

Aus dem Institut für Pathologie und Funktionsbereich Cytopathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Erich Gabbert

**Auftreten und Heterogenität von *TP53*-  
Mutationen (Exons 5 bis 8) in Magenkarzinomen  
und korrespondierenden Metastasen**

Dissertation

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

vorgelegt von

**Daniela Mones**

(2016)

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stephan E. Baldus

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein

**„What we believe today will surely be modified, and this central gene and its protein, its sisters and its ancestors will continue to teach us, challenge us and perplex us well into 2019.“**

Arnold J. Levine and Moshe Oren

---

1	EINLEITUNG	1
1.1	Magenkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologische Daten	1
1.1.2	Risikofaktoren	4
1.1.3	Klinik	7
1.1.4	Diagnostik und Staging	8
1.1.5	Einteilung und Klassifikation	10
1.1.6	Therapie	13
1.1.7	Prognose	16
1.2	TP53	17
1.2.1	Aufbau	18
1.2.2	Funktion, Regulation und Signalkaskade: TP 53 und Krebsentstehung	20
1.2.3	Ausblick: TP53 und Krebstherapie	23
1.3	Mutationsheterogenität in Karzinomen	25
1.4	Fragestellung und Ziele der Arbeit	28
2	MATERIAL UND METHODEN	30
2.1	Methoden	30
2.1.1	DNA-Gewinnung	30
2.1.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	31
2.1.3	Vervielfältigung der DNA mit der Polymerasekettenreaktion	31
2.1.4	Gelelektrophorese	33
2.1.5	Aufreinigung der DNA	36
2.1.6	Sequenzierung der DNA	36
2.1.7	Statistische Auswertung	39
2.2	Material	39
2.2.1	Chemikalien	39
2.2.2	Rezepturen	40
2.2.3	Geräte	40
2.2.4	Kits	41
2.2.5	Verbrauchsmaterialien	41
2.2.6	Programme und Datenbanken	42
2.2.6.1	Programme	42
2.2.6.2	Datenbanken	42
2.2.7	Primer	42
2.3	Patientenkollektiv	43
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Mutationsrate	46

---

3.2 Mutationsspektrum	46
3.3 Heterogenität der <i>TP53</i> -Mutationen	48
3.3.1 Intratumorale Heterogenität	48
3.3.2 Intertumorale Heterogenität	49
3.3.2.1 Primärtumor vs. Lymphknoten	49
3.3.2.2 Primärtumor vs. Fernmetastasen	51
3.4. Korrelation von Mutationsrate und genetischer Heterogenität mit histopathologischen Parametern	52
3.4.1 Korrelation mit dem TNM-Stadium	52
3.4.2 Korrelation mit dem Grading	56
3.4.3 Korrelation mit dem Stadium nach AJCC	57
3.4.4 Korrelation mit dem Subtyp nach Laurén	59
3.4.5 Korrelation mit der WHO-Klassifikation	61
4 DISKUSSION	63
4.1 Intratumorale Heterogenität von <i>TP53</i> -Mutationen	63
4.2 Intertumorale Heterogenität von <i>TP53</i> -Mutationen	65
4.3 Mutationsheterogenität von <i>TP53</i> und Karzinogenese des Magenkarzinoms	66
4.4 Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern	68
5 ZUSAMMENFASSUNG	70
6 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	72
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	84
8 DANKSAGUNG	86
9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	87

## **1 EINLEITUNG**

### **1.1 Magenkarzinom**

70 % aller malignen Tumore des Körpers sind Adenokarzinome, die von Drüsengewebe ausgehen (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2012). Dazu zählt auch das Magenkarzinom, welches im Drüsengewebe der Mucosa entsteht.

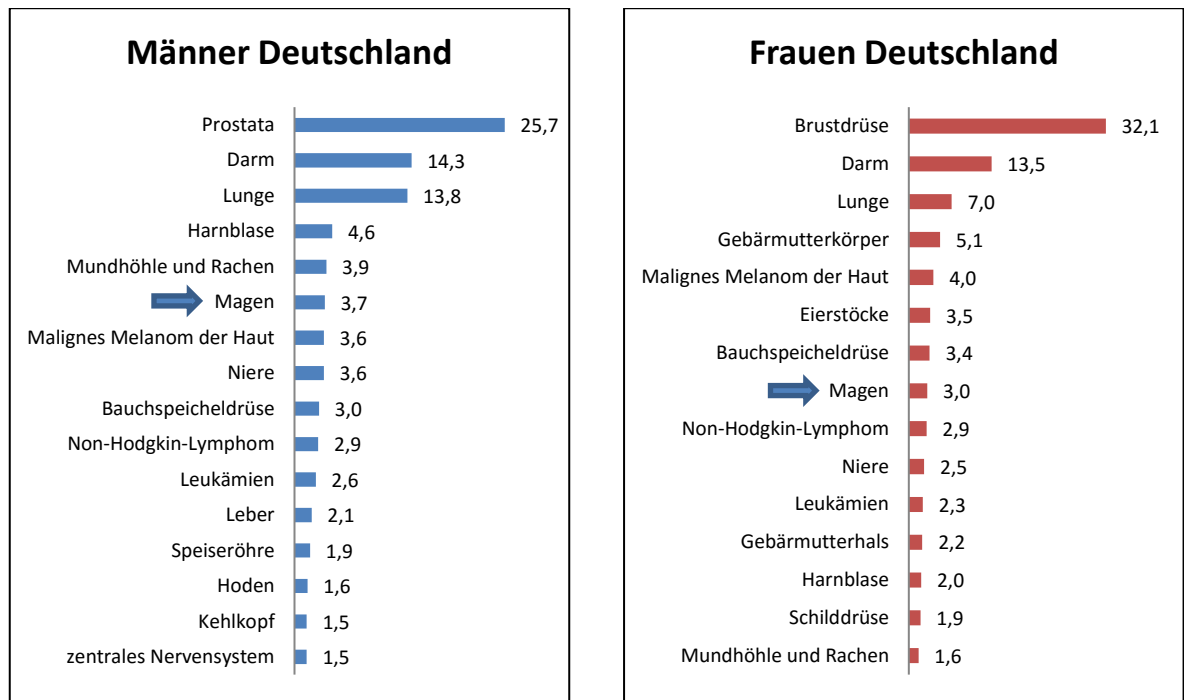
#### **1.1.1 Epidemiologische Daten**

Die Anzahl der Krebserkrankungen nimmt in Deutschland zu. Laut einer Prognose erkrankten 2012 258.000 Männer und 228.200 Frauen neu an Krebs (unberücksichtigt Hautkrebsformen außer dem Malignen Melanom), für die Jahre von 1980 bis 2006 entspricht das einer Steigerung von 35 % für Frauen bzw. 80 % für Männer.

Das Magenkarzinom bildet dabei eine Ausnahme: Seit mehreren Jahrzehnten sinkt in Deutschland sowohl die Inzidenz als auch die Anzahl an Menschen, die an einem Magenkarzinom verstorben (11.107 Neuerkrankungen bei den Männern bzw. 9.865 Neuerkrankungen bei den Frauen in Jahr 2000 gegenüber voraussichtlich 9.100 [Männer] und 6.200 [Frauen] Neuerkrankungen 2012) (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2012), (Schön et al., 2004). Betrachtet man die häufigsten Tumorlokalisationen, steht das Magenkarzinom 2008 bei den Männern mit 3,7 % an allen Tumorerkrankungen (wiederum ausgenommen nicht-melanotischer Hautkrebs) an sechster Stelle, führend sind hier Prostata-, Lungen- und Darmkrebs. Bei den Frauen findet sich das Magenkarzinom sogar nur an achter Position (3,0 % aller Krebserkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs), auf den ersten Rängen liegen Brust-, Darm- und Lungenkrebs (siehe Abbildung 1.1). Männer erkranken dabei durchschnittlich mit 71 Jahren, Frauen dagegen erst mit 76 Jahren; das Magenkarzinom ist also eindeutig eine Erkrankung des älteren Menschen.

Die meisten Magenkarzinome werden im Stadium T2 oder T3 diagnostiziert, frühe Formen werden eher selten entdeckt. Dementsprechend schlecht ist die Prognose im

Gegensatz zu vielen anderen Krebserkrankungen: Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag 2007/2008 nur bei ca. 30 % für beide Geschlechter (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2012), (Robert Koch-Institut (Hrsg.), 2010).

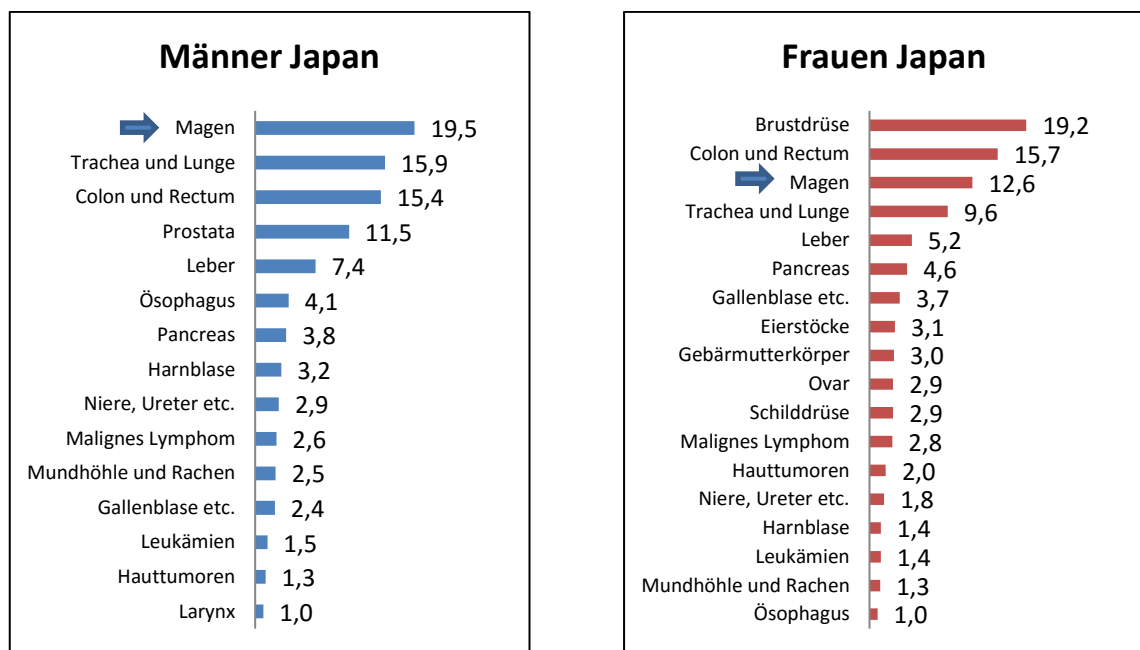


**Abbildung 1.1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen von Männern und Frauen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008 (ausgenommen nicht-melanotischer Hautkrebs). Das Magenkarzinom steht bei Männern an der sechsten und bei Frauen an der achten Position [modifiziert nach (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2012)].**

In anderen Ländern variieren diese Zahlen deutlich: Insgesamt gab es 2008 schätzungsweise nahezu eine Million Neuerkrankungen weltweit. Damit ist das Magenkarzinom mit einem Anteil von 7,8 % die vierthäufigste Krebserkrankung der Welt und die zweithäufigste Todesursache unter den verschiedenen malignen Tumoren. Über 70 % entstehen dabei in Entwicklungsländern, vor allem in Ostasien (Mendonça Guimaraes and Drumond Muzi, 2012), (Zilberstein et al., 2012).

Länder und Regionen mit einer zum Teil deutlich höheren Inzidenz als in Deutschland und Zentraleuropa, sowie Nordamerika und großer Teile Afrikas sind Japan, China, Osteuropa und Teile Südamerikas wie zum Beispiel Brasilien (Bertuccio et al., 2009), (Chen et al., 2013), (Matsuda et al., 2013), (Zilberstein et al., 2012), (Plummer et al., 2004).

Besonders Japan zeigt eine deutlich höhere Inzidenz mit 128,7 Neuerkrankungen pro 100.000 bei den Männern und immerhin 56,7 Neuerkrankungen pro 100.000 bei den Frauen im Jahr 2007. Hier liegt das Magenkarzinom bei den Männern sogar an erster Stelle der häufigsten Tumorlokalisationen und bei den Frauen noch an dritter Stelle (siehe Abbildung 1.2) (Matsuda et al., 2013). Auch in China ist das Magenkarzinom 2009 als zweithäufigste Krebsart im Land für beide Geschlechter zusammen erfasst worden (Chen et al., 2013).



**Abbildung 1.2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen von Männern und Frauen an allen Krebsneuerkrankungen in Japan 2007. Bei Männern ist das Magenkarzinom eindeutig die häufigste Tumorlokalisation, bei Frauen ist es an dritter Stelle zu finden [modifiziert nach (Matsuda et al., 2013)].**

Insgesamt gesehen nimmt die Inzidenz von Magenkarzinomen jedoch ab, wenn auch in den Hochrisikogebieten von einem sehr hohen Level und nicht in einem solchen Umfang wie in Ländern mit niedriger Inzidenz (Plummer et al., 2004), (Zilberstein et al., 2012), (Bertuccio et al., 2009).

Ausgenommen von dieser Entwicklung bleibt dabei das Cardiakarzinom. Dieses ist definitionsgemäß neben dem aus einem Barrett-Ösophagus entstandenen Adenokarzinom des Ösophagus und dem Adenokarzinom distal der Cardia, das aber den ösophagogastralen Übergang infiltriert, den Adenokarzinomen des



ösophagogastralen Übergangs zuzurechnen und nimmt in seiner Inzidenz stark zu (Plummer et al., 2004), (Bettag et al., 2010), (Devesa and Fraumeni Jr., 1999).

### 1.1.2 Risikofaktoren

Das Magenkarzinom hat eine multifaktorielle Genese mit exogenen und größtenteils unbekanntem endogenen Faktoren (Zilberstein et al., 2012). Teilaspekte der exogenen Faktoren sind bisher sehr gut untersucht, so dass eine relativ große Anzahl an Risikofaktoren bekannt ist, dennoch erkranken auch Menschen, die keinen dieser Faktoren aufzuweisen haben (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2012).

Bekanntester Risikofaktor ist die Infektion mit dem gramnegativen Bakterium *Helicobacter pylori*, welches vor allem den Magen und das Duodenum besiedelt. Nach Schätzungen ist ca. die Hälfte der Weltbevölkerung infiziert, ohne dass der genaue Übertragungsweg von Mensch zu Mensch geklärt ist. Die Inzidenz erhöht sich mit zunehmendem Lebensalter um ca. ein Prozent pro Lebensjahr in den Industrienationen, wobei das Bakterium ohne eine Eradikation lebenslanglich persistiert. In Deutschland sind ungefähr acht Prozent der sieben- bis neunjährigen Kinder und 24 % aller männlichen Erwachsenen über 35 Jahren infiziert (Brenner et al., 2006).

Zudem findet sich in allen Ländern eine starke Korrelation mit dem sozioökonomischen Status: Niedriger sozioökonomischer Status bedeutet eine hohe Inzidenz an *H. pylori*-positiven Menschen, hoher sozioökonomischer Status vergleichsweise niedrige Inzidenzen (aktuelles Beispiel für Südamerika in (Porrás et al., 2013)). Dieser Zusammenhang gilt insbesondere für die Kindheit, in der die Übertragung am häufigsten stattfindet.

Eine Infektion mit *H. pylori* verursacht in bestimmten Bevölkerungsgruppen chronische Gastritis sowie Magen- und Duodenalulcera und in der Folge Magenkarzinome. Diese Veränderungen sind zum Teil auch in Tierversuchen nachweisbar; so verursacht *H. pylori* in der Magenschleimhaut mongolischer Rennmäuse chronisch-atrophische Gastritis, Ulcera, intestinale Metaplasien und auch Adenokarzinome des Magens (Tatematsu et al., 2003), (Fujioka et al., 2000), (Watanabe et al., 1998). Mit *H. pylori* infizierte Menschen haben dabei gegenüber nicht infizierten ein um den Faktor zwei bis drei erhöhtes Risiko, an einem Magenkarzinom zu erkranken, weshalb die WHO *H. pylori* 1994 als Karzinogen eingestuft hat. Es gibt keine Korrelation zwischen einer

Infektion mit *H. pylori* und den unterschiedlichen Typen des Magenkarzinoms; intestinaler und diffuser Typ sind in ähnlichem Maße vorhanden (Fischbach et al., 2009).

*H. pylori* weist dabei bestimmte Eigenschaften auf, deren Gemeinsamkeit in einer erhöhten Entzündungsreaktion der Magenschleimhaut liegen. Dazu gehören verschiedene Oberflächenproteine der Hop- (*Helicobacter outer membrane porin*) und Hor- (*Hop related protein*) Gruppe (zum Beispiel BabA und OipA), deren Rolle im Entzündungsprozess noch nicht gut verstanden ist und das Cytotoxin-assoziierte Antigen CagA, welches das proinflammatorische Interleukin 8 aktiviert (Odenbreit et al., 2009). Ein weiterer Faktor ist das vakuolisierende Zytotoxin VacA, dessen Gen eine große Allel-Heterogenität zeigt. Es konnte gezeigt werden, dass nur bestimmte Genotypen mit Inflammation und somit erhöhtem Magenkarzinom-Risiko in Verbindung gebracht werden können (Han et al., 1999). Derzeit werden diese Virulenzfaktoren des Bakteriums noch nicht routinemäßig untersucht, dennoch könnte hier in der Zukunft eine Möglichkeit der Prävention des Magenkarzinoms liegen (Fischbach et al., 2009).

Zur Zeit wird grundsätzlich eine *H. pylori*-Eradikation angestrebt, da sie wirksam die Entstehung von Magenkarzinomen verhindert. Dies gilt vor allem dann, wenn die Eradikation in einem frühen Infektionsstadium erfolgt, also noch keine morphologischen Veränderungen der Magenschleimhaut stattgefunden haben (Wong et al., 2004). Üblicherweise wird die Eradikation mit einer sogenannten Triple-Therapie, bestehend aus einem Protonenpumpeninhibitor und zwei Antibiotika, welche für eine Woche verabreicht werden, durchgeführt. Die Rezidivrate liegt dabei nach einer Eradikationstherapie bei ein bis sechs Prozent pro Jahr in den Industrienationen (Wheeldon et al., 2005).

Zusammenfassend ist *H. pylori* somit der wichtigste und häufigste Risikofaktor für das Magenkarzinom.

Weitere Risikofaktoren betreffen die Ernährung: salzhaltige Nahrung verstärkt das Risiko, ein Magenkarzinom zu entwickeln, eine Ernährung mit viel Obst und Gemüse und den darin enthaltenen antioxidativen Vitaminen A, C und E senkt das Risiko (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2012), (Zilberstein et al., 2012), (Plummer et al., 2004).

Rauchen und Alkohol begünstigen die Ausbildung einer chronisch-atrophischen Gastritis und von Ulcera, so dass auch sie die Entstehung eines Magenkarzinoms fördern (Plummer et al., 2004), (Robert Koch-Institut (Hrsg.), 2010).

Auch ein niedriger sozioökonomischer Status ist mit einem höheren Risiko verbunden an einem Magenkarzinom zu erkranken, dies ist am ehesten durch die Kumulation von Risikofaktoren wie schlechter Ernährung und mangelnder Hygiene in dieser Bevölkerungsgruppe zu erklären (Plummer et al., 2004).

Patienten mit einem Magenkarzinom haben überproportional häufig die Blutgruppe A, so dass auch dies als ein Risikofaktor angesehen werden muss (Aird and Bentall, 1953), (Zilberstein et al., 2012).

Familiäre Häufung von Magenkarzinomen kommt vor, ist aber mit ein bis drei Prozent aller Fälle selten. Häufig ist der auslösende Defekt nicht bekannt; am weitesten erforscht ist das hereditäre diffuse Magenkarzinom (HDGC) (Oliveira et al., 2009b). Genetische Grundlage ist eine Keimbahnmutation im E-Cadherin-Gen *CDH1*; die Vererbung erfolgt autosomal-dominant (Guilford et al., 1997). Am häufigsten treten dabei Punktmutationen auf, seltener sind Deletionen, wobei keine *hot spots* bekannt sind (Oliveira et al., 2009a). In nahezu allen Fällen tritt dieser Tumor als Siegelringzellkarzinom auf, welches in asymptomatischen Genträgern zu 96 % als T1a-Karzinom mit multipler Verteilung in der gesamten Magenschleimhaut zu finden ist. Dabei ist keine Häufung in einer bestimmten anatomischen Region des Magens zu finden, vielmehr ist ein diffuses Auftreten mehrerer oft unter 1mm großer Foci in mehreren Regionen typisch für das HDGC. Das Erkrankungsalter ist sehr variabel, liegt aber im Durchschnitt wie bei den meisten hereditären Erkrankungen weit unter dem des sporadischen Magenkarzinoms (Oliveira et al., 2009b), (Charlton et al., 2004).

