern pT, pN, Grading und Lauren-Klassifikation gefunden. In Bezug auf die WHO-Klassifikation zeigten Siegelringzellkarzinome eine Tendenz für eine höhere Prävalenz der *APC*-Hypermethylierung (80,8%) als die anderen Typen des Adenokarzinoms (tubulär, papillär, muzinös) (61,3%), wobei die statistische Signifikanz nur knapp verfehlt wurde ($p=0,0589$).

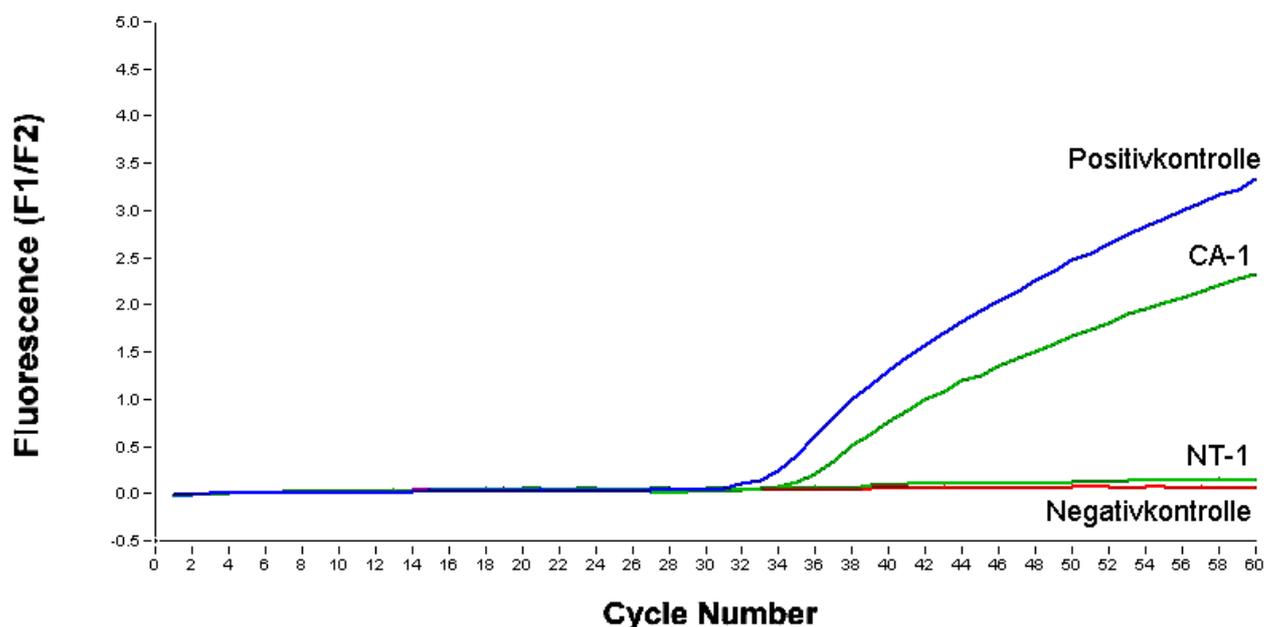


Abb. 5: Fluoreszenzkurven des *APC*-Gens in der Kardia. NT = Normalgewebe, CA = Karzinomgewebe.

4.4 Hypermethylierung von *hMLH1*

Die Hypermethylierung von *hMLH1* wurde in 7 von 50 Adenokarzinomen des Ösophagus (14%), in 14 von 50 Adenokarzinomen der Kardia (28%) und in 16 von 50 (32%) Adenokarzinomen des Magens gefunden. Nur die Differenz zwischen Ösophagus- und Magenkarzinomen erreichte statistische Signifikanz ($p=0.03$). In dem korrespondierenden Normalgewebe konnte eine *hMLH1*-Hypermethylierung nicht entdeckt werden. Die Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter zeigte, dass eine *hMLH1*-Hypermethylierung öfter in niedrigen pT-Kategorien (pT1 / pT2) vorkommt als in höheren pT-Kategorien (pT3 / pT4) und öfter in pN0-Fällen als in Lymphknoten-positiven Fällen ($p=0,003$). Es konnte keine Korrelation zwischen der *hMLH1*-Hypermethylierung und der WHO-Klassifikation, der Lauren Klassifikation und dem Tumorgrading festgestellt werden.