Auffällig ist, dass HDGC verursachende E-Cadherin-Mutationen häufiger in Regionen vorkommen, in denen die Inzidenz des Magenkarzinoms insgesamt gesehen eher niedrig ist. In diesen Ländern beträgt der Anteil an *CDH1*-Mutationen an allen Fällen mit familiärer Häufung von Magenkarzinomen über 40 %, während er in Ländern mit hoher Inzidenz des sporadischen Magenkarzinoms bei 20 % liegt (Oliveira et al., 2009b).

Das *International Gastric Cancer Linkage Consortium* (IGCLC) hat bestimmte Kriterien definiert, die für eine Erkrankung am HDGC erfüllt sein müssen. Dazu zählen unter anderem früh an einem Magenkarzinom mit diffuser Verteilung erkrankte Verwandte oder ein eigenes Erkrankungsalter unter 40 Jahren. Interessanterweise treten

in Familien mit HDGC auch vermehrt lobuläre Mammakarzinome auf (kumulatives Lebenszeitrisiko von 60 % für eine 80-jährige Frau einer betroffenen Familie), so dass auch ein Auftreten beider Tumorentitäten innerhalb einer Familie als IGCLC-Kriterium gilt (Fitzgerald et al., 2010), (Schrader et al., 2008).

Personen, die eines der IGCLC-Kriterien erfüllen, werden genetisch getestet und erhalten zur Risikoreduktion jährliche Magenspiegelungen oder eine prophylaktische Gastrektomie. Bei der endoskopischen Untersuchung zeigt sich allerdings, dass durch die multiple Verteilung und die geringe Größe der durch HDGC entstandenen Läsionen eine makroskopische Beurteilung wenig aussagekräftig ist. Daher wird angeraten, eine Mindestanzahl von 20 Biopsien zu entnehmen, um eine verlässliche Beurteilung machen zu können (Barber et al., 2008). Ist ein HDGC bioptisch nachgewiesen, wird eine kurative Gastrektomie angestrebt.

Weitere eher seltenere Risikofaktoren sind die perniziöse Anämie, Morbus Menetriér, Adenome (werden als Präkanzerose gewertet), vorausgegangene Operationen am Magen aufgrund anderer Ursachen und eine Erkrankung am hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinom (HNPCC), welches auch das Risiko erhöht, an einem Magenkarzinom zu erkranken (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2012), (Bettag et al., 2010).

Zuletzt bleibt festzuhalten, dass Länder mit einer hohen Inzidenz an Magenkarzinomen andere Risikofaktoren aufweisen als Länder mit einer niedrigen Inzidenz. So spielen die „klassischen“ exogenen Risikofaktoren wie *H. pylori*-Infektion, ungesunde Ernährung und damit verbundener geringer sozioökonomischer Status in Ländern mit hoher Inzidenz an Magenkarzinomen eine größere Rolle als in den Ländern mit geringerer Inzidenz, in denen endogene und damit genetische Voraussetzungen einen größeren Einfluss zu haben scheinen (Zilberstein et al., 2012).

### **1.1.3 Klinik**

Symptome eines Magenkarzinoms sind oft uncharakteristisch oder fehlen komplett (Bach, G., 1980). Besonders Magenkarzinome in frühen Tumorstadien weisen selten Symptome auf, so dass meist erst fortgeschrittene Tumore Beschwerden verursachen und diagnostiziert werden. Nahezu die Hälfte der Magenkarzinome in Deutschland wird erst im Stadium T3 oder T4 entdeckt (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2012).

Als häufigere Symptome werden dumpfe oder stechende Schmerzen und Druckgefühl besonders im Epigastrium, Foetor ex ore, Übelkeit, Brechreiz und Appetitlosigkeit mit einem Widerwillen gegen Fleisch sowie Völlegefühl als eventuelles Zeichen einer Magenausgangsstenose angegeben. Leistungsknick, subfebrile Temperaturen, Gewichtsverlust können als Zeichen der B-Symptomatik gewertet werden, die bei vielen Tumorerkrankungen auftritt (Bettag et al., 2010), (Paterson, 1931).

Ein tastbarer Oberbauchtumor ist ein Zeichen des fortgeschrittenen Magenkarzinoms; genauso wie Hepatomegalie, Aszites und tastbare Lymphknoten (zum Beispiel der Virchow-Lymphknoten links supraclavikulär) als Spätzeichen auf eine bereits stattgefundene Metastasierung hindeuten. Weiterhin können akute Magenblutungen mit Hämatemesis oder Melaena auftreten, eventuell wird während der Diagnostik okkultes Blut im Stuhl nachgewiesen (Herold, 2010).

Laut Leitlinie gelten folgende klinische Zeichen als Warnsymptome, die bei einem Verdacht auf ein Magenkarzinom einer weiteren Abklärung (siehe 1.1.4) bedürfen: Dysphagie, rezidivierendes Erbrechen, Inappetenz, Gewichtsverlust, gastrointestinale Blutung (Moehler et al., 2011).

### 1.1.4 Diagnostik und Staging

Zur Zeit gibt es keinen verlässlichen Marker, der die Entstehung eines Magenkarzinoms anzeigt. Im Gegensatz zu anderen Ländern (siehe unten) gibt es in Deutschland auch keine Vorsorgeuntersuchung oder Präventionsmaßnahmen, da die Inzidenz des Magenkarzinoms hierzulande zu gering ist (Bettag et al., 2010). Maßnahmen und Diagnostik beschränken sich also auf die Personen, deren vorhandene Symptome weiter abgeklärt werden müssen.

Die endoskopische Beurteilung von Ösophagus und Magen stellt in der Primärdiagnostik den Goldstandard dar. Durch sie ist man in der Lage, verdächtige Regionen zu identifizieren und im gleichen Verfahren Biopsien aus diesen Regionen zu gewinnen. Um eine ausreichende Sicherheit zu gewährleisten und *sampling errors* zu vermeiden, werden bei Malignomverdacht mindestens acht Biopsien aus dem auffälligen Areal gefordert (Moehler et al., 2011), (Herold, 2010). Zeigen sich zunächst negative Biopsieergebnisse trotz weiterhin bestehenden Verdachts auf ein Magenkarzinom, werden zeitnah erneute Biopsien aus Zentrum und Rand des verdächtigen Bezirks entnommen oder es wird versucht, eine endosonographische

Biopsie der Magenwand oder tumorverdächtiger Lymphknoten zur Diagnosesicherung zu gewinnen. Eine weitere Möglichkeit ist die diagnostische endoskopische Resektion des auffälligen Bereiches, die jedoch nur selten durchgeführt werden muss (Moehler et al., 2011).

Das Staging umfasst den Teil der Diagnostik, der versucht eine Aussage über die Ausbreitung des Tumors zu machen und somit entscheidend für die Therapieplanung ist. Mit Hilfe der B-Bild-Sonographie gelingt hier vor allem der Nachweis von Fernmetastasen, die sich zumeist in der Leber befinden (Dietrich et al., 2006). Zudem kann durch eine ultraschallgestützte Feinnadelpunktion oftmals die Sicherung von Lymphknotenmetastasen gelingen. Weiterhin ist eine endosonographische Ultraschalluntersuchung gefordert, die in erster Linie die Infiltrationstiefe des Tumors sichtbar macht (Puli et al., 2008). Auch hier kann eine Feinnadelpunktion zur Sicherung von Lymphknotenmetastasen sinnvoll sein; ebenso können Leber- und Peritonealmetastasen, mediastinale Lymphknoten und Aszites (Frage nach einer Peritonealkarzinose) punktiert werden (Moehler et al., 2011).

Zum Staging gehören zudem eine CT-Untersuchung von Thorax und Abdomen mit einem intravenösen und oralen Kontrastmittel (kann auch durch Wasser ersetzt werden), welches in jedem Fall die portalvenöse Phase zur sichereren Beurteilung der Leber abdecken sollte. Lymphknoten sind in diesen Schnittbildverfahren nur bedingt beurteilbar und können daher oft nur intraoperativ abgeklärt werden. Ein MRT sollte nur dann erfolgen, wenn eine endosonographische Ultraschall- oder eine CT-Untersuchung nicht möglich sind. (Kwee and Kwee, 2007).

In den fortgeschrittenen Stadien T3 und T4 empfiehlt sich eine diagnostische Laparoskopie. So kann die Ausbreitung des Tumors sicher beurteilt und verhindert werden, dass trotz umfangreichen Stagings unerwartet nicht resektable Tumore einer offen chirurgischen Therapie zugeführt werden. Eine Peritoneallavage mit Zytologie dient als mögliche Ergänzung; ihr Ergebnis hat zwar Einfluss auf die Prognose des jeweiligen Patienten, nicht aber auf die Therapie.

Die Bestimmung von Tumormarkern wird dagegen nicht empfohlen. In keiner Studie konnte bis jetzt gezeigt werden, dass Sensitivität und Spezifität für die Primärdiagnostik ausreichen, so dass sie höchstens als Verlaufsparemeter wertvoll sind (Moehler et al., 2011).

In Ländern mit weitaus höherer Inzidenz an Magenkarzinomen gibt es dagegen Maßnahmen zur Früherkennung: In Japan erfolgt ab dem 40. Lebensjahr ein Screening

durch eine Gastroskopie oder Bariumkontrastdarstellung (Hamashima et al., 2008). Ähnliches gilt für Korea, während in Taiwan zunächst der Serumpepsinogenspiegel, welcher ein Maß für die Atrophie der Magenschleimhaut als Risikofaktor für ein Magenkarzinom ist, bestimmt wird. Fällt dieser zu niedrig aus, erfolgt ebenfalls eine Gastroskopie (Fock et al., 2008).

Diese Screeninguntersuchungen zeigen allerdings nur für Länder mit hoher Inzidenz an Magenkarzinomen einen Benefit, so dass sie nicht für mitteleuropäische Länder empfohlen werden (Moehler et al., 2011).

### **1.1.5 Einteilung und Klassifikation**

Für das Magenkarzinom sind viele verschiedene Einteilungen oder Klassifikationen erstellt worden. Vorgestellt werden hier nur diejenigen, die für die Auswertung dieser Arbeit von Bedeutung sind.

Eine Einteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation (siehe Tabellen 1.1 bis 1.3). Diese einheitliche Einteilung dient der exakten Beschreibung der Ausdehnung eines Tumors. Beim Magenkarzinom werden Infiltrationstiefe des Primärtumors, Anzahl der befallenen Lymphknoten und das Vorhandensein von Fernmetastasen berücksichtigt und in drei Kategorien bewertet. Unterschieden werden muss zwischen der präoperativen klinischen Einschätzung, die sich auf sonographische Verfahren und Schnittbildtechnik stützt (uTNM) und der postoperativen histologischen Einteilung (pTNM), die letztlich das genauere Bild liefert und therapieentscheidend ist.

Darüber hinaus können in weiteren Kategorien Aussagen zu einem möglichen Residualtumor, einer Gefäß- oder Perineuralscheideninvasion und einem Rezidiv gemacht werden (Sobin et al., 2009), (Herold, 2010).

**Tabelle 1.1: Einteilung des Primärtumors eines Magenkarzinoms nach TNM-Stadium [modifiziert nach (Sobin et al., 2009) und (Washington, 2010)]**

<b>T: Primärtumor</b>	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	keine Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ, intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria oder Muscularis mucosa
T1b	Tumor infiltriert Submucosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor penetriert Serosa (viszerale Peritoneum) ohne Infiltration benachbarter Strukturen
T4a	Tumor infiltriert Serosa (viszerale Peritoneum)
T4b	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (Milz, Colon transversum, Leber, Zwerchfell, Pancreas, Bauchwand, Nebenniere, Niere, Dünndarm, Retroperitoneum)

**Tabelle 1.2: Einteilung der Lymphknotenmetastasen eines Magenkarzinoms nach TNM [modifiziert nach (Sobin et al., 2009)]**

<b>N: Lymphknotenmetastasen</b>	
NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-2 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 3-6 regionären Lymphknoten
N3a	Metastasen in 7-15 regionären Lymphknoten
N3b	Metastasen in mehr als 16 regionären Lymphknoten

**Tabelle 1.3: Einteilung der Fernmetastasen eines Magenkarzinoms nach TNM [modifiziert nach (Sobin et al., 2009)]**

<b>M: Fernmetastasen</b>	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden



Eine weitere Einteilung, die auf der TNM-Klassifikation fußt, ist die Stadieneinteilung nach AJCC (*American Joint Committee on Cancer*). Diese fasst bestimmte TNM-Stadien zusammen, um so eine bessere Aussage über die Prognose treffen zu können (siehe Tabelle 1.4).

**Tabelle 1.4: Stadieneinteilung des Magenkarzinoms nach AJCC. Hierbei werden mehrere TNM-Stadien zu einem AJCC-Stadium zusammengefasst, um bessere Aussagen über die Prognose möglich zu machen [modifiziert nach (Washington, 2010)].**

AJCC-Stadium	zugehörige TNM-Stadien		
0	Tis	N0	M0
I A	T1	N0	M0
I B	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
II A	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
II B	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
III A	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
III B	T4b	N0 oder N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
III C	T4b	N2 oder N3	M0
	T4a	N3	M0
IV	jedes T	jedes N	M1

Laurén hat Magenkarzinome nach ihrem histologischen Wachstumsmuster in zwei Kategorien unterteilt: einen intestinalen Typ und einen diffusen Typ (Laurén, 1965). Intestinale Tumore bilden Drüsen mit unterschiedlich differenzierten Anteilen, während diffuse Tumore aus dissoziiert liegenden Zellen bestehen, die wenig bis keine Drüsenstruktur aufweisen. Tumore, die Anteile beider Typen beinhalten, werden als Mischtyp bezeichnet (Bosman et al., 2010). Diese Einteilung hat zum einen Bedeutung für das Resektionsausmaß (siehe 1.1.6), zum anderen scheint sie ein wichtiger Prognosefaktor zu sein: Der diffuse Typ tritt vor allem bei jungen Patienten auf, wird größtenteils erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und hat damit eine schlechtere Prognose als der intestinale Typ, der vor allem bei älteren Patienten und in niedrigeren TNM-Stadien auftritt (Qiu et al., 2013).

Die pathologische Klassifikation erfolgt nach der WHO (*World Health Organisation*) (Bosman et al., 2010). Sie ist eine rein deskriptive Einteilung, die fünf Hauptklassen und seltenere Entitäten beinhaltet. Haupttypen sind das tubuläre Adenokarzinom, welches dilatierte oder verengte Tubuli mit Verzweigungen bildet, und das papilläre Adenokarzinom, welches exophytisch in Form von fingerförmigen Strukturen wächst. Weiterhin gehören das muzinöse Adenokarzinom, das extrazelluläre Schleimbildung aufweist, das Siegelringzellkarzinom, welches die namensgebenden Zellen bildet und mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist, und das gemischte Adenokarzinom, das sowohl Teile eines tubulären oder papillären Adenokarzinoms als auch eines Siegelringzellkarzinoms enthält, dazu. Seltene Formen sind unter anderem das adenosquamöse Karzinom, das Plattenepithelkarzinom und das medulläre Karzinom, welches auch als lymphoepitheliales Karzinom bekannt ist. Das medulläre Karzinom ist mit dem Epstein-Barr-Virus assoziiert und weist eine bessere Prognose auf (Bosman et al., 2010), (Murphy et al., 2009).

### 1.1.6 Therapie

Grundsätzlich ist bei einer kurativen Zielsetzung eine R0-Resektion anzustreben, da dies der ausschlaggebende Parameter für ein tumorfreies Überleben ist.

Abhängig vom Tumorstadium sind verschiedene chirurgische Therapien möglich:

Die endoskopische Therapie ist bei Magenkarzinomen im Stadium T1a, die zudem unter 2 cm groß und gut oder mäßig differenziert sind, möglich (Bettag et al., 2010). Sie sollte möglichst als endoskopische Submucosa-Dissektion mit *en-bloc*-Resektion

erfolgen und nicht als endoskopische Resektion in *peace-meal*-Technik, bei der das Tumorgewebe Stückchen für Stückchen reseziert wird, da so mehr kurative Resektionen und weniger Rezidive zu erwarten sind (Oda et al., 2006). Bei R1-Resektionen sowie Rezidiven sind Nachresektionen in endoskopischer Technik möglich, wobei ab der zweiten Nachresektion ein offen chirurgisches Vorgehen empfohlen wird. Als Nachsorge erfolgen regelmäßige Magenspiegelungen nach einem festen Schema sowie eine Testung auf *H. pylori* und gegebenenfalls eine Eradikation (Moehler et al., 2011).

Die offen chirurgische Therapie stellt das Standardverfahren dar. Das Resektionsausmaß hängt dabei von der Tumorlokalisation, dem TNM-Stadium und der Klassifikation nach Laurén ab. Als Grundsatz gelten eine Gastrektomie mit einem Sicherheitsabstand von 8 cm beim diffusen Typ, da dieser sich eventuell diskontinuierlich ausbreitet, und eine subtotale oder totale Magenresektion mit einem Sicherheitsabstand von 5 cm beim intestinalen Typ. Die Passageherstellung erfolgt meist als Roux-Y-Rekonstruktion, selten als Jejunuminterponat. Zudem erfolgt immer eine Lymphadenektomie der Kompartimente I und II (perigastrische Lymphknoten an der kleinen und großen Kurvatur sowie an Truncus coeliacus, Milzarterie und –hilus), welche die Langzeitprognose verbessert und die Rezidivrate senkt (Herold, 2010). Für eine zuverlässige pathologische Beurteilung ist die Entfernung von mindestens 16 regionären Lymphknoten erforderlich (Moehler et al., 2011). Mit dem Tumor adhärenente Strukturen sollten *en bloc* mit reseziert werden; eine standardisierte Splenektomie und Linkspankreatektomie führt dagegen zu erhöhter Morbidität und Mortalität, so dass sie nicht empfohlen werden können (Bonenkamp et al., 1999).

Zweiter Pfeiler der Therapie ist die perioperative (prä- und postoperative) Chemotherapie, die bei Tumoren der Stadien T3 und T4 eingesetzt wird, die sonographisch als lokal und somit resezierbar eingestuft wurden. Wahrscheinlich profitieren auch Patienten mit einem T2-Tumor von dieser Maßnahme. Sowohl vor der Operation als auch vor Beginn der postoperativen Chemotherapie sollte nochmals ein Ausschluss von Fernmetastasen erfolgen, da mit ihnen ein kurativer Ansatz nicht mehr gegeben ist. Meist wird eine Kombination aus 5-Fluorouracil, Cisplatin und Epirubicin (ECF-Schema) oder aus verwandten Substanzen eingesetzt (Bettag et al., 2010). Auch eine alleinige postoperative Radiochemotherapie ist möglich, sollte aber nur dann eingesetzt werden, wenn intraoperativ keine ausreichende Resektion der Lymphknoten möglich war oder bei einem Lokalbefund auch durch eine Nachresektion keine R0-Resektion erreicht werden konnte. Die perioperative Chemotherapie bietet dabei

gegenüber der postoperativen Radiochemotherapie den Vorteil, dass sie an mehr Patienten durchgeführt werden kann (Patienten sind zumindest vor der Operation noch in besserem Allgemeinzustand) und ein besseres Überleben belegt ist.

Bei funktioneller Inoperabilität aufgrund anderer Krankheiten oder Irresektabilität eines lokal begrenzten Tumors wird dagegen eine potenziell kurative Radiochemotherapie empfohlen. Diese kann im Einzelfall auch als neoadjuvante Therapie erfolgen, bei der nach einer Tumorregression eine kurative Operation erfolgt (Moehler et al., 2011).

Im Falle eines Rezidivs wird eine individuelle Entscheidung getroffen, eine erneute Operation kann in Abhängigkeit vom Befund angeboten werden.

Die relativ neue Option der Antikörpertherapie ist derzeit Gegenstand der Forschung. Neuere Daten zeigen, dass der Antikörper Trastuzumab bei HER-2-positiven Tumoren im Rahmen einer palliativen Situation einen Überlebensvorteil bringt (Bang et al., 2010). In wie weit dies auch auf eine mögliche präoperative Therapie übertragbar ist, bleibt abzuwarten.

Bei lokal fortgeschrittenen inoperablen Tumoren oder Fernmetastasen bleibt nur die Möglichkeit einer palliativen Therapie. Die systemische Chemotherapie bringt hier Vorteile in Bezug auf Überlebenszeit, Lebensqualität, Symptomkontrolle und Allgemeinzustand (Glimelius et al., 1997). Es gilt allerdings zu bedenken, dass dies nur für Patienten gilt, die sich zuvor in einem guten Allgemeinzustand befunden haben. Diejenigen mit schlechtem Allgemeinzustand erhalten selten eine Chemotherapie, so dass Daten zur ausreichenden Beurteilung fehlen. Es werden systemische platinhaltige Chemotherapeutika und 5-Fluorouracil eingesetzt, bei jungen Patienten mit gutem Allgemeinzustand zusätzlich Docetaxel, welches neben einem Überlebensvorteil allerdings auch eine höhere Toxizität mit sich bringt. Vor der Chemotherapie sollte eine Bestimmung des HER-2-Rezeptorstatus erfolgen. Ist dieser positiv, erfolgt zusätzlich die Gabe des Antikörpers Trastuzumab (Bettag et al., 2010).

Neben der medikamentösen Therapie ist die Behandlung weiterer tumorbedingter Komplikationen im palliativen Regime wichtig. Symptomatische Tumorstenosen werden mit einem Stent überbrückt oder durch eine Ernährungsfistel über die endoskopische perkutane Jejunostomie (PEJ) umgangen. Bei Tumorblutungen wird der Versuch einer endoskopischen Blutstillung unternommen, gelingt dies nicht, muss angiographisch embolisiert werden oder im Extremfall eine palliative Resektion vorgenommen werden. Bei Sickerblutungen ist eventuell eine palliative Radiochemotherapie von Nutzen. Desweiteren sollten natürlich alle weiteren

supportiven Maßnahmen, die in einer palliativen Situation sinnvoll erscheinen, durchgeführt werden (Moehler et al., 2011), (Bettag et al., 2010), (Herold, 2010).

### 1.1.7 Prognose

Die prognostisch wichtigsten Faktoren sind die Tumorlokalisation, die lokale Tiefeninfiltration des Primärtumors und der Lymphknotenbefall. Weiterhin bedeutsam sind die Gefäßinvasion, die Tumorzelldissoziation an der Invasionsfront, das Vorhandensein von Fernmetastasen und die Möglichkeit einer R0-Resektion (Moehler et al., 2011). Das „*Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER)*“-Programm des „*National Cancer Instituts*“ der USA beschreibt für den Zeitraum von 2002 bis 2008 in den USA folgende Zusammenhänge: Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag insgesamt bei 26,9 %. Bei einem Befund ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen lag die 5- Jahres-Überlebensrate dabei bei 62,3 %, verringerte sich bei Befall von Lymphknoten auf 27,7 % und lag bei nur 3,7 %, wenn Fernmetastasen vorlagen (Howlader et al., 2012).

Für Deutschland sind ähnliche Zahlen veröffentlicht worden. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt hier insgesamt bei circa 30 % in den Jahren 2007 und 2008 (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2012). Laut einer aktuellen Studie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate im UICC (*Union for International Cancer Control*)-Stadium I A bei 82 % und sinkt über 69 % im Stadium I B auf 60 % im Stadium II A. Im Stadium II B überleben 42 % der Patienten fünf Jahre. Im Stadium III A liegt der Wert bei 28 % Überlebenswahrscheinlichkeit nach fünf Jahren, im Stadium III B sind es 18 % und im Stadium III C 11 %. Die 5- Jahres-Überlebensrate im Stadium IV liegt dann nur noch bei 6 % (Reim et al., 2013). Die Patienten dieser Studie wurden dabei nach den Richtlinien der „*Japanese Research Society for the Study of Gastric Cancer guidelines*“ operiert, welche auch eine standardisierte Entfernung der Lymphknotenkompartimente I und II vorsehen. Eine noch ausführlichere Darstellung der Zahlen ist Abbildung 1.3 zu entnehmen.

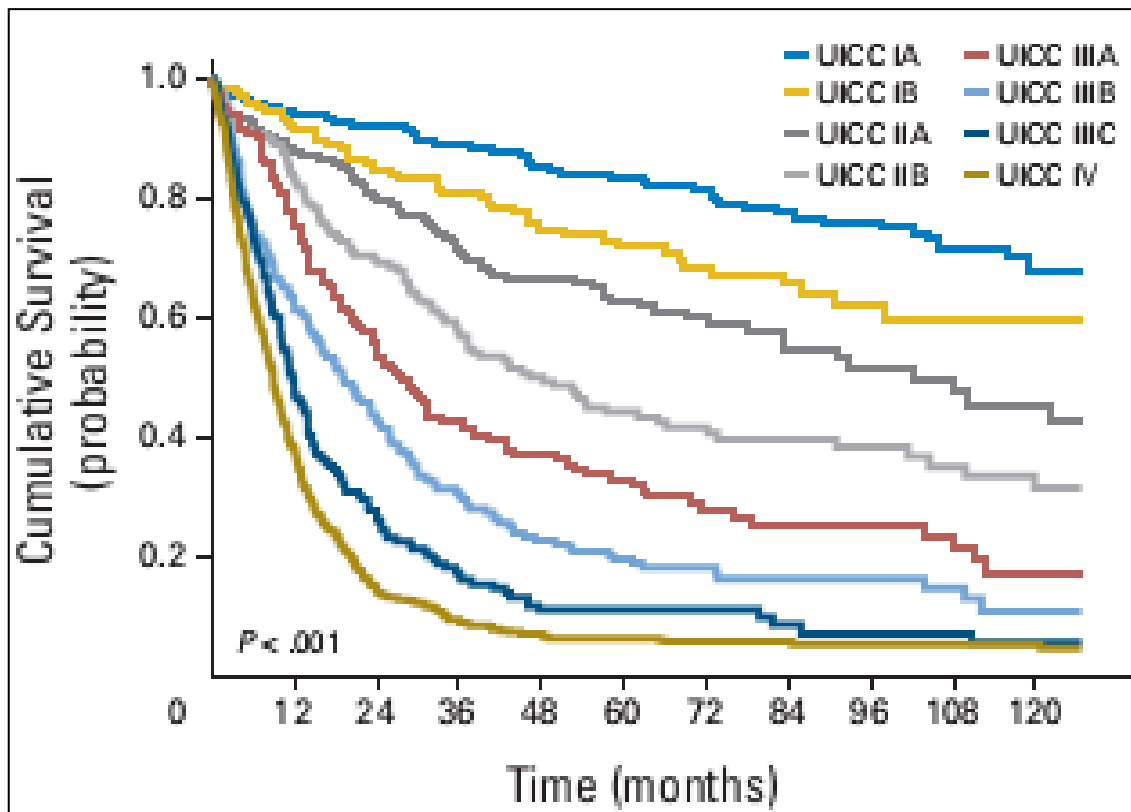


Abbildung 1.3: Überlebensraten für Patienten mit Magenkarzinom in Abhängigkeit des UICC-Stadiums für Deutschland. Es wird deutlich, dass mit höherem UICC-Stadium die Überlebensrate drastisch abnimmt [modifiziert nach (Reim et al., 2013)].

## 1.2 TP53

TP53 wurde 1979 nahezu simultan von unterschiedlichen Forschergruppen entdeckt und erhielt dementsprechend zunächst verschiedene andere Bezeichnungen (Linzer and Levine, 1979), (Lane and Crawford, 1979), (Kress et al., 1979). Der Name TP53 oder p53 wurde erst 1983 während des „1<sup>st</sup> International p53 Workshop“ in Oxted als Terminus durchgesetzt. Er leitet sich vom damals angenommenen Molekulargewicht von 53 kDa ab; heute ist bekannt, dass das korrekte Molekulargewicht von TP53 43,7 kDa beträgt.

Zunächst wurde vermutet, dass TP53 ein Onkogen sei. Diese Vermutung wurde durch die Forschung der darauffolgenden Jahre bestätigt, bis 1988 herausgefunden wurde, dass die cDNA, mit der man bisher TP53-Forschung betrieben hatte, Punktmutationen im TP53-Gen enthielt und die Wildtyp-Sequenz nicht in der Lage war, Tumore zu induzieren (Finlay et al., 1988), (Eliyahu et al., 1988). Kurz darauf entstand daraus die

Vermutung, dass es sich bei *TP53* nicht um eine Onkogen, sondern vielmehr um ein Tumorsuppressorgen handelt (Baker et al., 1989), was letztendlich bestätigt werden konnte (Donehower et al., 1992). Außerdem wurde gezeigt, dass eine Keimbahnmutation von *TP53* zum Li-Fraumeni-Syndrom, einer Erkrankung mit dem Auftreten verschiedener Tumore ab der Kindheit und Jugend, führt (Malkin et al., 1990).

In der Folgezeit wurde und wird immer noch ersichtlich, dass TP53 als Transkriptionsfaktor die zentrale Stellung in einem großen Netzwerk einnimmt, welches unter anderem den Zellzyklus kontrolliert und bei dessen Störung Zellentartung und Tumorentstehung möglich werden (siehe 1.2.2). 1992 beschrieb Lane TP53 in diesem Zusammenhang treffend als „*guardian of the genome*“. Heute geht man davon aus, dass TP53-Mutationen in ungefähr 50 % aller menschlichen Tumoren vorhanden sind.

### 1.2.1 Aufbau

Das *TP53*-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17. Es codiert für ein Protein aus 393 Aminosäuren, die sich in vier Domänen unterteilen lassen: die aminoterminal Domäne (NTD), die DNA-bindende oder Core-Domäne (DBD), die Tetramerisierungsdomäne (TD) und die carboxyterminale Regulierungsdomäne (RD).

Die NTD besteht aus der Transkriptionsaktivierungsregion und der SH3-Zielsequenz. Erstere fungiert als Bindungsstelle für Proteine, die einerseits durch TP53 als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedenster Zielgene steigern (Lu and Levine, 1995), (Thut et al., 1995), andererseits aber in der Lage sind, die biochemische Aktivität von TP53 inhibieren. Bekanntester Vertreter dieser TP53-Inhibitoren ist MDM2 (Momand et al., 1992) (siehe 1.2.2). Die SH3-Zielsequenz steht dagegen eher im Zusammenhang mit Wachstumsregulation, da sie Apoptose induzierende Prozesse reguliert (Venot et al., 1998).

Die DBD ist die Region im TP53-Protein, die eine spezifische Bindung an DNA ermöglicht. Mittlerweile sind über 500 Bindeloci für TP53 bekannt (Wei et al., 2006). Die spezifische Bindung erfolgt an zwei Kopien von jeweils 10 Basenpaaren einer palindromen doppelsträngigen DNA-Sequenz, die meistens direkt aufeinanderfolgen, aber auch bis zu 14 Basenpaare auseinander liegen können (Wei et al., 2006), (El-Deiry et al., 1992). Die meisten an maligner Entartung beteiligten Mutationen und alle sechs *hot-spot*-Mutationen liegen in der DBD (siehe Abbildung 1.4). Die *hot-spot*-

Aminosäuren an den Positionen 248, 273 und 282 kontaktieren dabei direkt die gebundene DNA, während die *hot-spot*-Aminosäuren an den Positionen 175, 245 und 249 an der Stabilisierung der DBD beteiligt sind. Eine Mutation innerhalb dieser *hot-spot*-Aminosäuren führt also entweder zu einem direkten Verlust der Fähigkeit spezifische DNA zu binden oder führt über eine geringere Stabilisierung zur Entfaltung des Proteins und somit zu einem Funktionsverlust (Freed-Pastor and Prives, 2012). Dadurch wird letztendlich die Abwehr gegen Zellentartung geschwächt (siehe 1.2.2). Zudem zeigt mutiertes TP53 die Fähigkeit, an andere DNA-Abschnitte zu binden und somit andere Gene zu regulieren als Wildtyp-TP53, wodurch eventuell noch andere bisher unbekannte Prozesse der Tumorentstehung in Gang gesetzt werden (Göhler et al., 2005).

Die Quartärstruktur von TP53 ist ein Tetramer, welches durch die TD stabilisiert wird. Die Form als Tetramer und damit ein hohes Molekulargewicht sind dabei wichtig für die DNA-Bindung, da durch sie eine hohe DNA-Bindungsaffinität erzielt wird (Hainaut et al., 1994).

Die Funktion der RD ist noch weitgehend unverstanden. Sie kann unspezifisch DNA binden (Ahn and Prives, 2001) und scheint am ehesten einen Einfluss auf die spezifische DNA-Bindungsfähigkeit der DBD zu haben (Hupp et al., 1992). Mehrere Modelle werden derzeit diskutiert, einer Studie zufolge interagiert die RD eines Monomers mit der DBD eines anderen Monomers und stabilisiert so die Form als Tetramer (Retzlaff et al., 2013).



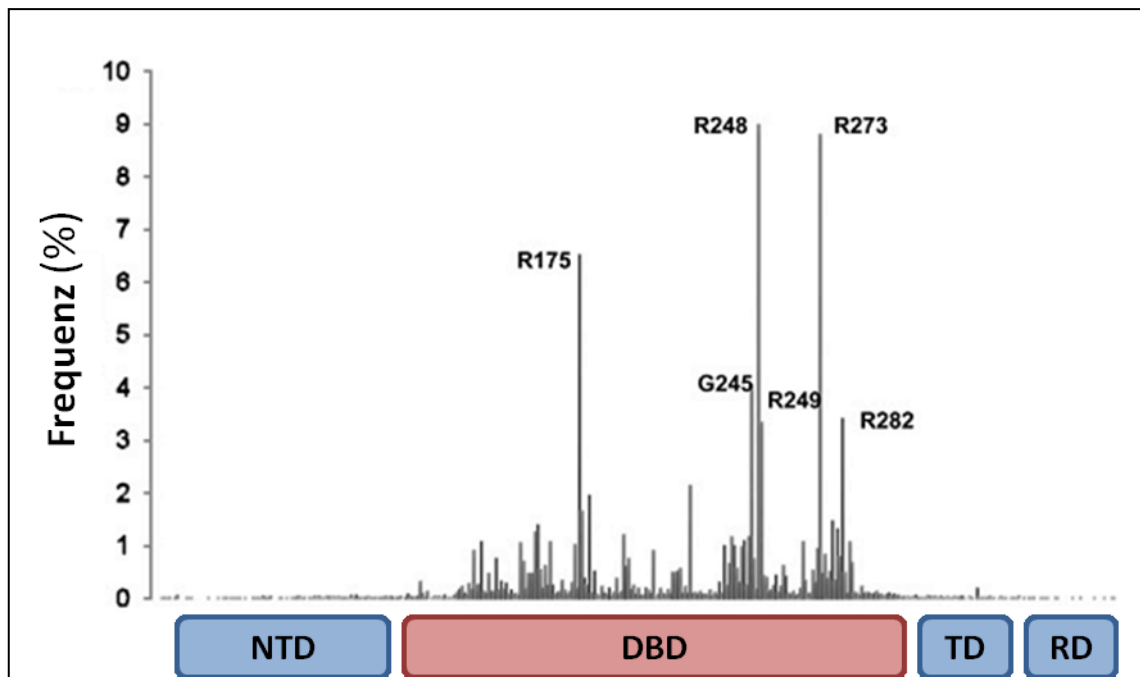


Abbildung 1.4: Mutationspektrum von TP53 in menschlichen Tumoren mit allen sechs hot-spot-Mutationen und deren Häufigkeit. Unten ist in Bezug dazu eine schematische Darstellung der Domänen des TP53-Proteins gegeben. Alle hot-spot-Mutationen liegen im Bereich der DBD [modifiziert nach (Freed-Pastor and Prives, 2012)].

NTD = aminoterminale Domäne, DBD = DNA-bindende Domäne, TD = Tetramerisierungsdomäne, RD = Regulierungsdomäne

## 1.2.2 Funktion, Regulation und Signalkaskade: TP 53 und Krebsentstehung

TP53 ist ein Tumorsuppressor, das heißt bei einer veränderten Funktion oder Ausfall des Proteins durch Mutationen, ist die Zelle weniger in der Lage gegen DNA-Schäden und in deren Folge Zellentartung sowie malignes Wachstum vorzugehen. TP53 übt dabei als Transkriptionsfaktor seine Funktionen aus: Nach einer Zellschädigung, beispielsweise durch UV-Strahlung oder chemische Kanzerogene, wird TP53 posttranslational stabilisiert (Maltzman and Czyzyk, 1984), somit weniger abgebaut und akkumuliert in der Zelle. Die posttranslationale Stabilisierung erfolgt dabei auf multiplen Wegen, die größtenteils noch Gegenstand der heutigen Forschung sind. Als Beispiele seien hier die (De-)Phosphorylierung von Aminosäureresten der NTD und RD, sowie die Acetylierung von Lysinresten der RD genannt (Brooks and Gu, 2003).

Das nun in höherem Maße in der Zelle vorhandene TP53 reguliert durch seine spezifische DNA-Bindung die Expression von Genen, die den Zellzyklus kontrollieren,

Apoptose induzieren und in die Zellalterung eingreifen. Letztendlich dienen alle diese Prozesse der Verhinderung von Zellentartung und stellen somit einen Schutz vor Tumorentstehung dar.

Grob lassen sich dabei zwei Phasen voneinander unterscheiden: Zunächst wird ein Zellzyklusarrest eingeleitet, der es der Zelle ermöglicht, die DNA zu reparieren. Stellen sich diese Schäden als irreparabel dar, wird als endgültiger Schritt die Apoptose eingeleitet. Dies ist unter anderem abhängig vom Zelltyp und der Anwesenheit von exogenen Faktoren, zum Beispiel Wachstumsfaktoren und Onkogenen (Amundsen et al., 1998).

TP53 kann einen Zellzyklusarrest sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase des Zellzyklus einleiten. Die bekannteste Signalkaskade führt über das Zielprotein p21, ein Inhibitor von cdk2. p21 verhindert dabei die Aktivierung von Komplexen aus cdk2 und Cyclin D oder E, deren Ziel die Phosphorylierung des RB-Proteins ist. Findet keine Phosphorylierung statt, kann das RB-Protein den Transkriptionsfaktor E2F, der für den Übergang der Zelle aus der G1-Phase in die S-Phase zuständig ist, nicht freisetzen und es kommt zu einem Zellzyklusarrest. Die Rolle von TP53 beim Übergang der G2-Phase in die Mitosephase ist noch nicht abschließend geklärt, scheint aber auch von Bedeutung zu sein (Amundsen et al., 1998), (Felsher et al., 2000). Auch gibt es Hinweise darauf, dass TP53 einen weiteren Kontrollpunkt des Zellzyklus in der frühen Mitosephase reguliert (Cross et al., 1995).

Bei irreparablen DNA-Schäden wird die Zelle der Apoptose zugeführt. TP53 induziert Apoptose vor allem über die Transkription von Genen, die an der Apoptose beteiligt sind. Als ein Beispiel sei hier die Regulation des Apoptose-Induktors BAX durch TP53 genannt (Toshiyuki and Reed, 1995). BAX ist ein Mitglied der Bcl2-Familie, der sowohl proapoptotische (zum Beispiel BAX) als auch antiapoptotische (zum Beispiel Bcl-2 und Bcl-XL) Proteine angehören, deren Zusammenspiel letztlich über ein Überleben der Zelle oder die Einleitung der intrinsischen Apoptose an den Mitochondrien und damit des Zelltodes entscheidet. BAX-Homodimere sind dabei in der Lage, Poren in der äußeren Mitochondrienmembran zu bilden und somit ihre Permeabilität stark zu steigern. Dies setzt wiederum Proteine der inneren Mitochondrienmembran wie zum Beispiel Cytochrom c frei, was in einer Aktivierung von Caspasen und somit in der Apoptose endet (Renault et al., 2013). Gleichzeitig interagiert TP53 mit Bcl-2 und Bcl-XL, so dass deren antiapoptotische membranstabilisierende Wirkung entfällt. Dies wird auch der transkriptionsunabhängige

Weg der Apoptoseinduktion durch TP53 genannt (Moll et al., 2005). Zahlreiche weitere *downstream*-Gene von TP53 und deren Proteine (zum Beispiel Fas/CD95 oder DR5) sind ebenfalls an der intrinsischen, sowie auch an der extrinsischen Apoptose, die sich an der Zellmembran abspielt, beteiligt (Fridman and Lowe, 2003).