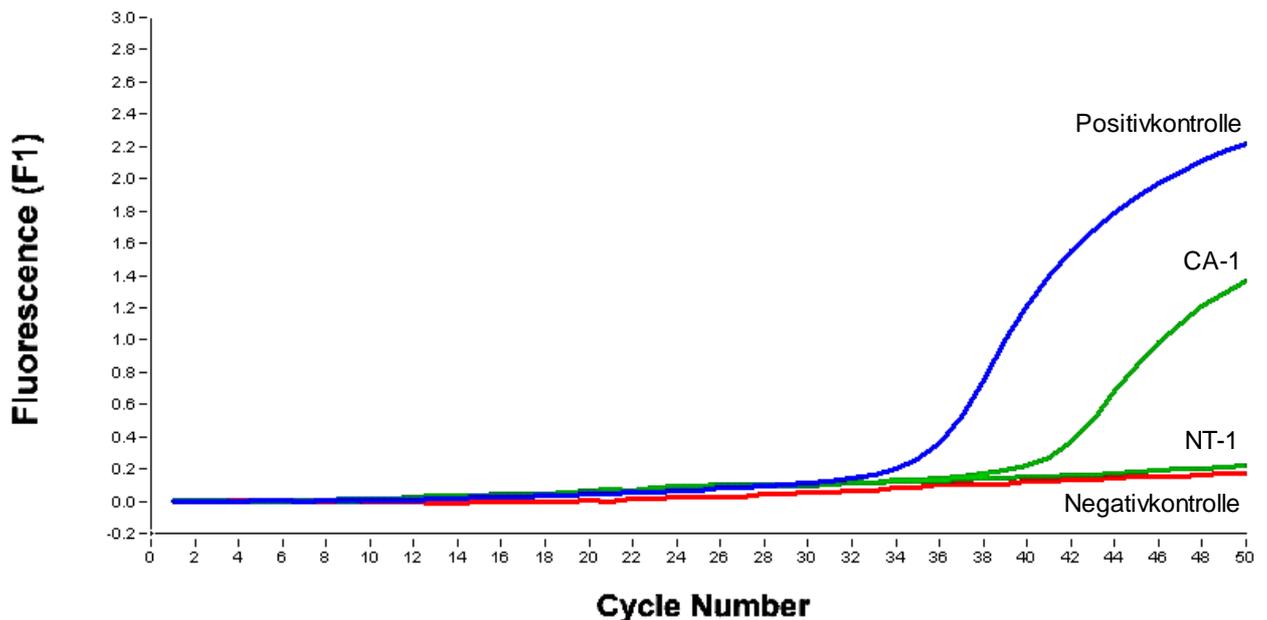


Abb. 6: Fluoreszenzkurven des *hMLH1*-Gens im Ösophagus. NT = Normalgewebe, CA = Karzinomgewebe.

4.5 Expression von *P16*-Protein

Eine nukleäre und/oder zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen in der *P16*-Immunhistochemie wurde als positiv gewertet. Bei den Ösophaguskarzinomen waren 72% vollständig negativ (Kategorie 0), 4% waren schwach positiv (Kategorie I, 5 - 50% positive Zellen) und 24% waren stark positiv (Kategorie II, 51 - 100% positive Zellen). Unter den Adenokarzinomen der Kardia waren 42% in Kategorie 0, 12% in Kategorie I und 46% in Kategorie II. 20% der Adenokarzinome des Magens waren in Kategorie 0, 14% in Kategorie I und 66% in Kategorie II. Unter den nicht-neoplastischen Zellen des Ösophagus und des Magens wurde die Expression von *P16*-Protein in vereinzelt Zellen der Basalschicht und der

benachbarten Schichten des Plattenepithels des Ösophagus und im Drüsenepithel des Fundus, sowie in vereinzelt Lymphozyten gefunden.

4.6 Korrelation zwischen *P16*-Proteinexpression und Genhypermethylierung

Ein kompletter Verlust der *P16*-Proteinexpression (Kategorie 0) war in insgesamt 67 der 150 untersuchten Adenokarzinomen vorhanden. Von diesen 67 Fällen zeigte die Mehrheit von 39 Tumoren (58,2%) eine gleichzeitige Hypermethylierung des *P16* Gens. Im Gegensatz dazu zeigten nur 10 von 83 Fällen, in denen eine *P16*-Proteinexpression vorhanden, war eine begleitende Hypermethylierung des *P16* Gens ($p < 0,0001$).

4.7 Expression von *hMLH1*-Protein

Das vollständige Fehlen einer Reaktivität mit dem verwendeten *hMLH1*-Antikörper wurde bei positiver interner Kontrolle, z.B. durch Entzündungs- oder Stromazellen, als Proteinverlust gewertet. Alle anderen Fälle galten als positiv, wobei nur die nukleäre Reaktivität gewertet wurde. Der Verlust der *hMLH1*-Proteinexpression konnte in keinem Adenokarzinom des Ösophagus festgestellt werden. Bei den Adenokarzinomen der Kardia und des Magens trat der Verlust der *hMLH1*-Proteinexpression in jeweils 5 Fällen (10%) auf.