Desweiteren greift TP53 in die Zellalterung oder Seneszenz ein. Per Gammastrahlung geschädigte Zellen treten in einen permanenten Zellzyklusarrest ein, der auch typisch ist für seneszente Zellen (Di Leonardo et al., 1994). Mäuse mit einer Überexpression von TP53 zeigen Zeichen eines verfrühten Alterns und eine verkürzte Lebensdauer (Donehower, 2002). Auch dies wird derzeit als ein Mechanismus angesehen, der den Körper vor einer unkontrollierten Teilung einer mutierten Zelle schützt. Inwieweit dies auf Kosten der Lebenszeit des gesamten Organismus geht, ist noch ungeklärt.

Um all diese Funktionen im angemessenen Maße durchführen zu können, bedarf TP53 einer engen Regulation. Bekanntester Inhibitor ist MDM2 (*mouse double minute 2*, beim Menschen auch HDM2 für *human double minute 2*). 1992 wurde entdeckt, dass MDM2 über eine Protein-Protein-Bindung in der Lage ist, die biochemische Aktivität von TP53 zu inhibieren (Momand et al., 1992). Mittlerweile ist bekannt, dass diese Inhibition über verschiedene Mechanismen abläuft: Zum einen blockiert MDM2 sterisch die Transkriptionsaktivierungsregion der NTD (Oliner et al., 1993), so dass keine Proteine binden können und die Expression von Zielgenen unterbunden wird, zum anderen ist MDM2 eine spezifische TP53-E3-Ubiquitin-Ligase, die TP53 ubiquitiniert und damit seinen Abbau in den Proteasomen einleitet (Fang et al., 2000). Da MDM2 gleichzeitig ein Zielprotein von TP53 ist (Barak et al., 1993), resultiert daraus also eine negative *feedback*-Schleife: TP53 führt zur Expression von MDM2, welches seinerseits den Abbau von TP53 fördert (Wu et al., 1993). Somit ist gewährleistet, dass in Zellen ohne DNA-Schäden niedrige Konzentrationen von TP53 gehalten werden können und die Zelle weiterhin in der Lage ist, sich zu teilen. Hier ergibt sich ein Ansatz zur Krebstherapie.

Ein weiterer Schutzmechanismus vor einer ungewollten TP53-Akkumulation ist die kurze Halbwertszeit von unter 20 min., die TP53 zu einem sehr labilen Protein macht. Ein Verlust der Tetramer-Struktur zum Beispiel durch Temperaturen über 37 °C führt zu einem Verlust der DNA-Bindeaktivität und somit einer geringeren Aktivität generell (Hansen et al., 1996). Daher ist die Konzentration in gesunden Zellen niedrig und wird von mehreren Faktoren reguliert. Eine wichtige Rolle spielt der TP53-Antagonist MDM2 (siehe oben), andere sind die Chaperone Hsp70 und Hsp90. Hsp70 schützt TP53

vor einem thermisch bedingten Verlust der spezifischen DNA-Bindungsfähigkeit (Hansen et al., 1996) und auch Hsp90 stabilisiert TP53 (Wang and Chen, 2003).

Insgesamt wird deutlich, dass die Konzentration von TP53 in der Zelle durch viele, teilweise auch miteinander wechselwirkende Prozesse, die noch nicht komplett bekannt und verstanden sind, konstant gehalten wird.

### 1.2.3 Ausblick: TP53 und Krebstherapie

Mit der Entdeckung der zentralen Stellung von TP53 in Zellzyklus- und Apoptoseregulation und damit einer entscheidenden Position in der Krebsentstehung, eröffnete sich auch die Möglichkeit des Eingreifens in dieses Netzwerk und somit der Krebstherapie. Dabei wurden vor allem drei Wege verfolgt: Zum einen die Gentherapie, mit deren Hilfe nicht mutiertes TP53 in den Zellen gebildet werden soll, zum anderen die Wiederherstellung der Wildtyp-Aktivität von TP53 in Tumoren mit einer Mutation im *TP53*-Gen durch sogenannte *small molecules* und als letztes ein Eingriff in den Regelkreis zwischen TP53 und MDM2, der auch Patienten helfen könnte, bei denen nicht *TP53* selbst mutiert ist, sondern die Konzentration des Proteins aufgrund einer Störung des Regulationsnetzwerkes herabgesetzt ist.

Am weitesten fortgeschritten ist dabei die Gentherapie. In China ist seit 2003 ein rekombinantes Adenovirus als Vektor, welches zur Expression von TP53 entwickelt wurde, unter dem Namen „Gendicine“ zur Behandlung für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region zugelassen. Dies ist die erste überhaupt zugelassene Gentherapie für Menschen weltweit und damit ein wichtiger Meilenstein (Peng, 2005). Eine Studie, in der Patienten mit fortgeschrittenem hepatozellulärem Karzinom mit Gendicine behandelt wurden, belegt eine verlängerte Lebenszeit, ein Schrumpfen der Tumormasse und einen Rückgang von fehlerhaftem TP53 im peripheren Blut (Chen et al., 2011). Auch „Advexin“, ebenfalls ein *TP53*-tragendes Adenovirus zeigt ein gutes Ansprechen bei der Therapie unterschiedlicher Krebsarten (Gabilovich, 2006). Es bleibt abzuwarten, ob diese ersten Erfolge ausgedehnt werden können, gerade weil sie auf einer vollkommen neuen Medikamentenklasse beruhen.

Der zweite Weg besteht in der Konstruktion von *small molecules*. Mutationen des *TP53*-Gens führen häufig dazu, dass das Protein an Stabilität verliert und somit einen Funktionsverlust erhält, schneller denaturiert und abgebaut wird. *Small molecules* binden an diese inaktiven Proteine und erhöhen die Stabilität, indem sie die Wildtyp-

Konformation wiederherstellen. Sie sind so in der Lage, sowohl die Tumorsuppressorfunktion wiederherzustellen, als auch die vorzeitige Denaturierung zu verhindern (Boeckler et al., 2008). Ähnliche Effekte lassen sich durch eine Verbesserung des Kontaktes zwischen der DBD und dem Phosphat-Rückgrat der DNA erzielen: Ein Ersatz der Aminosäure Threonin an Position 284 durch Arginin erhöht bei drei der sieben häufigsten Mutationen im *TP53*-Gen die spezifische Bindungsaktivität und stellt die Transaktivierungs- und Tumorsuppressorfunktion wieder her (Wieczorek et al., 1996).

Ein weiteres interessantes Molekül ist in diesem Zusammenhang PRIMA-1 (*p53 reactivation and induction of massive apoptosis*). PRIMA-1 induziert TP53-abhängige Apoptose in Tumorzellen, indem es die spezifische DNA-Bindung wieder ermöglicht, gleichzeitig wird die aktive Konformation von TP53 wiederhergestellt. Damit gelingt es sowohl Mutationen, die den direkten DNA-Kontakt betreffen, als auch solche, die zur Konformationsänderung führen, auszugleichen (Bykov et al., 2002). 2012 wurde PRIMA-1MET, die potentere methylierte Form von PRIMA-1 erstmals im Menschen getestet, wobei die Patienten bösartige hämatologische Erkrankungen oder Prostatakarzinome aufwiesen. Neben der gewünschten antitumorigenen Wirkung traten wenig unerwünschte Nebenwirkungen auf (Lehmann et al., 2012), so dass hier ein hoffnungsvoller Ansatz zur Krebstherapie gegeben ist.

Der letzte Ansatz betrifft den negativen Regelkreis zwischen TP53 und MDM2. Ziel ist eine Inhibition von MDM2 und somit ein Wegfall der negativen *feedback*-Schleife mit einer letztendlich höheren Konzentration an TP53. Viele verschiedene Substanzen wurden getestet; eine potentielle Wirkstoffklasse ist die der Nutline. Nutline sind Imidazolin-Abkömmlinge, die mit der Bindetasche von TP53 am MDM2-Protein interagieren und somit keine Bindung zwischen TP53 und MDM2 mehr zulassen, wobei das Enantiomer Nutlin-3a am vielversprechendsten erscheint (Vassilev et al., 2004). Seitdem wurden mehrere Studien mit verschiedenen Nutlin-Derivaten in vielen Tumorzelllinien durchgeführt, die alle vielversprechende Ergebnisse liefern (Tovar et al., 2011) (Ghosh et al., 2013). Größtenteils wurde jedoch die Abhängigkeit der Nutlin-Wirkung von vorhandenem Wildtyp-TP53 beschrieben, so dass sich hier vielleicht eher ein Einsatz bei Tumoren, die durch eine Überaktivität von MDM2 entstehen, abzeichnet (Villalonga-Planells et al., 2011). Eine andere Substanz ist RITA (*reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis*), welche wahrscheinlich an TP53 bindet und eine Konformationsänderung bewirkt, die eine Interaktion zwischen TP53 und MDM2

unmöglich macht (Issaeva et al., 2004). Auch hier folgten Studien, die eine Hemmung des Wachstums in mehreren Tumorzelllinien, sowie die Induktion von Apoptose und die Wiederherstellung der Transaktivierungsfunktion von ursprünglich an *hot spots* mutierten Zelllinien zeigten (Zhao et al., 2010). Eine andere Möglichkeit, in den TP53-MDM2-Zyklus einzugreifen, besteht in der Blockade der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von MDM2 (siehe 1.2.2), durch die der Abbau von TP53 in den Proteasomen gehemmt werden würde. Da Ubiquitin-Ligasen eine Vielzahl von Proteinen beeinflussen, besteht allerdings die Schwierigkeit, einen selektiven Inhibitor für TP53 auszumachen, so dass die Forschung hier insgesamt noch am wenigsten fortgeschritten ist (Macchiarulo et al., 2011).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Krebstherapie durch Beeinflussung von TP53 noch ein relativ neues Feld der Wissenschaft darstellt, sich in der Kürze der Zeit aber schon vielversprechende Ansätze für die Zukunft ausmachen lassen. Dies wird vor allem durch die vielen Angriffsmöglichkeiten im TP53-Netzwerk möglich, die zudem noch nicht komplett bekannt sind und somit in nächster Zeit noch neue Erkenntnisse vermuten lassen.

### 1.3 Mutationsheterogenität in Karzinomen

Über die Karzinogenese des Magenkarzinoms ist nach wie vor nur wenig bekannt. Dies liegt zum einen an der Heterogenität der zellulären Zusammensetzung, die auch in der histologischen Klassifikation deutlich wird, zum anderen an der Vielzahl der molekularen Läsionen, die bei der Entwicklung des Magenkarzinoms beschrieben sind (Ming, 1998). Dabei ist die Inaktivierung von *TP53* durch Mutationen oder Allelverlust das häufigste Vorkommnis und zwar sowohl in gut differenzierten als auch in schlecht differenzierten Magenkarzinomen. Viele andere Läsionen können dagegen eher bestimmten histologischen Typen des Magenkarzinoms beziehungsweise einer Differenzierungsstufe zugeordnet werden, was die Frage nach einer zumindest teilweise voneinander abweichenden Karzinogenese der unterschiedlichen Typen des Magenkarzinoms aufwirft (Tahara, 1993).

Vor diesem Hintergrund muss dargestellt werden, dass seit einigen Jahren die Heterogenität von Mutationen innerhalb desselben Tumors und auch dessen Metastasen bekannt ist. Dies ist für *TP53* in mehreren Tumorarten (vor allem im kolorektalen

Karzinom (Buob et al., 2012) (Fukunari et al., 2003)) beschrieben und auch hier in Zusammenhang mit dem Ablauf der Karzinogenese zu sehen.

Dabei kristallisieren sich zwei Standpunkte heraus: Die eine Hypothese besagt, dass Tumorzellen in der Lage sind den Primärverbund zu verlassen, bevor Mutationen in *TP53* auftreten und diese dementsprechend nicht für eine Metastasierung erforderlich sind. Offner veröffentlichte eine Studie, in der der *TP53*-Status von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen mit dem von zugehörigen Mikrometastasen aus dem Knochenmark verglichen wird. Während Mutationen in *TP53* dort mit rund 47 % im Primärtumor vorhanden waren, zeigte sich keine Korrelation mit den in den Mikrometastasen vorhandenen Mutationen (Offner et al., 1999). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Unterschiede im Mutationsstatus zwischen Primärtumoren und Metastasen nicht nur *TP53* betreffen, sondern allgemein eine große Heterogenität zwischen chromosomalen Aberrationen in Brustkrebs-Primärtumoren und deren Knochenmarkmetastasen besteht (Schmidt-Kittler et al., 2003). Zu ähnlichen Resultaten gelangt Fukunari, der den Verlust der Heterozygotie mehrerer Tumorsuppressorgene in kolorektalen Karzinomen auf ihre Heterogenität innerhalb verschiedener Bereiche des Primärtumors, sowie in den zugehörigen Lebermetastasen untersucht hat (Fukunari et al., 2003).

Andere Autoren gehen dagegen davon aus, dass *TP53*-Mutationen frühzeitig in der Karzinogenese stattfinden und Tumore eventuell sogar erst zur Metastasierung befähigen. Albanese hat in einer Studie den *TP53*-Mutationsstatus von kolorektalen Karzinomen mit dem von zugehörigen Lebermetastasen verglichen. Bei einem übereinstimmenden Mutationsstatus von 67 % (10 von 15) zwischen den beiden Proben wird hier davon ausgegangen, dass Zellen mit Mutationen in *TP53* eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, direkt an der Tumorausbreitung beteiligt zu sein (Albanese et al., 2004). Eine weitere Studie, die ebenfalls an kolorektalen Karzinomen durchgeführt wurde, belegt, dass *TP53*-Mutationen in Zelllinien von präneoplastischen Polypen über kolorektale Karzinome bis hin zu Lebermetastasen zunehmen. Gleichzeitig weist eine Heterogenität des *TP53*-Mutationsstatus von lediglich 33 % (6 von 18) auf ein frühes Auftreten der Mutation im Primärtumor hin, so dass diese möglicherweise eine Rolle bei der Entwicklung von Metastasen spielt (Kastrinakis et al., 1995).

Es sind bis jetzt nur sehr wenige Studien bekannt, die die Heterogenität von *TP53* in Magenkarzinomen betrachtet haben. Eine Studie zeigt eine Heterogenität des

Mutationsstatus von *TP53* in drei von zwölf Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom. In zwei Fällen ist keine Mutation in der oberflächlichen Tumorschicht zu finden, aber in der Invasionsfront, in einem Fall verhält es sich genau andersherum (Cho et al., 1994). Iwamatsu untersuchte sieben Patienten mit einem superfiziell spreitenden Magenfrühkarzinom, welches in Japan als Magenfrühkarzinom mit einer Größe unter 25 cm<sup>2</sup> definiert ist (Kitamura et al., 1996), wobei von jedem Patienten 10 bis 17 Tumorproben aus der Mucosa und Submucosa entnommen wurden. In drei der sieben Fälle konnte eine Heterogenität im *TP53*-Mutationsstatus innerhalb der Mucosa nachgewiesen werden; dabei traten in einem Primärtumor sowohl zwei unterschiedliche Mutationen auf, als auch Mutationen neben Wildtypgewebe. Vier der sieben Fälle zeigten außerdem Mutationen in der Submucosa, diese entsprachen allesamt Mutationen, die auch in der zugehörigen Mucosa zu finden waren. Vier zusätzlich untersuchte Lymphknotenmetastasen wiesen keine Heterogenität zum zugehörigen Primärtumor auf, desweiteren konnte keine Korrelation zwischen Mutationen und dem histologischen Subtyp hergestellt werden (Iwamatsu et al., 2001). Weiterhin unklar bleibt dabei die Frage, warum Heterogenität in Magenkarzinomen auftritt beziehungsweise wann. Neben den oben schon dargestellten Aspekten der zeitlichen Entwicklung, gibt es zudem die Möglichkeit, dass sich ein Magenkarzinom aus ursprünglich mehreren kleineren Atypien zusammensetzt und dementsprechend später sowohl auf zellulärer (histologische Subtypen) als auch auf molekularer (unterschiedliche Mutationen) Ebene heterogen erscheint (*field cancerization theory*). Da *TP53*-Mutationen und Funktionsverluste trotz dieser Heterogenität bei der Entwicklung von Magenkarzinomen in allen Entitäten auftreten, wird schon lange versucht, *TP53*-Mutationen eine prognostische Wertigkeit zuzuschreiben. Auch dies ist weiterhin umstritten: Es wurde publiziert, dass *TP53*-Überexpression zu einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate führt (Juvan et al., 2007) (Al-Moundhri et al., 2005), aber auch, dass keine Korrelation mit einem verringerten Überleben festgestellt werden konnte (Gonçalves et al., 2011). Eventuell liegt die Ursache dieser konträren Studienlage ebenfalls in der genetischen Heterogenität begründet, die eine eindeutige Klassifikation des Magenkarzinoms beeinträchtigt.

Insgesamt wird sehr deutlich, dass sowohl die Karzinogenese des Magenkarzinoms, die Bedeutung der *TP53*-Mutationen darin und die Heterogenität der Mutationen, als auch die prognostische Aussagekraft, die daraus gezogen werden kann, noch nicht



ausreichend verstanden sind und weitere Arbeiten nötig sein werden, um diese Zusammenhänge besser verstehen zu können.

#### 1.4 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Wie im vorangehenden Abschnitt gezeigt, ist die Karzinogenese des Magenkarzinoms noch weitgehend ungeklärt. So steht beispielsweise die Frage im Raum, ob sich die verschiedenen histologischen Typen des Magenkarzinoms unterschiedlich entwickeln und ob die Ereignisse, die den Weg von der gesunden Zelle hin zur entarteten Zelle markieren, in einen zeitlichen Verlauf gebracht werden können.

Das beobachtete Auftreten von Mutationsheterogenität sowohl innerhalb des Primärtumors als auch zwischen Primärtumor und Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen ist dabei ein wichtiger Aspekt. Durch die Interpretation von Mutationshäufigkeiten und -heterogenität in Tumoren ist es möglich, Aussagen bezüglich der Entwicklung eines Tumors zu treffen. Sind die gleichen Mutationen sowohl im Primärtumor als auch in den Metastasen zu finden, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass diese Mutation vor der Metastasierung aufgetreten ist und die Zelle eventuell erst dazu befähigt, den Primärverbund zu verlassen und zu metastasieren. Ist dagegen eine große Heterogenität in den vom Tumor befallenen Geweben zu finden, scheinen die Mutationen eher später in der Entwicklung entstanden zu sein oder weisen eventuell auch auf eine unterschiedliche Herkunft der Tumorzellen hin (siehe oben, *field cancerization theory*).

In Magenkarzinomen ist eines der wichtigsten und häufigsten Ereignisse während der Karzinogenese der Verlust der Funktion des Tumorsuppressorgens *TP53* und seines gleichnamigen Proteins, vor allem durch Punktmutationen innerhalb der DBD von *TP53*. Durch den Ausfall von *TP53* entfallen Schutzmechanismen während des Zellzyklus und die Steuerung der Apoptose gerät aus dem Gleichgewicht, was eine Zellentartung und Tumorentstehung zulässt. Eine Mutationsheterogenität von *TP53* ist bereits in mehreren Tumoren (vor allem im kolorektalen Karzinom) beschrieben; gerade für Magenkarzinome fehlen aber aussagekräftige Untersuchungen. Dies wäre gerade in Hinblick auf die kontroverse Diskussion über die prognostische Bedeutung der *TP53*-Mutationen und die in letzter Zeit zunehmende Forschung an Therapieoptionen, die beim *TP53*-Protein und seinem Regelkreis ansetzen, erstrebenswert.

Daher wurden in dieser Arbeit systematisch die Inzidenz, die intratumorale und die intertumorale Heterogenität von *TP53*-Mutationen in den Exons 5 bis 8 in Magenkarzinomen untersucht. Es wurden Proben aus dem Tumorzentrum, der Invasionsfront, den etwa bei der Hälfte der Patienten vorhandenen Lymphknotenmetastasen und den Fernmetastasen getestet und ihr Mutationsstatus miteinander verglichen.

Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie hoch ist die Mutationsrate von *TP53* im vorhandenen Patientenkollektiv?
2. Wie sieht das Mutationsspektrum von *TP53* aus?
3. Wie hoch sind intra- und intertumorale Heterogenität?
4. Lassen sich Mutationsrate und genetische Heterogenität mit den klinisch-pathologischen Parametern TNM-Stadium, Grading, Stadium nach AJCC, Subtyp nach Laurén und WHO-Klassifikation korrelieren?
5. Lassen sich aus den gewonnenen Ergebnissen Erkenntnisse über den zeitlichen Verlauf der Karzinogenese des Magenkarzinoms ziehen?
6. Welche Rolle können der Mutationsstatus von *TP53* und die Mutationsheterogenität bei möglichen Therapiekonzepten spielen?

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Methoden**

#### **2.1.1 DNA-Gewinnung**

Die zur Gewinnung von DNA verwendeten Gewebeproben stammen alle aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Diese Arbeit entstand in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf und wurde daher nach den Vorgehensweisen durchgeführt, wie sie im Studienprotokoll der Studie „Molekulare Analysen zur malignen Progression von Tumoren an anonymisierten, Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebeproben aus Altbeständen der Diagnostik (Pathologie), welche nicht mehr für die Diagnostik benötigt werden“ (Studienprotokoll 3821) beschrieben werden. Die Patientendaten wurden dabei pseudonymisiert.

Mithilfe der vorhandenen pathologischen Gutachten und unter Sichtung der bereits vorhandenen Schnitte wurden in jedem Fall repräsentative Schnitte für Tumorzentrum, Tumorfront und eventuell befallene Lymphknoten und/oder Fernmetastasen herausgesucht. Von den jeweils zugehörigen in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurde mit einem Mikrotom ein 0,5 µm dicker Schnitt angefertigt und mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt, sowie fünf 1 µm dicke „Leerschnitte“ ohne Färbung. Auf den HE-Schnitten wurde mithilfe unterschiedlicher Farbgebung für Tumorzentrum, Tumorfront, Lymphknoten und Fernmetastasen das Areal gekennzeichnet, aus welchem DNA isoliert werden sollte.

Die fünf Leerschnitte wurden zunächst 2 x 15 min in Xylol getaucht, danach 2 x 5 min in 100 % Ethanol und anschließend luftgetrocknet. Dieser Schritt dient der Entparaffinierung der Leerschnitte.

Ein Leerschnitt wurde nun über den HE-Schnitt mit dem eingekreisten Bezirk, der isoliert werden sollte, gelegt, so dass genau dieses markierte Material auf dem

Objektträger des Leerschnitts mit Hilfe einer 100 µl-Pipettenspitze entfernt und gewonnen werden konnte. In einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 190 µl G2-Puffer (aus dem „EZ1 DNA Tissue Kit“, Qiagen, Hilden) vorgelegt und das gewonnene Gewebematerial darin gesammelt. Mit den übrigen vier Leerschnitten wurde genauso verfahren. Danach wurden 10 µl Proteinase K (aus dem „EZ1 DNA Tissue Kit“, Qiagen, Hilden) hinzugegeben und das Material im Thermomixer bei 56 °C und 56 rpm mindestens 5 h inkubiert.

Sind nach der Inkubationszeit noch große Mengen Feststoff im Reaktionsgefäß erkennbar gewesen, wurden nochmals 5 µl Proteinase K hinzugegeben und unter gleichen Bedingungen mindestens 15 min. inkubiert.

Danach wurde die DNA mithilfe des Bioroboters „EZ1“ und des „EZ1 DNA Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert, so dass pro Probe 50 µl isolierte gelöste DNA vorlag.

### 2.1.2. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit einem Photometer („BioPhotometer“, Eppendorf AG, Hamburg). 2 µl der gelösten DNA wurden zu 98 µl TE-Puffer gegeben und in einer Küvette dem Photometer zugeführt.

Es wurde die Absorption bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm bestimmt und anhand der folgenden Formel die Konzentration der DNA-Proben berechnet:

$$C(\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{Verdünnung} (2 \mu\text{l}/98 \mu\text{l}) \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Der Quotient aus  $A_{260}/A_{280}$  ergab dabei einem Hinweis auf die Qualität der gewonnenen DNA; er sollte zwischen 1,5 und 2 liegen.

Alle Proben wurden entsprechend der gemessenen Konzentration verdünnt, um letztendlich eine Konzentration von circa 10 ng DNA/µl in jeder Probe zu erhalten.

### 2.1.3 Vervielfältigung der DNA mit der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion oder PCR (vom englischen *polymerase chain reaction*) ist eine Methode um DNA-Fragmente zu vervielfältigen. Sie wird in einem Thermocycler durchgeführt, der in der Lage ist, die Proben für einen festgelegten Zeitraum auf eine bestimmte Temperatur zu bringen.

Eine PCR besteht grundsätzlich aus drei Schritten, die in mehreren Zyklen wiederholt werden.

**1. Schritt: Denaturierung** bei 94 °C – 96 °C

Hierbei werden die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA getrennt, so dass am Ende zwei Einzelstränge vorliegen. Oft wird vor dem ersten Zyklus eine **initiale Denaturierung** über einen längeren Zeitraum als in den nachfolgenden Zyklen gewählt, um sicherzustellen, dass die DNA-Doppelstränge sich vollständig voneinander gelöst haben.

**2. Schritt: Hybridisierung (*annealing*)** bei 55 °C – 65 °C

In diesem Schritt lagern sich die Primer spezifisch an die komplementären Stellen der DNA an.

**3. Schritt: Elongation** bei 68 °C – 72 °C

Die DNA-Polymerase beginnt am freien 3'-OH-Ende eines Primers freie Nukleotide (Desoxyribonucleosidtriphosphate = dNTP's) komplementär zum vorliegenden DNA-Einzelstrang an diesen anzulagern. Dadurch entsteht ab der Anlagerungsstelle des Primers wieder ein DNA-Doppelstrang. Dieser Schritt kann am Ende als **finale Elongation** über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, um zu gewährleisten, dass die DNA-Polymerase an allen Stellen Nukleotide anlagert.

Danach werden die Proben auf 4 °C herunter gekühlt, um den Prozess zu stoppen.

Für diese Arbeit ergaben sich mit den Primern für die Exons 5 bis 8 des *TP53*-Gens folgende PCR-Bedingungen im Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburg) (Tabelle 2.1):

*Tabelle 2.1: PCR-Protokoll für TP53 (Exons fünf bis acht)*

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	35
Hybridisierung	55 °C	30 sec	35
Elongation	72 °C	1 min	35
finale Elongation	72 °C	10 min	1
Kühlung	4 °C	∞	

Damit eine PCR ablaufen kann, muss der Reaktionsansatz folgende Komponenten enthalten:

- DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält
- zwei Primer: den *sense*-Primer und den *antisense*-Primer
- DNA-Polymerase
- dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- Pufferlösung und Magnesiumionen, die die Funktion der DNA-Polymerase sicher stellen

In dieser Arbeit wurde folgender Mastermix pro 25 µl Reaktionsvolumen verwendet (Tabelle 2.2):

**Tabelle 2.2: PCR-Mastermix pro 25 µl Reaktionsvolumen**

Komponenten	Volumen
<i>sense</i> -Primer	1 µl
<i>antisense</i> -Primer	1 µl
2x PCR Mastermix	12,5 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	8,5 µl

Der 2x PCR Mastermix (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) enthält dabei die DNA-Polymerase, die dNTP's, die Pufferlösung und Magnesiumchlorid. Hinzugefügt wurden jeweils 2 µl Proben-DNA. Jeder PCR-Ansatz wurde mit einer Positivkontrolle (Zugabe von 2 µl DNA aus verschiedenen Zellkulturen) und einer Negativkontrolle (Ersatz der DNA durch 2 µl H<sub>2</sub>O) durchgeführt. Zu den Primersequenzen siehe 2.2.7.

#### 2.1.4. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese stellt eine Methode dar, DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe mit Hilfe eines elektrischen Feldes aufzutrennen und „sichtbar“ zu machen. Somit ergibt sich nach einer PCR die Möglichkeit zu überprüfen, ob der amplifizierte DNA-Abschnitt der erwarteten Größe entspricht und damit das gewünschte Produkt vervielfältigt wurde.

Dazu wurden jeweils zu 5 µl der in der PCR gewonnenen Proben 1,5 µl 6x *loading dye* gegeben. Dieser Ladepuffer enthält Bromphenolblau, einen Farbstoff, der einen Anhaltspunkt liefert, wie weit die jeweilige Gelelektrophorese fortgeschritten ist. Die Proben wurden nun in die Geltaschen eines 2%igen Agarosegels, welches vorher hergestellt wurde, in einer Elektrophoresekammer pipettiert. Das Agarosegel wurde dabei mit Ethidiumbromid versetzt. Dies ist ein Farbstoff, der zwischen die Basen der DNA interkaliert und dabei vermehrt fluoresziert. Dies kann durch ultraviolettes Licht sichtbar gemacht werden (s.u.)

Zusätzlich lief ein 50-Basenpaar-Marker mit, der es erlaubt, nach der Gelelektrophorese die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente zu bestimmen.

Es wurde eine elektrische Spannung von 85 mV für 60 min angelegt. Dadurch wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente durch das Agarosegel hindurch zur positiv geladenen Anode. Kleinere Fragmente gelangen dabei schneller durch die Poren der Gelmatrix und legen daher in der gleichen Zeit einen weiteren Weg zurück als größere Proteine, wodurch sie voneinander getrennt werden.

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden auf dem Gel mit Hilfe von im UV-Licht vermehrt fluoreszierendem Ethidiumbromid sichtbar gemacht und konnten so auf die Größe der DNA-Fragmente überprüft werden (siehe Abbildung 2.1).

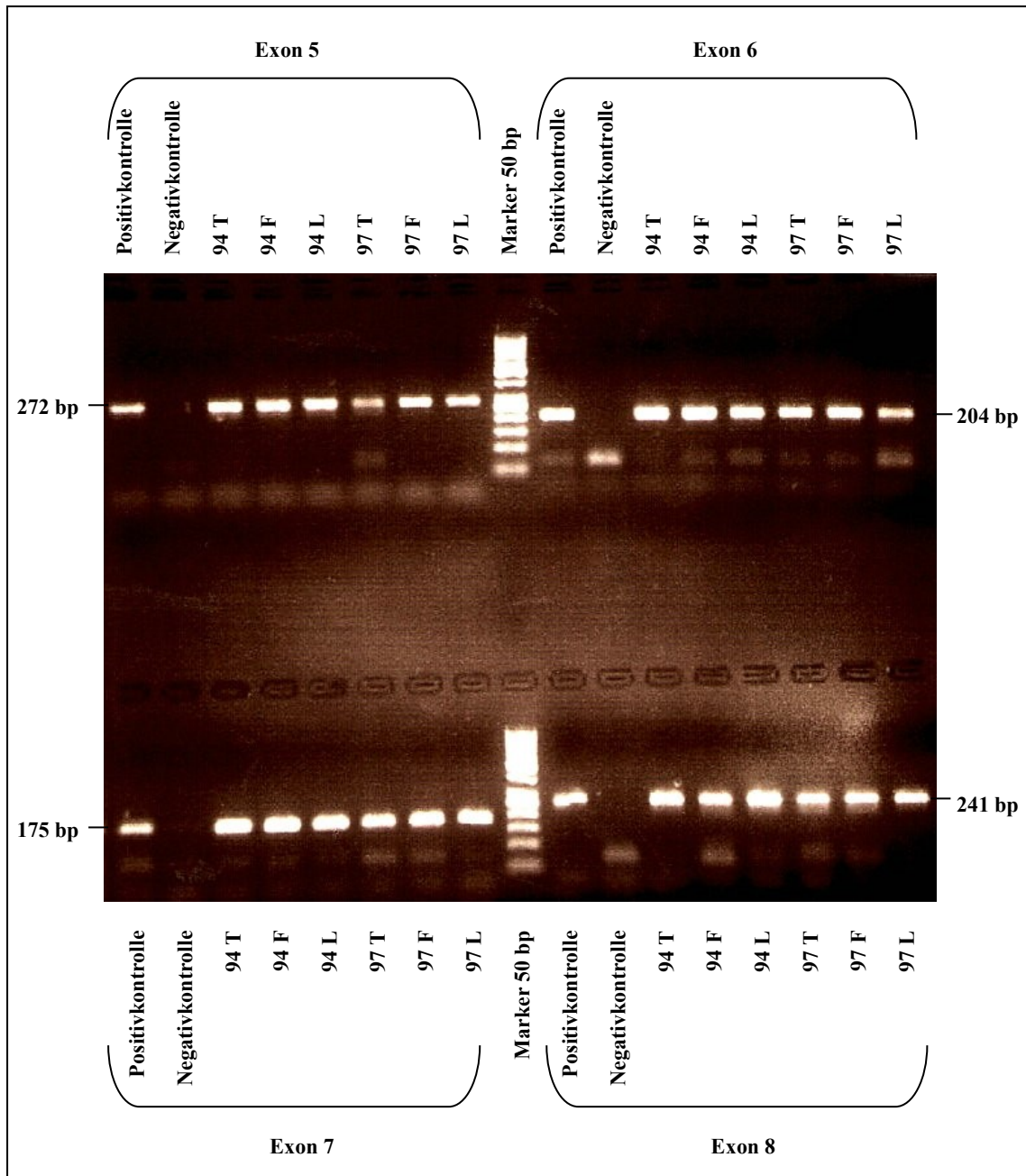


Abbildung 2.1: Gelelektrophorese der Fälle 94 und 97. Zu sehen sind die auf dem Gel mit Hilfe von im UV-Licht fluoreszierendem Ethidiumbromid sichtbar gemachten DNA-Banden bei 272 bp (Exon 5), 204 bp (Exon 6), 175 bp (Exon 7) und 241 bp (Exon 8). Zur Kontrolle wurde pro Exon eine Positiv- und eine Negativkontrolle angesetzt, sowie zur korrekten Auswertung ein 50-Basenpaar-Marker.

T = Tumorzentrum, F = Tumorfront, L = Lymphknotenmetastase, bp = Basenpaare



### 2.1.5. Aufreinigung der DNA

Die nach der Gelelektrophorese noch verbleibenden 20 µl jeder DNA-Probe wurden nun nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt, um überschüssige Enzyme, Primer, dNTP's und andere Reaktionsrückstände zu entfernen und so eine fehlerfreie Sequenzierung zu ermöglichen.

Zur jeweiligen Probe wurden dabei zunächst 100 µl eines im Kit enthaltenen PB(„*binding*“)-Puffers pipettiert und das Gemisch auf eine Silikamembran gegeben, die die DNA bindet. Dies erfolgte in einer Zentrifuge mit 13.000 rpm für 60 s. Anschließend wurden 750 µl PE(„*washing*“)-Puffer (ebenfalls im Kit enthalten) auf die Membran pipettiert und 2 x 60 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Während der ersten Zentrifugation werden die Reaktionsrückstände ausgewaschen; die zweite Zentrifugation dient dazu, Rückstände des PE-Puffers aus der Membran mit der DNA zu entfernen. Als letzter Schritt erfolgte die Elution der DNA mittels 30 µl H<sub>2</sub>O, welches auf die Membran pipettiert wird und nach 60 s Wartezeit während einer erneuten Zentrifugation mit 13.000 rpm die DNA aus der Membran herauslöst. So lagen am Ende pro Probe 30 µl gelöste und aufgereinigte DNA vor.

### 2.1.6. Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung der DNA-Proben erfolgte als Auftragsleistung im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Dort erfolgt die Sequenzierung mit Hilfe der Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Dabei wird zunächst eine Denaturierung der amplifizierten und aufgereinigten DNA durchgeführt, so dass DNA-Einzelstränge vorliegen. In den Ansatz werden nun die *sense*-Primer für die Exons 5 bis 8 des *TP53*-Gens (um die DNA linear amplifizieren zu können) und dNTP's, sowie jede Base als genau definierte Menge Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) hinzugegeben. Die ddNTP's besitzen keine freie 3'-OH-Gruppe, so dass nach deren Einbau in den neu synthetisierten Strang ein gezielter Abbruch der Sequenzierreaktion erfolgt, da die DNA-Polymerase keine Verknüpfung zur Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids herstellen kann. Zusätzlich sind die ddNTP's mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen (sogenannte „*Dye*

*Terminatoren*“). Mit Hilfe des „ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer“ erfolgt eine Auftrennung der unterschiedlich langen DNA-Fragmente durch eine automatisierte Kapillarelektrophorese. Die DNA-Fragmente werden an einem Detektor vorbeigeführt, so dass es nun über die fluoreszenzmarkierten ddNTP's möglich ist ein Chromatogramm zu erstellen, welches über die Software „Chromaslite“ die Sequenz des amplifizierten Bereiches graphisch zeigt (siehe Abbildung 2.2). Anschließend wurde genau der gleiche Prozess mit den *antisense*-Primern durchgeführt, da sich herausstellte, dass mit den *sense*-Primern alleine keine komplette Darstellung der Exons möglich war. Die weitere Auswertung erfolgte zudem mit dem Programm „BLAST“ des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI), das einen Vergleich der Proben-DNA-Sequenz mit der Wildtyp-Sequenz erlaubt.

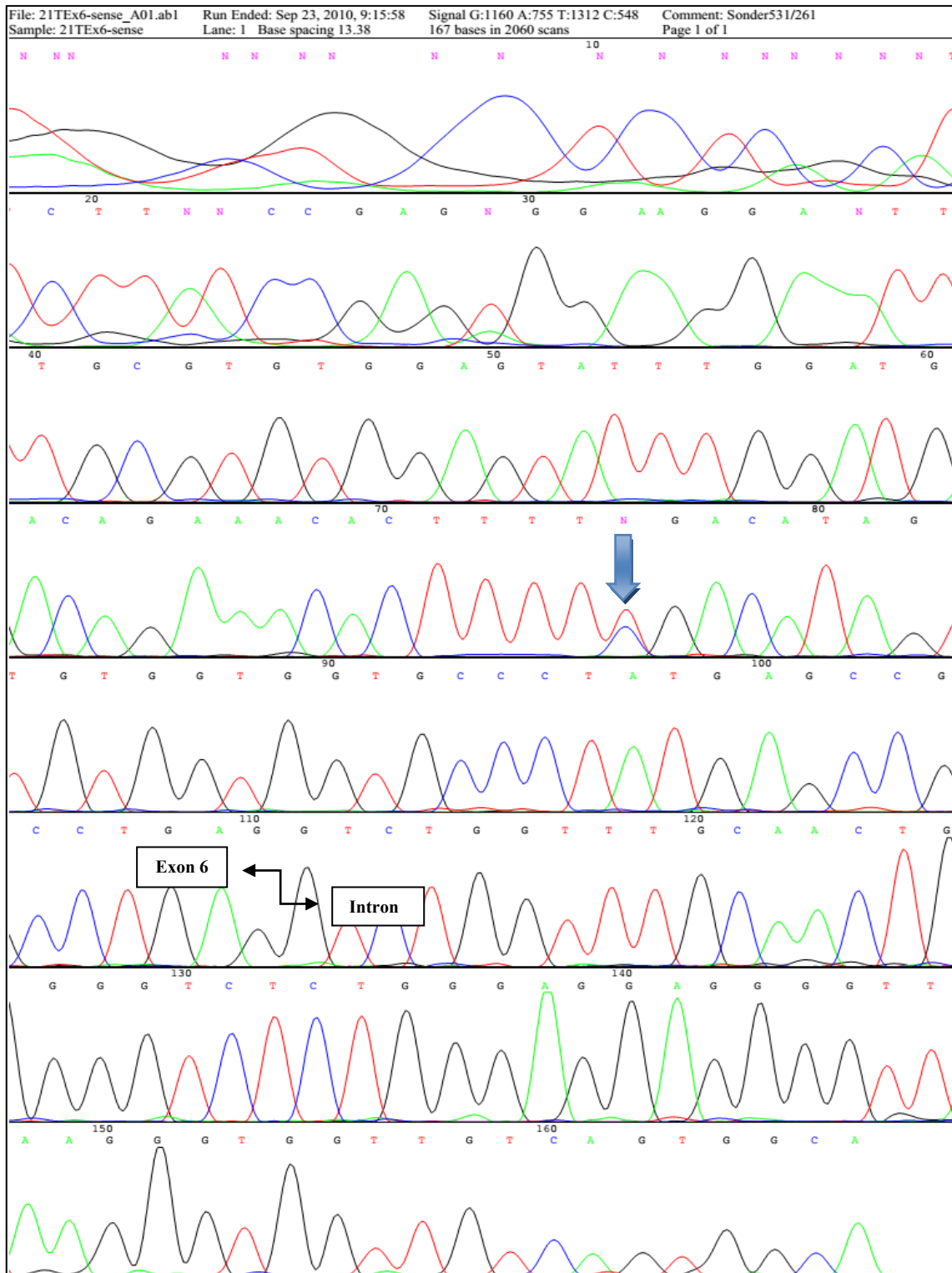


Abbildung 2.2: Chromatogramm der Basensequenz von Exon 6, welche sich mit dem sense-Primer darstellen lässt. Die Basenabfolge ist hierbei durch die graphische Darstellung, bei der jede Base durch eine Farbe codiert wird, abzulesen. Der gewinkelte schwarze Pfeil kennzeichnet den Übergang von Exon zu Intron. Der gerade blaue Pfeil zeigt auf eine Punktmutation, bei der Cytosin (Darstellung durch „blau“) gegen Thymin (Darstellung durch „rot“) ausgetauscht ist. Dies führt dazu, dass nicht mehr die Aminosäure Arginin codiert wird, sondern ein Stop-Codon (nonsense-Mutation). Bei einem Wildtyp wäre an gleicher Stelle nur ein blauer Peak für die Base Cytosin zu finden.