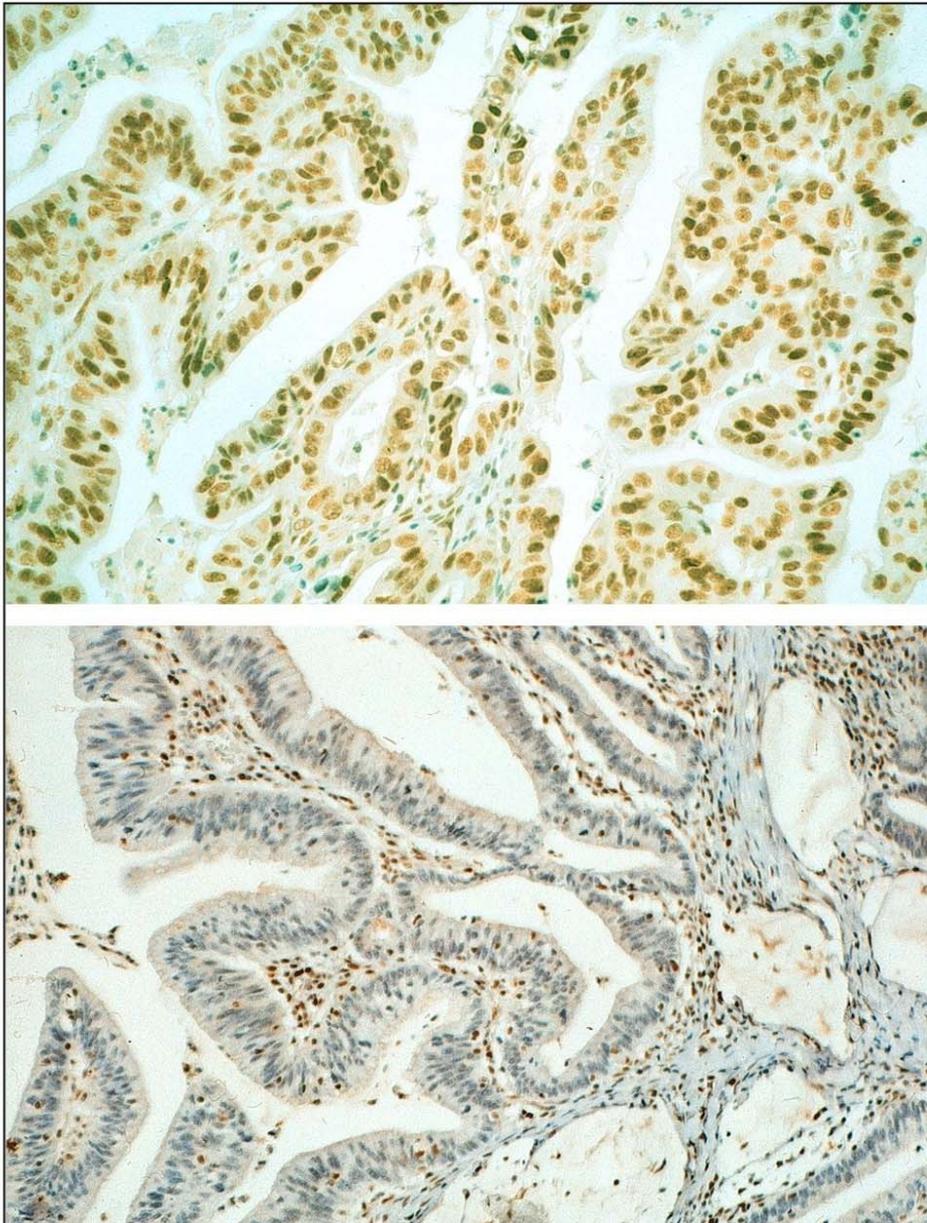


Abb. 7: Oben: *hMLH1*-positives Barrettkarzinom
Unten: *hMLH1*-negatives Magenkarzinom, bei positiver interner
Kontrolle durch Lymphozyten und Fibroblasten

4.8 Korrelation zwischen *hMLH1*-Proteinexpression und Genhypermethylierung

Alle 10 Fälle mit einem Verlust der *hMLH1*-Proteinexpression zeigten eine gleichzeitige *hMLH1*-Hypermethylierung. Dagegen zeigte kein Fall einen Proteinverlust ohne Genhypermethylierung. Jedoch zeigten nur 10 der 37 Karzinome mit Hypermethylierung (27%) einen gleichzeitigen Verlust der *hMLH1*-Proteinexpression.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und 4 zusammengefasst.

Tabelle 3. Frequenz der *APC* und *p14^{ARF}* Genhypermethylierung in Adenokarzinomen (ADC) des Ösophagus, der Kardia und des Magens.

	<i>APC</i>	<i>p14^{ARF}</i>
ADC des Ösophagus (n = 50)	39 (78%)	0
ADC der Kardia (n = 50)	16 (32%)	1 (2%)
ADC des Magens (n = 50)	42 (84%)	5 (10%)

Tabelle 4. Frequenz der $p16^{INK4}$ und $hMLH1$ Genhypermethylierung und Verlust der Proteinexpression in Adenokarzinomen (ADC) des Ösophagus, der Kardia und des Magens.

	$p16^{INK4A}$		$hMLH1$	
	Hypermethylierung n (%)	Verlust der Protein- expression n (%)	Hypermethylierung n (%)	Verlust der Protein- expression n (%)
ADC des Ösophagus (n = 50)	27 (54%)	36 (72%)	7 (14%)	0
ADC der Kardia (n = 50)	18 (36%)	21 (42%)	14 (28%)	5 (10%)
ADC des Magens (n = 50)	5 (10%)	10 (20%)	14 (28%)	5 (10%)

5. Diskussion

Die vorliegende Studie untersucht die Häufigkeit der Genhypermethylierung von *APC*, *P14*, *P16* und *hMLH1* in drei benachbarten Adenokarzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes, dem Ösophagus-, Kardia- und Magenkarzinom. Für jedes getestete Gen lies sich eine Hypermethylierung nachweisen, allerdings in sehr verschiedener Häufigkeit. Dabei war das *APC*-Gen in den verschiedenen Tumortypen am häufigsten (32 - 84%) und das *P14*-Gen am seltensten hypermethyliert (0 - 10%). Ein größerer Anteil der Karzinome war auch im *P16*-Gen (10 - 54%) und *hMLH1*-Gen (14 - 28%) hypermethyliert. Während in vielen anderen Genen (*HIC1* oder *MTHFR*) die Hypermethylierung Ausdruck normaler Zellalterung und -reifung ist (Eads *et al.*, 2001), war in dieser Untersuchung eine Hypermethylierung stets im Tumorgewebe, nicht aber im korrespondierendem Normalgewebe zu finden (abgesehen von zwei Ausnahmen). Daran wird deutlich, dass die Hypermethylierung der von uns untersuchten Gene einen pathologischen, für die Karzinogenese bedeutsamen, Mechanismus darstellt.

Die Geninaktivierung der untersuchten TSG und des DNA-Reparaturgens durch Hypermethylierung repräsentiert einen von mehreren Schritten in der molekularen Tumورprogression. Bislang können keine verlässlichen Angaben darüber gemacht werden, auf welcher Stufe der Karzinogenese die Hypermethylierung der von uns untersuchten Gene auftritt, da die morphologisch definierten Präkanzerosen bislang kaum untersucht wurden. Die spärlichen Daten deuten aber darauf hin, dass die Hypermethylierung von *hMLH1* ein frühes Ereignis in der Karzinogenese

darstellt und daher möglicherweise als Marker für eine maligne Progression verwendet werden kann (Waki *et al.*, 2002), wohingegen die Hypermethylierung von *P16* ein spätes Ereignis in der Karzinogenese darstellt und daher nicht zur frühen Detektion einer malignen Progression geeignet ist (Kang *et al.*, 2001).

Die vorliegende Studie konnte in den drei untersuchten Tumorentitäten Ösophagus-, Kardia- und Magenkarzinom für die untersuchten Gene *APC*, *P14*, *P16* und *hMLH1* ein distinktes Muster der Hypermethylierung zeigen. Die Unterschiede in der Prävalenz der Hypermethylierung erreichen z.T. statistisch signifikante Werte. Diese Ergebnisse sprechen stark dafür, dass auch auf molekularer Ebene drei verschiedene Tumorentitäten vorliegen.

Aber auch innerhalb eines Tumortyps zeigen verschiedene histologische Subtypen ein spezielles Methylierungsmuster auf. So waren in unserem Kollektiv die diffusen Magenkarzinome deutlich seltener *P16*-hypermethyliert als die intestinalen Karzinome nach Lauren. Eine Beobachtung, die von anderen Autoren bestätigt wird und zum Konzept geführt hat, dass dem diffusen und intestinalen Subtyp des Magenkarzinoms verschiedene molekulare Wege zugrunde liegen (Hamilton *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2001). Zusätzlich waren die Siegelringzellkarzinome häufiger *APC*-hypermethyliert als die anderen Typen des Adenokarzinoms.