### 2.1.7. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde der Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson eingesetzt. In diesem Test werden nominal skalierte beobachtete und erwartete Häufigkeiten in einer Kreuztabelle miteinander verglichen. Somit wird überprüft, ob Beobachtungs- und Erwartungswerte voneinander unabhängig sind.

Für jedes Feld der Tabelle wird dabei die Differenz aus beobachteten und erwarteten Häufigkeiten gebildet, diese quadriert und durch die erwartete Häufigkeit dividiert. Der Chi<sup>2</sup>-Wert berechnet sich dann aus der Summe der einzelnen Werte der Felder und hat demnach folgende Formel:

$$\chi^2 = \sum (\text{Häufigkeit}_{\text{beobachtet}} - \text{Häufigkeit}_{\text{erwartet}})^2 / \text{Häufigkeit}_{\text{erwartet}}$$

Aus dem Chi<sup>2</sup>-Wert lässt sich die entsprechende Signifikanz p ableiten, also die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Ereignis nicht zufällig ist. Ein p-Wert über 0,05 gilt dabei als nicht signifikant, ein p-Wert unter 0,05 als signifikant und ein p-Wert unter 0,01 als hoch signifikant.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Chemikalien

Agarose, Peq Gold universal	peqLab Biotechnologie GmbH	Erlangen
Borsäure	Merck kGaA	Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-aldrich GmbH	Deisenhofen
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH	St. Leon Rot
Eosin	Merck kGaA	Darmstadt
Ethidiumbromidlösung (1%) 10 mg/ml	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Ethanol absolute pro analysi 100%	Merck kGaA	Darmstadt
Hämatoxylin	Merck kGaA	Darmstadt
6 x Loading Dye	Fermentas GmbH	St. Leon Rot
Proteinase K	Merck kGaA	Darmstadt
Tris-base	Sigma-aldrich GmbH	Deisenhofen
Tris-HCl	Sigma-aldrich GmbH	Deisenhofen
Xylol absolute pro analysi	Merck kGaA	Darmstadt

## 2.2.2 Rezepturen

### Agarosegel 2%

1,6 g Agarosepulver  
80 ml TBE-Puffer  
4 µl Ethidiumbromid

### DEPC-Wasser

200 µl DEPC  
ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O

### TBE-Puffer (5x)

108 g Tris-base (890 nM)  
55 g Borsäure  
40 ml EDTA (0,5 M, pH 8.0)

### TE-Puffer

12 mg Tris-HCl (10 mM, pH 8.0)  
200 µl EDTA (0,5 M, pH 8.0)  
ad 100 ml aqua bidest.

## 2.2.3 Geräte

Digital Graphic Printer UP-D890	Biometra GmbH	Göttingen
Elektrophorese-Kammern	Biometra GmbH	Göttingen
Elektrophoresesystem Biometra Gel	Biometra GmbH	Göttingen
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf AG	Hamburg
Kühlschränke	Liebherr AG	Bulle (Schweiz)
	Bosch	Stuttgart
IKA MS 2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen
Mikroskop	Leitz	Wetzlar
Mikrowelle Micromat	AEG	Nürnberg
PCR-Gerät Mastercycler Gradient	Eppendorf AG	Hamburg

Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf AG	Hamburg
Photometer BioPhotometer	Eppendorf AG	Hamburg
Spannungsgeber PowerPac P25	Biometra GmbH	Göttingen
Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments	Chiba (Japan)
Tiefkühltruhe (- 80°C)	Hettich	Tuttlingen
Transilluminator 312 nm BioDoc Analyze	Biometra GmbH	Göttingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries	Bohemia (N.Y. USA)
Waage Kern 440-33	RS-Wägetechnik	Dorsten
Zentrifuge Mikro 20	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen
Zentrifuge Micro D	Thermo Fisher Scientific GmbH	Dreieich

### 2.2.4 Kits

EZ1 DNA Tissue Kit	Qiagen	Hilden
2X PCR Mastermix	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	Hilden

### 2.2.5 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Starfrost Engelbrecht GmbH	Edermünde
Falconröhrchen	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Flat Cap Strips	BioRad	München
Kryotubes	Thermo Fisher Scientific GmbH	Dreieich
Objektträger (ca. 76x26 mm/3x1 inch) 50x	Starfrost Engelbrecht GmbH	Dreieich
Parafilm	American National Can TM	Chicago (USA)
PCR Plates ABgene	Thermo Fisher Scientific GmbH	Dreieich
PCR-Sealers Microseal 'B' Film	BioRad	München
PCR Tube Strips	BioRad	München
Pipettenspitzen	StarLab GmbH	Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5-2 mL)	Eppendorf AG	Hamburg

## 2.2.6 Programme und Datenbanken

### 2.2.6.1 Programme

Chromas lite

BLAST

Bio Doc Analyze

### 2.2.6.2 Datenbanken

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (BLAST)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (PubMed)

### 2.2.7 Primer

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	T <sub>M</sub> in °C	Größe des Amplifikats in bp
p53 Exon 5 sense	CTTGTGCCCTGACTTTCAACTCTGTCTC	55	272
p53 Exon 5 antisense	TGGGCAACCAGCCCTGTCGTCTCTCCA		
p53 Exon 6 sense	CCAGGCCTCTGATTCTCACTGATTGCTC	55	204
p53 Exon 6 antisense	GCCACTGACAACCACCCTTAACCCCTC		
p53 Exon 7 sense	GCCTCATCTTGGGCCTGTGTTATCTCC	55	175
p53 Exon 7 antisense	GGCCAGTGTGCAGGGTGGCAAGTGGCTC		
p53 Exon 8 sense	GTAGGACCTGATTTCTTACTGCCTCTTG C	55	241
p53 Exon 8 antisense	ATAACTGCACCCTTGGTCTCCTCCACCGC		

### 2.3 Patientenkollektiv

In diese Arbeit wurden initial 100 Patienten mit einem Magenkarzinom eingeschlossen (m=68; w=32), die im Zeitraum von 1995 bis 2003 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf operiert wurden. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation des Primärtumors lag bei 67,5 Jahren. 76 dieser Patienten hatten eine oder mehrere histologisch gesicherte Lymphknotenmetastasen, bei fünf Patienten hatte der Tumor zusätzlich Fernmetastasen in Leber, Milz, Peritoneum oder einem mediastinal gelegenen Lymphknoten ausgebildet; bei einer Patientin war eine Peritonealkarzinose, jedoch kein Lymphknotenbefall nachgewiesen worden. Von den 76 Patienten mit Lymphknotenmetastasen konnten bei elf die Lymphknotenmetastasen nicht weiter für diese Arbeit verwendet werden, da der vom Tumor befallene Bezirk innerhalb des Lymphknotens zu gering war, um daraus repräsentative DNA gewinnen zu können. Von diesen Patienten wurden jedoch das Tumorzentrum und die Invasionsfront weiter untersucht. Auch das Gewebe einer Fernmetastase konnte aus dem gleichen Grund nicht weiter untersucht werden, von diesem Patienten wurden Tumorzentrum, Invasionsfront und Lymphknotenmetastase in die Arbeit aufgenommen.

Im weiteren Verlauf erwies sich die DNA in mehreren Proben als so geschädigt, dass sie nicht in ausreichendem Maße amplifiziert und ausgewertet werden konnte, so dass 24 Patienten aus dem Kollektiv ausgeschlossen wurden. Von den letztendlich in dieser Arbeit eingeschlossenen 76 Patienten (m=52; w=24) hatten 57 zusätzlich eine oder mehrere Lymphknotenmetastasen, von denen 48 untersucht wurden. Vier Patienten hatten zusätzlich Fernmetastasen in Leber, Milz oder Peritoneum, von diesen konnten drei bearbeitet werden. Das durchschnittliche Alter zum Operationszeitpunkt betrug somit 68,16 Jahre; der jüngste Patient war 37 Jahre, der älteste 91 Jahre alt.

Die Einteilung nach der TNM-Klassifikation (Sobin et al., 2009) ist in Tabelle 2.3 dargestellt.



Tabelle 2.3: Einteilung des untersuchten Kollektivs nach der TNM-Klassifikation

pT	Anzahl der Patienten	pN	Anzahl der Patienten	pM	Anzahl der Patienten	G	Anzahl der Patienten
<b>1</b>	1	<b>0</b>	19	<b>0</b>	72	<b>1</b>	1
<b>2</b>	7	<b>1</b>	8	<b>1</b>	4	<b>2</b>	13
<b>3</b>	43	<b>2</b>	12			<b>3</b>	62
<b>4a</b>	25	<b>3a</b>	13				
<b>4b</b>	0	<b>3b</b>	24				

Alle pathologischen Befunde wurden an den heute gültigen Standard anhand der 7. Auflage der Kriterien nach AJCC angepasst. Die Zuordnung des untersuchten Kollektivs zu den einzelnen Stadien ist Tabelle 2.4 zu entnehmen.

Tabelle 2.4: Stadieneinteilung des untersuchten Kollektivs nach AJCC

Stadium nach AJCC	Anzahl der Patienten
Stadium 0	0
Stadium IA	1
Stadium IB	5
Stadium IIA	12
Stadium IIB	7
Stadium IIIA	12
Stadium IIIB	20
Stadium IIIC	15
Stadium IV	4

Außerdem erfolgte eine Einteilung der Tumore gemäß des Subtyps nach Laurén und eine Einteilung nach histopathologischen Kriterien gemäß der WHO-Klassifikation (Tabellen 2.5 und 2.6).

*Tabelle 2.5: Einteilung des untersuchten Kollektivs gemäß Subtyp nach Laurén*

Subtyp nach Laurén	Anzahl der Patienten
intestinaler Typ	24
diffuser Typ	26
Mischtyp	26

*Tabelle 2.6: Einteilung des untersuchten Kollektivs nach histopathologischen Kriterien gemäß der WHO-Klassifikation. Das gemischte Adenokarzinom setzte sich hier aus Bestandteilen des tubulären Adenokarzinoms und des Siegelringzellkarzinoms zusammen.*

WHO-Klassifikation	Anzahl der Patienten
papilläres/tubuläres Adenokarzinom	47
muzinöses Adenokarzinom	3
Siegelringzellkarzinom	24
gemischtes Adenokarzinom	1
medulläres oder lymphoepitheliales Karzinom	1

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Mutationsrate

Es konnten in 34 der untersuchten 76 Primärtumoren von Magenkarzinomen Mutationen im *TP53*-Gen gefunden werden (44,7 %). Bei einem Patienten ließen sich dabei zwei unterschiedliche Mutationen im Tumorzentrum und in der Invasionsfront nachweisen. Außerdem enthielten zwei Tumorzentren jeweils zwei Mutationen, in einem Fall waren beide Mutationen im gleichen Exon zu finden. Bei den übrigen 42 Patienten konnte im Primärtumor keine Mutation nachgewiesen werden; sie wiesen demnach Wildtyp-Status auf (55,3 %).

Von den untersuchten 48 Lymphknotenmetastasen der Magenkarzinome enthielten 17 eine Mutation des *TP53*-Gens (35,4 %). In einem Lymphknoten konnten dabei zwei Punktmutationen (davon eine *nonsense*-Mutation) sowie zwei stumme Mutationen nachgewiesen werden. 31 Lymphknoten wiesen Wildtyp-Status auf (64,6 %). In zwei der drei betrachteten Fernmetastasen der Magenkarzinome fand sich ebenfalls eine Mutation (66,7 %), wobei diese Mutationen auch in den jeweils zugehörigen Lymphknoten zu verzeichnen war. Eine Fernmetastase hatte Wildtyp-Status (33,3 %).

#### 3.2 Mutationsspektrum

Um das Mutationsspektrum der Exons 5 bis 8 des *TP53*-Gens in Magenkarzinomen zu bestimmen, wurden die Mutationen im Tumorzentrum und in der Invasionsfront betrachtet; Mutationen, die ausschließlich in Lymphknoten oder Fernmetastasen auftraten, wurden nicht gewertet. Demnach umfasste das Mutationsspektrum der Primärtumoren insgesamt 37 Mutationen, die sich aus 33 Punktmutationen, drei Deletionen (zwei 1-Basen-Deletionen und eine 17-Basen-Deletion) und einer Insertion (37-Basen-Insertion) zusammensetzten (Abbildung 3.1).

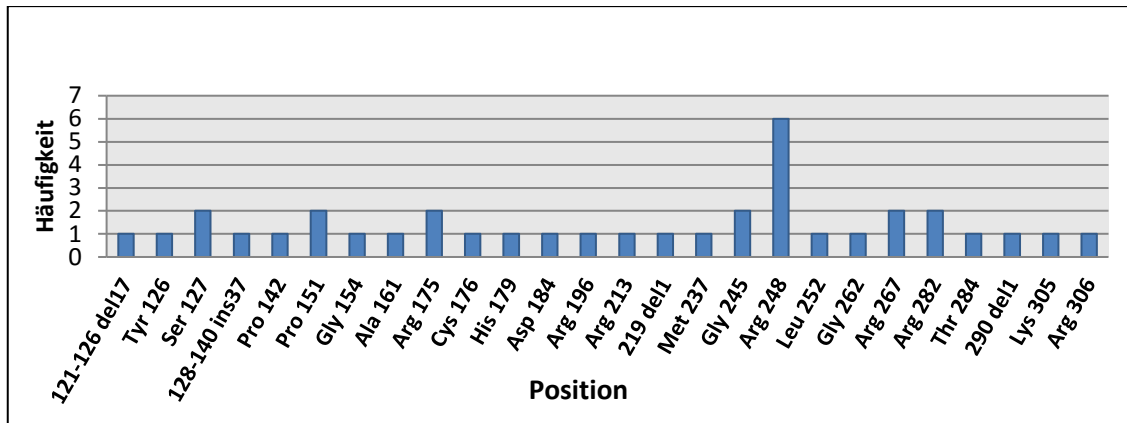


Abbildung 3.1: Mutationsspektrum der Exons 5 bis 8 von TP53 in Magenkarzinomen. Mit Abstand am häufigsten ist die Position 248 mit sechs Mutationen (16,2 % aller Mutationen) von einer Punktmutation betroffen.

In drei Fällen entstand eine *nonsense*-Mutation, das heißt das neu entstandene Triplet codiert ein Stop-Codon, welches die Translation an dieser Stelle unterbricht. Die übrigen 30 Punktmutationen waren *missense*-Mutationen, bei denen eine andere Aminosäure codiert wird. In einem Fall war das Start-Codon ATG betroffen.

40,5 % der Mutationen waren in Exon 5 zu finden, 8,1 % in Exon 6, 29,7 % zeigten sich in Exon 7 und 21,6 % in Exon 8.

Mit Abstand am häufigsten war das die Aminosäure Arginin codierende Triplet an Position 248 mit 16,2 % von einer Punktmutation betroffen. Dabei war zu 2/3 ein Austausch der zweiten Base des Triplets Guanin gegen Adenosin vorhanden, so dass die Aminosäure Glutamin codiert wird. Im restlichen 1/3 der Fälle erfolgte ein Austausch der ersten Triplet-Base Cytosin durch Tyrosin, folglich wird die Aminosäure Tryptophan codiert.

Es folgten mit jeweils 5,4 % Punktmutationen in den Triplets an den Positionen 175, 267 und 282, die ebenfalls Arginin codieren, sowie in den Triplets an den Positionen 127 (codiert Serin), 151 (codiert Prolin) und 245 (codiert Glycin).

Vier weitere Punktmutationen waren ausschließlich in Lymphknoten zu finden, darunter eine *nonsense*-Mutation. Außerdem wurden in Primärtumor und Lymphknoten insgesamt sieben stumme Mutationen gefunden, bei denen es zwar eine Punktmutation gab, das neu entstehende Triplet aber dieselbe Aminosäure codiert wie das ursprüngliche Triplet.

### 3.3 Heterogenität der *TP53*-Mutationen

#### 3.3.1 Intratumorale Heterogenität

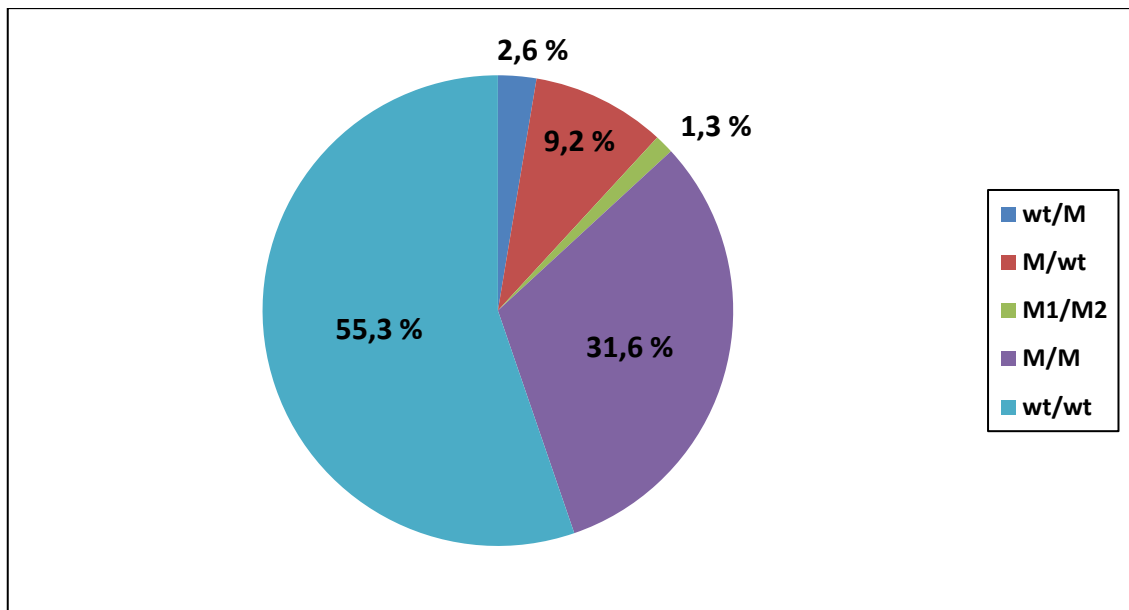
Intratumorale Heterogenität bezeichnet in dieser Arbeit eine Divergenz zwischen Tumorzentrum und Invasionsfront bezüglich vorhandener Mutationen in den Exons 5 bis 8 des *TP53*-Gens in Magenkarzinomen. Eine Heterogenität liegt also vor, wenn eine Mutation nur in einem Areal (Tumorzentrum oder Invasionsfront) auftritt, bzw. unterschiedliche Mutationen in beiden Arealen vorhanden sind.

Insgesamt wurden in 34 von 76 Fällen Mutationen im Primärtumor gefunden (44,7 %). In zehn Primärtumoren war dabei eine intratumorale Heterogenität zu verzeichnen. Das entspricht 13,2 % an allen 76 untersuchten Primärtumoren und 29,4 % an den 34 Fällen mit Mutationen. Dabei war bei sieben Patienten die Mutation nur im Tumorzentrum zu finden (9,2 % von 76; 20,6 % von 34), während zwei Patienten eine Mutation lediglich in der Invasionsfront aufwiesen (2,6 % von 76; 5,9 % von 34). In einem Primärtumor war in Tumorzentrum und Invasionsfront jeweils eine unterschiedliche Mutation zu beobachten (1,3 % von 76; 2,9 % von 34).

In 24 Primärtumoren war dagegen keine intratumorale Heterogenität zu verzeichnen, sondern jeweils die gleiche Mutation in Tumorfront und Invasionszentrum (31,6 % an 76).

Die restlichen 42 untersuchten Tumorproben wiesen sowohl im Tumorzentrum als auch in der korrespondierenden Invasionsfront Wildtyp-Status auf (55,3 % an 76).

Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3.2 dargestellt.