Auch bei anderen Tumorentitäten findet sich eine Korrelation zwischen Hypermethylierung und histologischem Subtyp: Beim Bronchialkarzinom ist *P16* häufiger in Plattenepithelkarzinomen als bei anderen nicht-kleinzelligen Karzinomen hypermethyliert (Kim *et al.*, 2001) und das DAP-Kinasegen häufiger

im invasiv-lobulären Subtyp des Mammakarzinoms als im invasiv-duktalem Subtyp (Lehmann *et al.*, 2002).

Um die Konsequenzen der Genhypermethylierung für die Proteinexpression zu untersuchen, haben wir in allen Tumoren die Proteinexpression von *P16* und *hMLH1* immunhistologisch untersucht. Die Expression von *P14* und *APC* wurde nicht untersucht, da hierfür derzeit keine Antikörper kommerziell erhältlich sind. Sowohl bei *P16* als auch bei *hMLH1* fand sich eine starke Korrelation zwischen Genhypermethylierung und Proteinverlust. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Genhypermethylierung funktionell eine wichtige Ursache für einen Proteinexpressionsverlust sein kann.

Allerdings konnten wir sowohl unmethylierte Karzinome mit Proteinverlust, als auch hypermethylierte Tumore mit erhaltener Proteinexpression von *P16* beobachten. Ersteres kann durch alternative Geninaktivierung mit Proteinverlust erklärt werden, z.B. homozygote Deletion oder Überexpression inhibierender Faktoren (Tokugawa *et al.*, 2002). Der erhaltenen Proteinexpression bei Genhypermethylierung könnte eine Hemimethylierung zugrunde liegen. Da hier ein Allel hypermethyliert ist, bleibt die Proteinexpression wegen des noch aktiven Allels erhalten (Mompalmer *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002).

Interessanterweise wiesen die *hMLH1*-hypermethylierten bzw. proteinnegativen Tumoren signifikant häufiger niedrigere pT- und pN- Kategorien auf als nicht methylierte Tumoren. In anderen Arbeiten, die zu ähnlichen Ergebnissen kommen, fand sich eine starke Korrelation mit der Mikrosatelliteninstabilität (Leung *et al.*,

1999). Diese Ergebnisse haben zum Konzept geführt, dass mikrosatelliteninstabile Tumore eine eigene Entität mit distinkter molekularer Karzinogenese bilden.

6. Zusammenfassung

Titel: Hypermethylierung der Tumorsuppressorgene *P16*, *P14*, *APC* und *hMLH1* in Adenokarzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes

Doktorand: Erol Iskender

Die Hypermethylierung von Promotern ist ein bedeutender Mechanismus bei der Entstehung von Tumoren. In der hier vorgestellten Untersuchung haben wir die Hypermethylierung der Tumorsuppressorgene *P16*, *P14*, *APC* und des DNA-Reparaturgens *hMLH1* in 150 Adenokarzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes untersucht. Dabei wurden 50 Barrett-assoziierte Adenokarzinome des Ösophagus, 50 Adenokarzinome der Kardia und 50 Adenokarzinome des Magens mit Hilfe der methylierungsspezifischen real-time PCR auf das Vorhandensein von Hypermethylierungen in den jeweiligen Tumorsuppressorgenen untersucht. Zusätzlich wurde die Expression des *P16*-Proteins und des *hMLH1*-Proteins immunhistochemisch bestimmt. In den untersuchten Adenokarzinomen des Ösophagus, der Kardia und des Magens wurde eine Hypermethylierung im *APC*-Gen (78% / 32% / 84%), im *P16*-Gen (54% / 36% / 10%) und im *hMLH1*-Gen (14% / 28% / 32%) in z.T. signifikant unterschiedlicher Häufigkeit detektiert. Dagegen war eine Hypermethylierung von *P14* in Ösophaguskarzinomen gar nicht und in Kardia- bzw. Magenkarzinomen selten zu finden (2% bzw. 10%). Ein vollständiger Verlust der *P16*-Proteinexpression wurde in 45% aller Tumore detektiert und war signifikant mit der Hypermethylierung des *P16*-Gens korreliert ($p < 0.0001$, χ^2 Test). Auch der *hMLH1*-Proteinverlust, der in jeweils 10% Kardia- und Magenkarzinome vorlag, war bei den hypermethylierten Tumoren signifikant häufiger.

Somit stellt die Hypermethylierung von *P16*, *APC* und *hMLH1* ein häufiges und tumorspezifisches Ereignis in Adenokarzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes da, wobei deutliche Unterschiede zwischen den Tumortypen evident sind. Die Hypermethylierung von *P16* und *hMLH1* führt häufig zu einer Geninaktivierung mit Proteinverlust.