*Abbildung 3.2: Darstellung der intratumoralen Heterogenität (Vergleich der Mutationen in Tumorzentrum und Invasionsfront) des TP53-Gens (Exons 5 bis 8) in Magenkarzinomen. Eine intratumorale Heterogenität liegt in 13,1 % (wt/M + M/wt + M1/M2) vor.*

*wt/M (dunkelblau) = Tumorzentrum Wildtyp, Tumorfront mutiert*

*M/wt (rot) = Tumorzentrum mutiert, Tumorfront Wildtyp*

*M1/M2 (grün) = unterschiedliche Mutationen in Tumorzentrum und Tumorfront*

*M/M (lila) = gleiche Mutation in Tumorzentrum und Tumorfront*

*wt/wt (hellblau) = Tumorzentrum und Tumorfront Wildtyp*

### 3.3.2 Intertumorale Heterogenität

#### 3.3.2.1 Primärtumor vs. Lymphknoten

Intertumorale Heterogenität bezeichnet in dieser Arbeit eine Divergenz zwischen Primärtumor und befallenen Lymphknoten oder Fernmetastasen bezüglich vorhandener Mutationen in den Exons 5 bis 8 des TP53-Gens. Hierbei werden Tumorzentrum und Invasionsfront zum „Primärtumor“ zusammengefasst. Eine Heterogenität liegt demnach vor, wenn eine Mutation im Primärtumor (Tumorzentrum oder Invasionsfront) auftritt, jedoch nicht in der korrespondierenden Lymphknoten- bzw. Fernmetastase, oder eine Mutation im befallenen Lymphknoten oder der Fernmetastase sichtbar wird, jedoch nicht im Primärtumor (weder Tumorzentrum noch Invasionsfront).

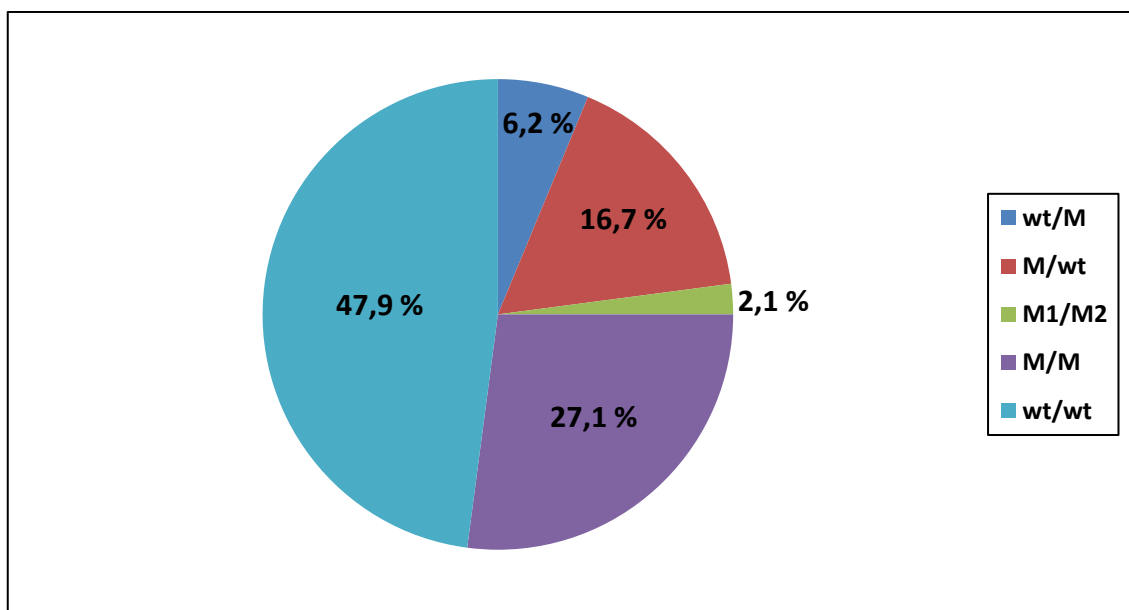
Insgesamt wurden 48 Patienten mit Lymphknotenmetastasen untersucht. Von diesen enthielten 25 Mutationen (52,1 %). Betrachtet man nun die intertumorale Heterogenität,

ergibt sich eine Anzahl von 12 Fällen, was einen Anteil von 25 % an allen 48 betrachteten Fällen und 48 % an den 25 Fällen mit Mutationen ergibt. Bei acht Patienten zeigte sich die Mutation im Primärtumor, jedoch nicht im befallenen Lymphknoten (16,7 % von 48; 32 % von 25), während in drei Fällen die Mutation in der Lymphknotenmetastase sichtbar wurde ohne im Primärtumor aufzutauchen (6,2 % von 48; 12% von 25). In einem Fall zeigten sich unterschiedliche Mutationen im Primärtumor und in der Lymphknotenmetastase (2,1% von 48; 4% von 25).

In 13 Fällen war die gleiche Mutation in Primärtumor und Lymphknotenmetastasen zu verzeichnen, es herrschte also keine intertumorale Heterogenität (27,1 % von 48).

23 Proben wiesen in Primärtumor und befallenen Lymphknoten Wildtyp-Status auf (47,9 % von 48).

Eine Übersicht zu diesen Ergebnissen findet sich in Abbildung 3.3.



**Abbildung 3.3:** Darstellung der intertumorale Heterogenität (Vergleich der Mutationen in Primärtumor und Lymphknotenmetastasen) des TP53-Gens (Exons 5 bis 8) in Magenkarzinomen.

Eine intertumorale Heterogenität liegt in 25 % ( $wt/M + M/wt + M1/M2$ ) vor.

*wt/M (dunkelblau) = Primärtumor Wildtyp, Lymphknotenmetastase mutiert*

*M/wt (rot) = Primärtumor mutiert, Lymphknotenmetastase Wildtyp*

*M1/M2 (grün) = unterschiedliche Mutationen in Primärtumor und Lymphknotenmetastase*

*M/M (lila) = gleiche Mutation in Primärtumor und Lymphknotenmetastase*

*wt/wt (hellblau) = Primärtumor und Lymphknotenmetastase Wildtyp*

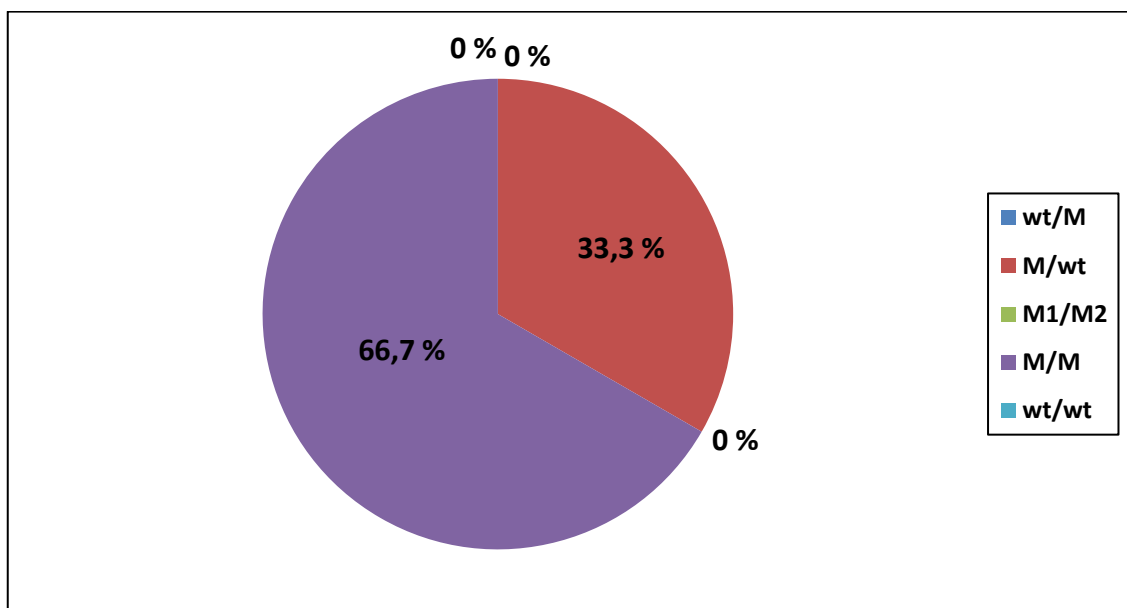
### 3.3.2.2 Primärtumor vs. Fernmetastasen

Auch hier wurden Divergenzen im Mutationsstatus in den Exons 5 bis 8 des *TP53*-Gens zwischen Primärtumor und Fernmetastasen untersucht (siehe 3.3.2.1).

Es konnten nur drei Fälle mit Fernmetastasen untersucht werden, diese wiesen jedoch alle Mutationen auf. Bei einem Patienten fand sich die Mutation im Primärtumor, jedoch nicht in der Fernmetastase, so dass dieser Fall als intertumoral heterogen zu werten ist (33,3 %). In beiden anderen Fällen war die gleiche Mutation sowohl im Primärtumor, als auch in der Fernmetastase vorhanden (66,7 %).

Eine Darstellung der Ergebnisse folgt in Abbildung 3.4.

Interessanterweise war beim intertumoral heterogenen Fall auch im befallenen Lymphknoten keine Mutation nachzuweisen, während die beiden anderen Fälle die gleiche Mutation durchgängig in Primärtumor, Lymphknoten- und Fernmetastase zeigten.



**Abbildung 3.4:** Darstellung der intertumoralen Heterogenität (Vergleich der Mutationen in Primärtumor und Fernmetastasen) des *TP53*-Gens (Exons 5 bis 8) in Magenkarzinomen. Eine intertumoral Heterogenität liegt in 33,3 % (*wt/M* + *M/wt* + *M1/M2*) vor.

*wt/M* (dunkelblau) = Primärtumor Wildtyp, Fernmetastase mutiert

*M/wt* (rot) = Primärtumor mutiert, Fernmetastase Wildtyp

*M1/M2* (grün) = unterschiedliche Mutationen in Primärtumor und Fernmetastase

*M/M* (lila) = gleiche Mutation in Primärtumor und Fernmetastase

*wt/wt* (hellblau) = Primärtumor und Fernmetastase Wildtyp



### 3.4. Korrelation von Mutationsrate und genetischer Heterogenität mit histopathologischen Parametern

Es wurde nachgewiesen, dass im untersuchten Kollektiv eine *TP53*-Mutationsrate von 44,7 % im Primärtumor sowie 35,4 % in den befallenen Lymphknoten bzw. 66,7 % in den Fernmetastasen vorhanden war. Die intratumorale Heterogenität lag bei 13,2 %, die intertumorale Heterogenität sogar bei 25 % (Primärtumor vs. Lymphknotenmetastase) bzw. 33,3 % (Primärtumor vs. Fernmetastase).

Daher wurde nun untersucht, ob sich eine Korrelation zwischen der *TP53*-Mutationsrate und speziell der genetischen Heterogenität einerseits und den Parametern TNM-Stadium, Grading, Stadium nach AJCC, Subtyp nach Laurén und WHO-Klassifikation andererseits finden lässt.

Aufgrund der geringen Anzahl der Fernmetastasen im Kollektiv wurde auf eine weitere Auswertung dieser Gruppe verzichtet, da keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt werden können.

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde jeweils mit dem Chi<sup>2</sup>-Test ermittelt.

#### 3.4.1 Korrelation mit dem TNM-Stadium

##### Korrelation bei Ordnung nach dem pT-Stadium

Von den Patienten mit einem Magenkarzinom im Stadium pT1 oder pT2 zeigten 75 % (6 von 8) eine Mutation des *PT53*-Gens innerhalb des Primärtumors. Dabei wurde eine intertumorale Heterogenität von 25 % (2 von 8) beobachtet. In den höheren TNM-Stadien nehmen diese Werte deutlich ab: Im Stadium pT3 ist eine Mutationsrate von 41,9 % (18 von 43) im Primärtumor und eine intratumorale Heterogenität von 11,6 % (5 von 43) zu sehen, für das Stadium pT4a eine ähnliche Mutationsrate von 40,0 % (10 von 25) bei einer intratumoralen Heterogenität von 12 % (3 von 25).

Die Inzidenz der Mutationen im Primärtumor generell sowie die Mutationsrate und intratumorale Heterogenität sind in den Abbildungen 3.5 und 3.6 dargestellt.

Diese Unterschiede waren mit p-Werten von 0,08 bis 1 statistisch nicht signifikant.

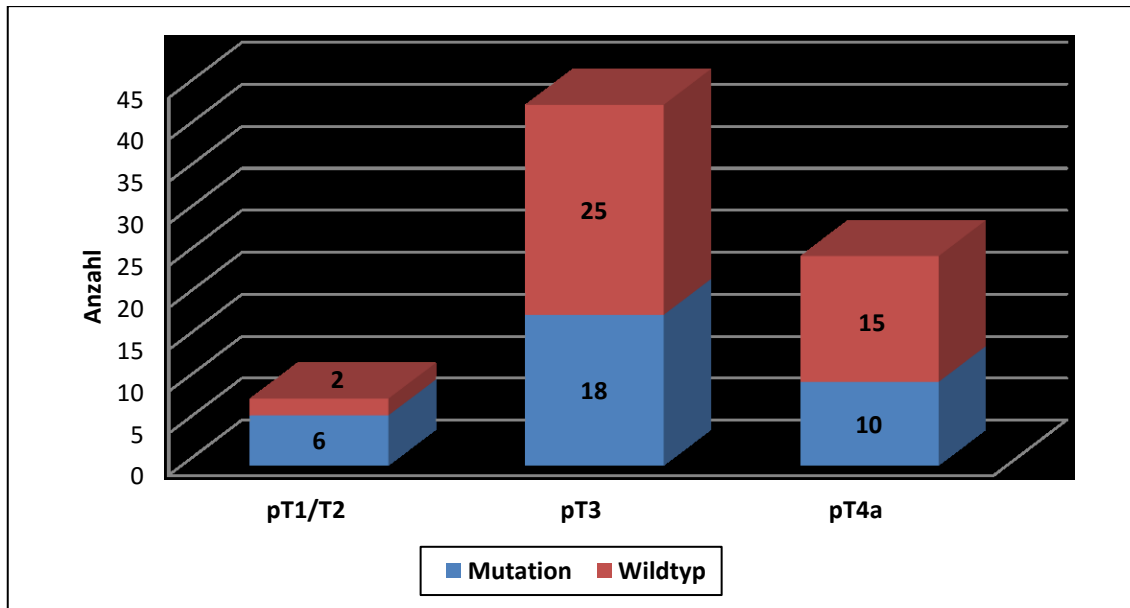


Abbildung 3.5: Darstellung der Magenkarzinom-Primärtumoren mit Mutation (blau) und der Wildtypen (rot) in Abhängigkeit vom pT-Stadium der Magenkarzinome.

pT1 = pT-Stadium 1, pT2 = pT-Stadium 2, pT3 = pT-Stadium 3, pT4a = pT-Stadium 4a

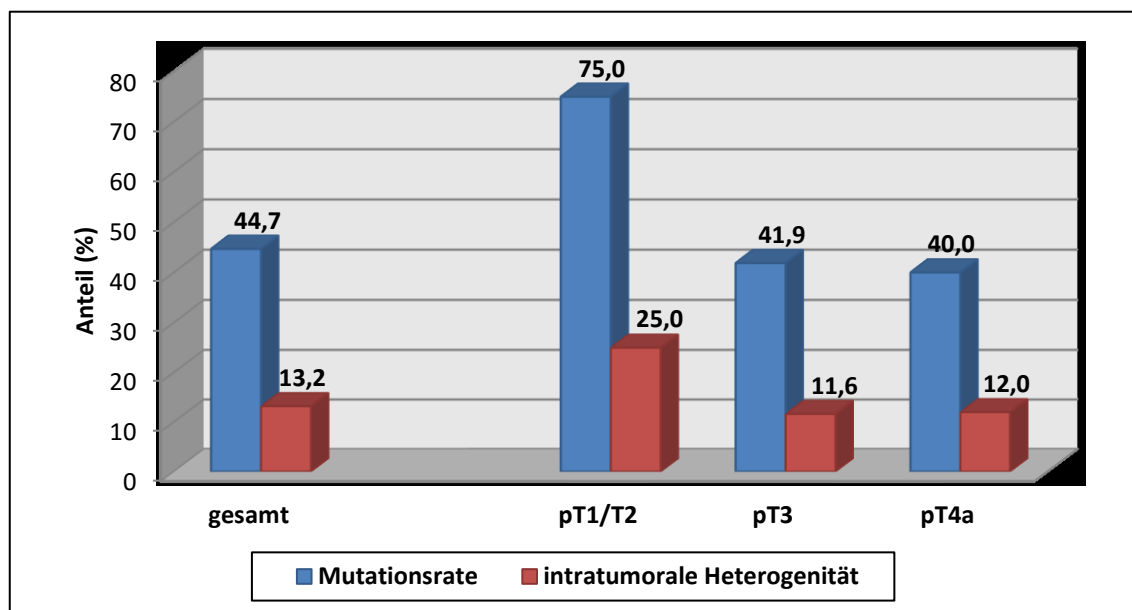


Abbildung 3.6: Darstellung von Mutationsrate im Primärtumor (blau) und intratumoralen Heterogenität (rot) in Magenkarzinom-Primärtumoren in Abhängigkeit vom pT-Stadium der Magenkarzinome.

pT1 = pT-Stadium 1, pT2 = pT-Stadium 2, pT3 = pT-Stadium 3, pT4a = pT-Stadium 4a

Korrelierte man das pT-Stadium mit der Mutationsrate innerhalb der befallenen Lymphknoten und der intratumoralen Heterogenität, ergab sich folgendes: Lymphknoten von Patienten mit einem Tumor im Stadium pT1 oder pT2 wiesen

keinerlei Mutation auf, zudem war kein Fall intertumoral heterogen. Im Stadium pT3 wiesen 37 % (10 von 27) der Lymphknotenmetastasen eine Mutation auf und es war eine intertumorale Heterogenität von 29,6 % (8 von 27) zu erkennen. Für das Stadium pT4a nahmen die Werte wieder ab: 33,3 % (7 von 21) der befallenen Lymphknoten hatten Mutationen, 19 % (4 von 21) der Fälle waren intertumoral heterogen. Auch hier ergab sich bei p-Werten von 0,48 und 0,79 keine statistische Signifikanz.

#### Korrelation bei Ordnung nach dem pN-Stadium

Patienten mit keinem nachgewiesenen Befall der Lymphknoten, also einem pN0-Stadium, wiesen in 52,6 % (10 von 19) der Fälle Mutationen innerhalb des Primärtumors auf, von denen 15,8 % (3 von 19) intratumoral heterogen waren. Im Stadium pN1 zeigten sich zu 25 % (2 von 8) Mutationen im Primärtumor, lediglich 12,5 % (1 von 8) waren intratumoral heterogen, während im Stadium pN2 zu 50,0 % (6 von 12) Mutationen innerhalb des Primärtumors nachzuweisen waren und eine intratumorale Heterogenität von 16,7 % (2 von 12) zu verzeichnen war. Das Stadium pN3 wird beim Magenkarzinom in die Kategorien a und b unterteilt: pN3a ließ eine Mutationsrate von 38,5 % (5 von 13) erkennen bei einer intratumoralen Heterogenität von 7,7 % (1 von 13), im Stadium pN3b waren die Werte mit 45,8 % (11 von 24) Mutationen im Primärtumor und 12,5 % (3 von 24) intratumoral heterogenen Fällen leicht höher (siehe Abbildung 3.7 und 3.8).

Es war bei p-Werten zwischen 0,18 und 1 keine statistische Signifikanz erkennbar.