7. Literatur

Barrett NR (1950) Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'. Br J Surg 38:175-182

Baylin S, Bestor TH (2002) Altered methylation patterns in cancer cell genomes: cause or consequence? Cancer Cell 1:299-305

Bodmer WF (1987) Localization of the gene familial adenomatous polyposis on chromosome 5. Nature 328:614-616

Correa P, Fontham ET, Bravo JC, Bravo LE, Ruiz B, Zarama G, Realpe JL, Malcom GT, Li D, Johnson WD, Mera R (2000) Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-helicobacter pylori therapy. 92:1881-1888

DePinho RA, Jacks T (2001) The laboratory mouse in cancer research. Semin Cancer Biol 11:175-176

Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF (1998) Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. Cancer 83:2049-2053

Dolan K, Sutton R, Walker S J, Morris A I, Campbell F, Williams EM (1999) New classification of esophageal and gastric carcinomas derived from changing patterns in epidemiology. Br J Cancer 80:834-842

Duro D, Bernard O, Della Valle V, Berger R, Larsen CJ (1995) A new type of *P16* gene transcript expressed in B-cell malignancies. Oncogene 11:11-29

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg DV, Laird PW (2000) MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Res 28:E32

Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, Peters JH, DeMeester SR, DeMeester TR, Skinner KA, Laird PW (2001) Epigenetic patterns in the progression of oesophageal adenocarcinoma. Cancer Res 61:3410-3418.

El-Rifai W, Frierson HF, Moskaluk CA, Harper JC, Petroni GR, Bissonette EA, Jones DR, Knuutila S, Powell SM (2001) Genetic differences between adenocarcinomas arising in Barrett's esophagus and gastric mucosa. Gastroenterology 121:592-598

Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. Oncogene 62:4519-4524

Esteller M (2000) Analysis of adenomatous polyposis coli promotor hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 60:4366-4371

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2002) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61:3225-3229

Esteller M, Sparks A, Toyotam M, Sanchez-Cespedes M, Capellam G, Peinado M, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB, Herman JG (2000) Analysis of Adenomatous Polyposis Coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 60:4366-4371

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, 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

Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ (1999) Hypermethylation of the *hMLH1* gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 59:1090-1095

Haggitt RC (1994) Barrett's esophagus, dysplasia, and adenocarcinoma. *Hum Pathol* 25:982-993

Hakem R, Mak TW (2001) Animals models of tumor-suppressor gene. Annu Rev Genet 35:209-241

Hamilton SR, L.A. Aaltonen (eds) (2000) Pathology and Genetics of the tumours of the digestive system. World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC Press

Herman JG (1999) Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. Semin cancer Biol 9:359-367

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci 93:9821-9826

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Bio/Technology 10:413-417

Hohenberger P, Gretschel S (2003) Gastric Cancer. The Lancet 362:305-315

Horii A, Nakatsuru S, Ichii S, Nagase H, Nakamura Y (1993) Multiple forms of the APC gene transcript and their tissue-specific expression. Hum Mol Genet 2:283-287

Huang LH, Wang R, Gama-Sosa MA, Shenoy S, Ehrlich M (1984) A protein from human placental nuclei binds preferentially to 5-methylcytosine-rich DNA. *Nature* 308 (5956):293-295

Iguchi-Arigo SMM, Schaffner W (1989) CpG methylation of the cAMP responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcription activation. *Genes Dev* 3:612–619

Iida S, Akiyama Y, Nakajima T, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K, Yuasa Y (2000) Alterations and hypermethylation of the *P14* gene in gastric cancer. *Int J Cancer* 87:654-658

Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, Kerr D, Young LS (1999) Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Path* 154:965-973

Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetics in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415-428

Jost JP, Hofsteenge J (1992) The repressor MDBP-2 is a member of the histone H1 family that binds preferentially in vitro and in vivo to methylated nonspecific DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci* 89:9499-9503,

Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R (1997) Methylation of the *hMLH1* promoter correlates with lack of expression of *hMLH1* in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57:808-811

Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG (2001) CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 61:2847-2851

Kass SU, Pruss D, Wolffe AP (1997) How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 13:444–449

Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ, Yin J, Fleisher AS, Abraham JM, Beer DG, Sidransky D, Huss HT, Demeester TR, Eads C, Laird PW, Ilson DH, Kelsen DP, Harpole D, Moore MB, Danenberg KD, Danenberg PV, Meltzer SJ (2000) Hypermethylated *APC* DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 92:1805-1811

Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Zheng S, Christiani DC, Wain JC, Mark EJ, Kelsey KT (2001) *P16* (INK4A) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 61:3419-3424

Knudson AG (2001) Two genetics hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1:157-162

Kranenbarg EK, van de Velde CJ (1998) Gastric cancer in the elderly. *Eur J Surg Oncol* 24:384-390

Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, Schweizer P, Aaltonen LA, de La Chapelle A, Nystrom-Lahti M, Peltomaki P (1999) Epigenetic phenotypes distinguish microsatellite-stable and -unstable colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci* 96:12661-12666

Laird PW, Jaenisch R (1996) The role of the DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet* 30:441-464

Lambertz S, Ballhausen WG (1993) Identification of an alternative 5' untranslated region of the adenomatous polyposis coli gene. *Hum Genet* 90:650-652

Lauren P (1965) The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Path Microbiol Immunol Scand* 64:31-49

La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Gentile A (1992) Family history and risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer* 70:50-55

Lehmann U, Celikkaya G, Hasemeier B, Langer F, Kreipe H (2002) Promoter hypermethylation of the Death-associated Protein Kinase gene in breast cancer is associated with the invasive lobular subtype. *Cancer Res* 62:6634-6638

Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC (1999) *hMLH1* promoter methylation and lack of *hMLH1* expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 59:159-164

Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, Sidransky D (1995) A novel *P16* transcript. *Cancer Res* 55:2995-2997

Modrich P, Lahue R (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 65:101-133

Momparler RL, Bovenzi V (2000) DNA Methylation and cancer. *J Cell Physiol* 183:145-154

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350

Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. (1994) Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263:1625-1629

Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA (1997) Cancer statistics. *Cancer J Clin* 47:5-27

Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, Esteller M (2003) A systemic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res* 63:1114-1121

Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J (1999) Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 83:18-29

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler W (1992) *APC* mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359:235-237

Quello DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ (1995) Alternative reading frames of the *INK4a* tumor suppressor gene encodes two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83:993-1000

Reidhaar-Olson JF, Hammer J (2001) The impact of genomics tools on target discovery. *J Cell Biochem Suppl* 37:110-119

Sager R (1989) Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science* 246:1406-1412

Schwarz S, Hess D, Jost JP (1997) The methylated DNA binding protein-2-H1 (MDBP-2-H1) consists of histone H1 subtypes which are truncated at the C-terminus. *Nucleic Acids Research* 25:24 5052-5056

Sherr CJ (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79:551:555

Siewert JR, Stein HJ (1998). Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br J Surg* 85:1457-1459

Sobin LH, Wittekind C, eds. (2002) TNM classification of malignant tumours, 6th ed. New York: Wiley-Liss

Spechler SJ, Goyal RK (1986) Barrett's esophagus. *N Engl J Med* 315:362-371

Stocks SC, Pratt N, Sales M, Johnston DA, Thompson AM, Carey FA, Kernohan NM (2001) Chromosomal imbalances in gastric and esophageal adenocarcinoma: specific comparative genomic hybridization-detected abnormalities segregate with junctional adenocarcinomas. *Genes, Chromosomes and Cancer* 32:50-58

Tajima Y, Nakanishi Y, Yoshino T, Kokawa A, Kusano M, Shimoda T (2001) Clinicopathological study of early adenocarcinoma of the gastric cardia: comparison with early adenocarcinoma of the distal stomach and esophagus. *Oncology* 61:1-9

Talley NJ, Zinsmeister AR, Schleck CD, Melton LJ 3rd. (1992) Dyspepsia and dyspepsia subgroups: a population-based study. *Gastroenterology* 102:1259-1268

Taniere P, Martel-Planche G, Maurici D, Lombard-Bohas C, Scoazec JY, Montesano R, Berger F, Hainaut P (2001) Molecular and clinical differences between adenocarcinomas of the esophagus and the gastric cardia. *Am J Pathol* 158:145-154

Tate PH, Bird AP (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3:226–231.

Terry MB, Gaudet MM, Gammon MD (2002) The epidemiology of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol* 12:111-127

Thliveris A (1996) Long-range physical map and deletion characterization of the 1100-kb NotI restriction fragment harboring the *APC* gene. *Genomics* 34:268-270

To KF, Leung WK, Lee TL, Yu J, Tong JHM, Chan MWY, Ng EKW, Chung SCS, Sung JJY (2002) Promoter hypermethylation of tumor-related genes in gastric intestinal metaplasia of patients with and without gastric cancer. *Int J Cancer* 102:623-628

Tokugawa T, Sugihara H, Tani T, Hattori T (2002) Modes of silencing *P16* in development of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 62:4938-4944

Tsuchiya T (2000) Distinct methylation patterns of two *APC* gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. *Oncogene* 19:3642-3646

Waki T, Tamura G, Tsuchiya T, Sato K, Nishizuka S, Motoyama T (2002) Promoter methylation status of *E-cadherin*, *hMLH1*, and *P16* genes in nonneoplastic gastric epithelia. *Am J Pathol* 161:399-403

Wayman J, Forman D, Griffin SM (2001) Monitoring the changing pattern of esophago-gastric cancer: data from a UK regional cancer register. *Cancer Causes Control* 12:943-949

Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330

Werner M, Becker KF, Keller G, Hofler H (2001) Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. J Cancer Res Clin Oncol 127:207-216

Wijnhoven BP, Siersema PD, Hop WCJ, van Dekken H, Tilanus HW (1999) Adenocarcinomas of the distal esophagus and gastric cardia are one clinical entity. Br J of Surg 86:529-535

Wilfingseder D, Stoiber H (2002) Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch real-time PCR-Verfahren. Antibiotika Monitor Heft 1/2/2002

Winters C Jr, Spurling TJ, Chobanian SJ, Curtis DJ, Esposito RL, Hacker JF 3rd, Johnson DA, Cruess DF, Cotelingam JD, Gurney MS, et al. (1987) Barrett's esophagus. A prevalent, occult complication of gastroesophageal reflux disease. Gastroenterology 92:118-124

Wong MH, Hermiston ML, Syder AJ, Gordon JI (1996) Forced expression of the tumor suppressor adenomatosis polyposis coli protein induces disordered cell migration in the intestinal epithelium. Cell Biology 93:9588-9593

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough W (1998) ARF promotes mdm2 degradation and stabilizes P53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and P53 tumor suppression pathways. Cell 92:725-734

8. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Erol Iskender
Geburtsdatum: 01.06.1979
Geburtsort: Solingen
Adresse: Argonner Weg 12
42659 Solingen
Telefon: 0211 / 9723136
0176 / 23218812
E-Mail: iskendee@uni-duesseldorf.de
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang:

1985 - 1989 Grundschule Kreuzweg in Solingen
1989 - 1998 Gesamtschule Solingen,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10 / 1998 - 11 / 2004 Humanmedizin Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
08 / 2000 Ärztliche Vorprüfung
08 / 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08 / 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11 / 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Studiumbegleitende Tätigkeiten:

- *Famulaturen:*

19.02.2001 - 20.03.2001 Unfallchirurgie, Klinikum Solingen
21.03.2001 - 04.04.2001 Anästhesie, Klinikum Solingen
05.08.2002 - 03.09.2002 Pathologie, Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
09.09.2002 - 08.10.2002 Kinderheilkunde, Klinikum Solingen
03.03.2003 - 17.03.2003 Kinderheilkunde, Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

- *Praktisches Jahr:*

13.10.2003 - 30.01.2004 Kinderheilkunde: University of Malta, Medical School
02.02.2004 - 21.05.2004 Chirurgie: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
24.05.2004 - 10.09.2004 Innere Medizin: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Promotion:

09 / 2001 - 08 / 2005 Institut für Pathologie der HHU Düsseldorf
Univ.-Prof. Dr. Helmut Erich Gabbert

Titel: Hypermethylierung der Tumorsuppressorgene *P14*, *P16*, *APC* und des DNA-Reparaturgens *hMLH1* in Adenokarzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes
Doktorvater: Univ.-Prof. Dr. Mario Sarbia

Publikationen:

- *International Journal of Cancer:*

06 / 2004 Geddert H, Kiel S, Iskender E, Florl AR, Krieg T, S, Gabbert HE, Sarbia M.
Correlation of *hMLH1* and *HPP1* hypermethylation in gastric, but not in esophageal and cardiac adenocarcinoma

- *International Journal of Cancer:*

08 / 2004 Sarbia M, Geddert H, Klump B, Kiel S, Iskender E, Gabbert HE.
Hypermethylation of tumor suppressor genes (*P16(INK4A)*, *P14(ARF)* and *APC*) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract

Beruflicher Werdegang:

Seit 02 / 2005 Assistenzarzt der Inneren Medizin im Krankenhaus Neuwerk in Mönchengladbach

9. Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Hypermethylierung der Tumorsuppressorgene *P14*, *P16*, *APC* und des DNA-Reparaturgens *hMLH1* in Adenokarzinomen des oberen Gastrointestinaltraktes

im Institut der Pathologie unter der Leitung von Professor Dr. Mario Sarbia

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

10. Danksagung

Einzig Elhamdulillah.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. E. Gabbert für die freundliche Aufnahme im Institut für Pathologie.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Mario Sarbia für die Überlassung des Themas, seine intensive Betreuung und sein persönliches Engagement.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. H. Geddert, Frau H. Huss, Frau C. Pawlik und Prof. Schulz für die große Hilfe, die ich in den Jahren meiner Arbeit erfahren habe.

Ich danke Dir, Laetitia, in ewiger Liebe für die einzigartige Unterstützung, die ich durch Dich erhalten habe.