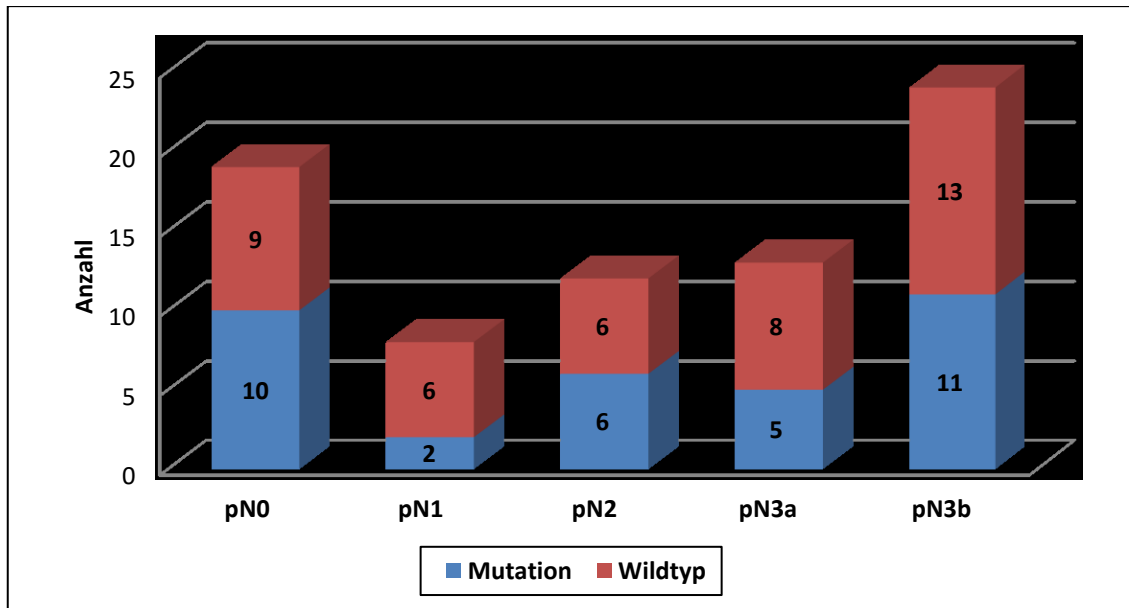


Abbildung 3.7: Darstellung der Magenkarzinom-Primärtumoren mit Mutation (blau) und der Wildtypen (rot) in Abhängigkeit vom pN-Stadium der Magenkarzinome.

pN0 = pN-Stadium 0, pN1 = pN-Stadium 1, pN2 = pN-Stadium 2, pN3a = pN-Stadium 3a, pN3b = pN-Stadium 3b

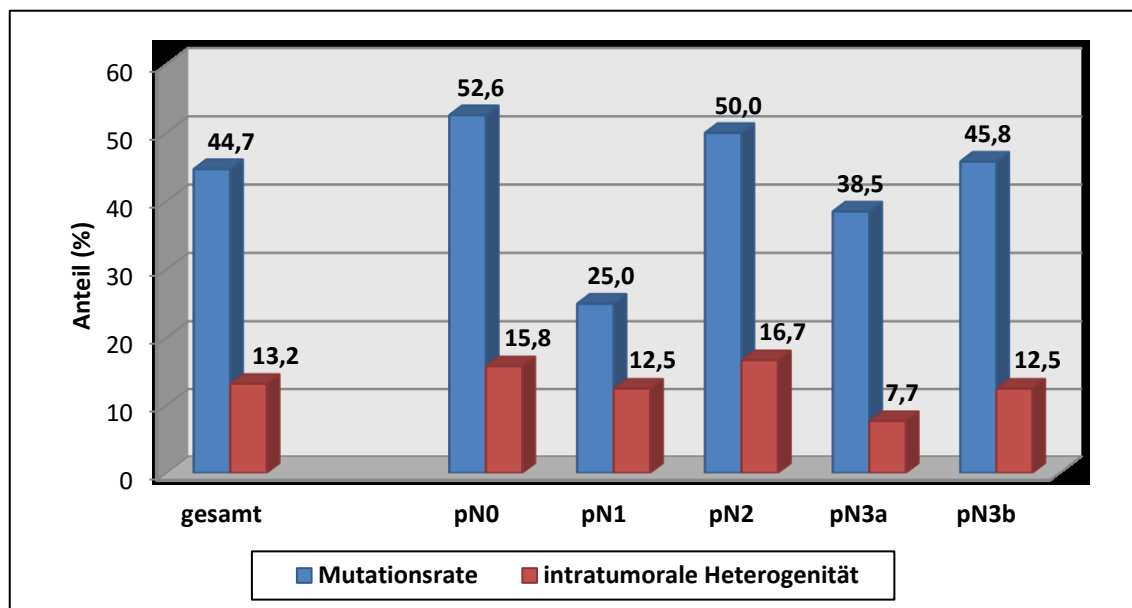


Abbildung 3.8: Darstellung von Mutationsrate im Primärtumor (blau) und intratumoraler Heterogenität (rot) in Magenkarzinom-Primärtumoren in Abhängigkeit vom pN-Stadium der Magenkarzinome.

pN0 = pN-Stadium 0, pN1 = pN-Stadium 1, pN2 = pN-Stadium 2, pN3a = pN-Stadium 3a, pN3b = pN-Stadium 3b

Eine Korrelation zwischen pN-Stadium und der Mutationshäufigkeit im befallenen Lymphknoten bzw. der intertumoralen Heterogenität erbrachte folgende Ergebnisse: Im

Stadium pN1 wiesen 50 % (1 von 2) der Patienten eine Mutation innerhalb der Lymphknotenmetastase auf und ebenso viele eine intertumorale Heterogenität. Im Stadium pN2 sind in 40 % (4 von 10) der Fälle Mutationen in der Lymphknotenmetastase erkennbar, dabei waren 30 % (3 von 10) der Fälle intertumoral heterogen. Das Stadium 3 ist wiederum aufgeteilt: pN3a mit 46,2 % (6 von 13) Mutationen im befallenen Lymphknoten und 23,1 % (3 von 13) intertumoraler Heterogenität, sowie pN3b mit 26,1 % (6 von 23) Mutationen in der Lymphknotenmetastase und 21,7 % (5 von 23) intertumoral heterogenen Fällen.

Auch hier ließ sich bei einem p-Wert von 0,21 bis 0,91 keine statistische Signifikanz feststellen.

### 3.4.2 Korrelation mit dem Grading

Das Grading beschreibt die Differenzierung eines Tumors, das heißt wie weit er vom Ursprungsgewebe abweicht. G1 bedeutet dabei ein noch gut differenziertes, G2 ein mäßig differenziertes und G3 ein gering differenziertes Gewebe.

In dieser Arbeit war nur ein Patient mit einem G1-differenzierten Tumor vorhanden; im Primärtumor war keine Mutation und somit auch keine Heterogenität zu finden. Bei einem G2-Stadium wiesen 53,8 % (7 von 13) der Fälle eine Mutation im Primärtumor auf, allerdings war keiner intratumoral heterogen. Bei G3-differenzierten Tumoren lag die Mutationsrate innerhalb des Primärtumors bei 43,5 % (27 von 62) und die intratumorale Heterogenität bei 16,1 % (10 von 62). Vergleicht man G1- und G2-differenzierte Tumore auf der einen Seite mit G3-differenzierten Tumoren auf der anderen Seite bezüglich Mutationsrate und intratumoraler Heterogenität ist bei p-Werten von 0,66 beziehungsweise 0,16 keine statistische Signifikanz zu erkennen.

Bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen war in dieser Arbeit kein G1-differenzierter Primärtumor vorhanden. Fälle mit einem G2-Stadium zeigten in 28,6 % (2 von 7) eine Mutation im Lymphknoten und eine gleiche Rate von intertumoraler Heterogenität. G3-differenzierte Tumore wiesen dagegen mit 36,6 % (15 von 41) eine höhere Mutationsrate im befallenen Lymphknoten, aber mit 24,4 % (10 von 41) eine niedrigere intertumorale Heterogenität auf.

Die Unterschiede waren bei p-Werten von 0,68 und 0,97 nicht statistisch signifikant.

### 3.4.3 Korrelation mit dem Stadium nach AJCC

Zur besseren Übersicht wurden die einzelnen Unterteilungen der Stadien nicht berücksichtigt, das heißt die Stadien IA und IB wurden zu Stadium I zusammengefasst, die Stadien IIA und IIB zu II etc.

Patienten, die dem Stadium I nach AJCC zugeordnet werden konnten, zeigten in 83,3 % (5 von 6) eine Mutation im Primärtumor und in 33,3 % (2 von 6) eine intratumorale Heterogenität. Eine Mutationsrate von 36,8 % (7 von 19) innerhalb des Primärtumors wiesen Fälle des Stadiums II auf, dabei ergab sich eine intratumorale Heterogenität von 10,5 % (2 von 19). Ähnliche Werte sind für das Stadium III zu verzeichnen: 38,3 % (18 von 47) Mutationen im Primärtumor bei 12,8 % (6 von 47) intratumoraler Heterogenität. Die höchste Mutationsrate innerhalb des Primärtumors zeigte sich für das Stadium IV mit 100 % (4 von 4), wobei aber kein Fall intratumoral heterogen war. Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.9 und 3.10 veranschaulicht.

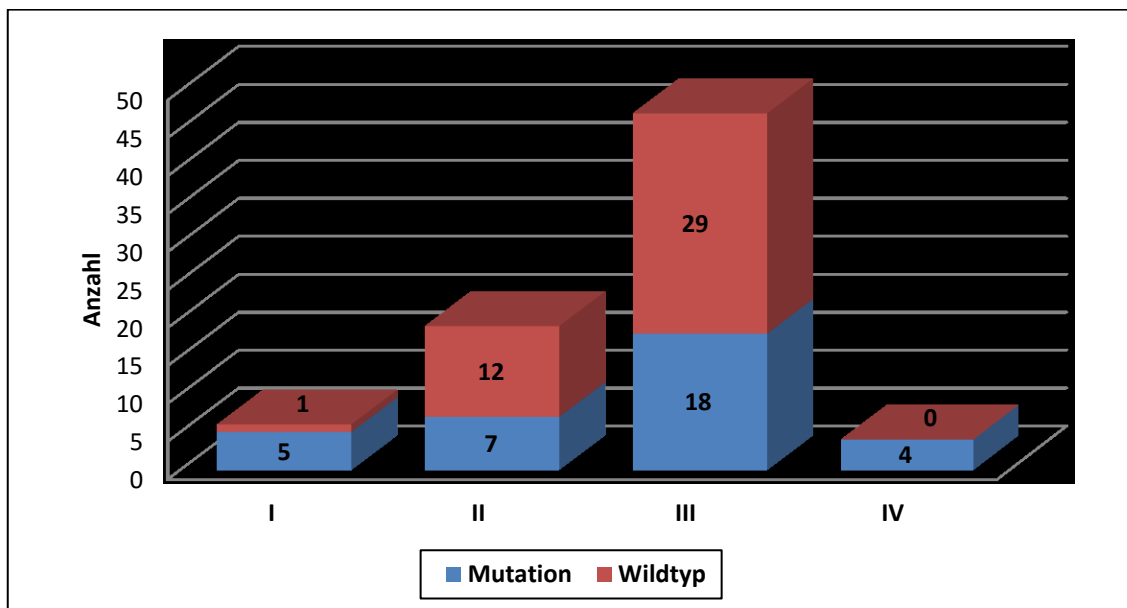


Abbildung 3.9: Darstellung der Magenkarzinom-Primärtumoren mit Mutation (blau) und der Wildtypen (rot) in Abhängigkeit vom AJCC-Stadium der Magenkarzinome.

I = AJCC-Stadium I, II = AJCC-Stadium II, III = AJCC-Stadium III, IV = AJCC-Stadium IV

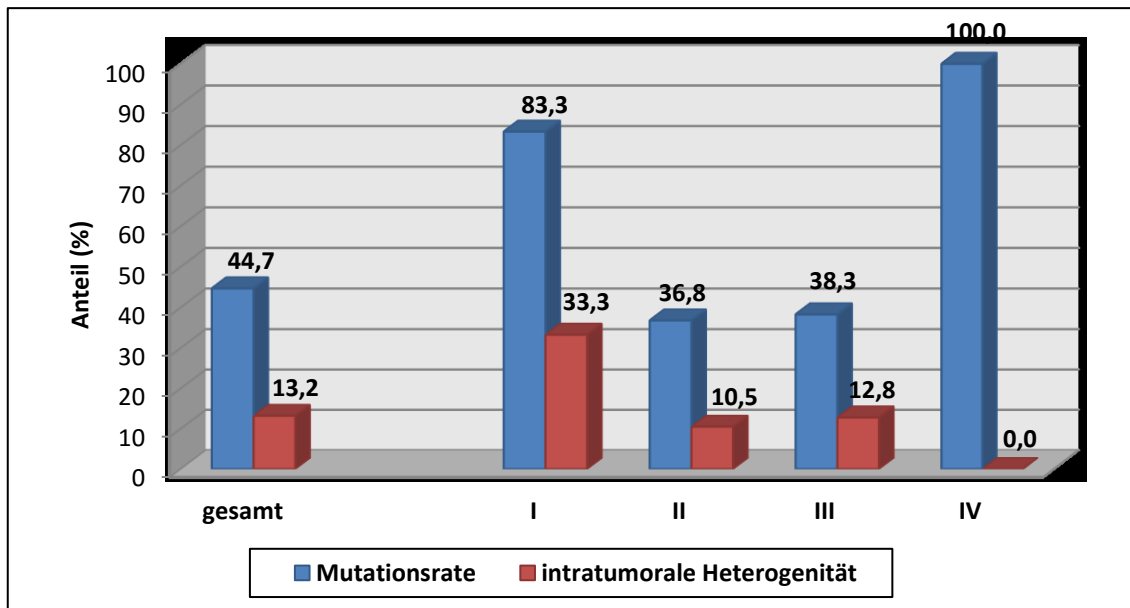


Abbildung 3.10: Darstellung von Mutationsrate im Primärtumor (blau) und intratumoraler Heterogenität (rot) in Magenkarzinom-Primärtumoren in Abhängigkeit vom Stadium nach AJCC der Magenkarzinome.

I = AJCC-Stadium I, II = AJCC-Stadium II, III = AJCC-Stadium III, IV = AJCC-Stadium IV

Diese Unterschiede waren zum Teil statistisch signifikant und sind zur besseren Übersicht in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: p-Werte des Vergleichs der AJCC-Stadien der Magenkarzinome untereinander. Darstellung von Mutationsrate und intratumoraler Heterogenität.

Mutationsrate		intratumorale Heterogenität	
AJCC-Stadium	p-Wert	AJCC-Stadium	p-Wert
I vs. II	0,05	I vs. II	0,05
I vs. III	0,04	I vs. III	0,04
I vs. IV	0,39	II vs. III	0,8
II vs. III	0,91		
II vs. IV	0,02		
III vs. IV	0,02		

Bei einer Korrelation der AJCC-Stadien mit der Mutationsrate in befallenen Lymphknoten und der intertumoralen Heterogenität kamen folgende Ergebnisse zustande: Kein Patient mit Lymphknotenmetastase gehörte dem Stadium I an und im

Stadium zwei gab es keinen Fall mit einer Mutation in der Lymphknotenmetastase. Patienten im Stadium III wiesen zu 32,6 % (14 von 43) eine Mutation im befallenen Lymphknoten auf und zeigten in 25,6 % (11 von 43) eine intertumorale Heterogenität. Die Mutationsrate innerhalb der Lymphknotenmetastase lag bei den Fällen des Stadiums IV mit 75 % (3 von 4) deutlich höher, die intertumorale Heterogenität war mit 25 % (1 von 4) auf vergleichbarem Niveau (siehe Abbildung 3.11).

Hier zeigte sich bei p-Werten zwischen 0,09 und 0,54 keine statistische Signifikanz.

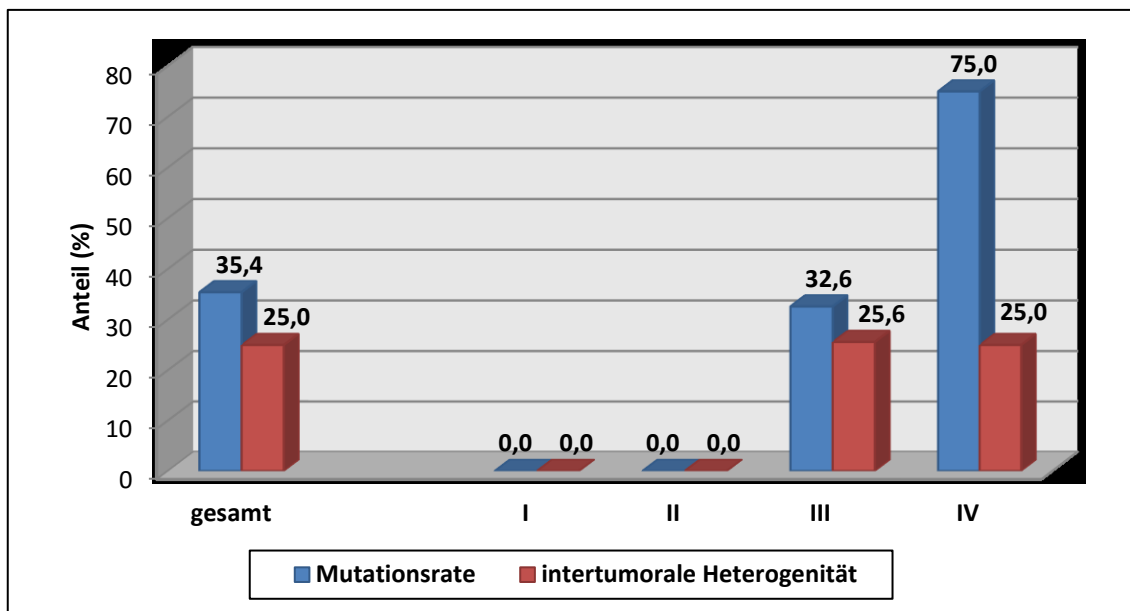


Abbildung 3.11: Darstellung von Mutationsrate in den Lymphknotenmetastasen der Magenkarzinome (blau) und intertumorale Heterogenität (rot) in Abhängigkeit vom Stadium nach AJCC der Magenkarzinome.

I = AJCC-Stadium I, II = AJCC-Stadium II, III = AJCC-Stadium III, IV = AJCC-Stadium IV

### 3.4.4 Korrelation mit dem Subtyp nach Laurén

Patienten mit Tumoren, die in der Laurén-Klassifikation als intestinal eingeordnet wurden, zeigten zu 50 % (12 von 24) eine Mutation des Primärtumors bei einer intratumoralen Heterogenität von 8,3 % (2 von 24). Die Werte für den diffusen und den Mischtyp stellten sich in dieser Arbeit exakt gleich dar: 42,3 % (11 von 26) der Primärtumoren wiesen eine Mutation auf, 15,4 % (4 von 26) waren intratumoral heterogen (siehe Abbildung 3.12).

Bei p-Werten von 0,59 bis 1 war dabei keine statistische Signifikanz erkennbar.



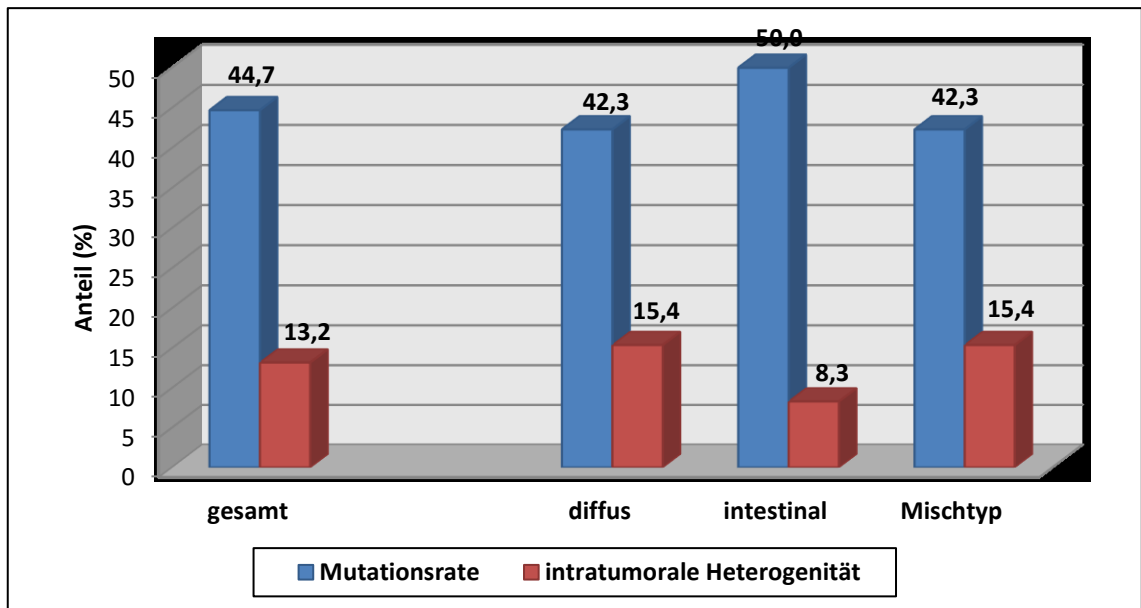


Abbildung 3.12: Darstellung von Mutationsrate im Primärtumor (blau) und intratumoraler Heterogenität (rot) in Magenkarzinom-Primärtumoren in Abhängigkeit vom Subtyp nach Laurén der Magenkarzinome.

*diffus = diffuser Subtyp nach Laurén, intestinal = intestinaler Subtyp nach Laurén, Mischtyp = Mischtyp nach Laurén*

Bei Fällen mit Lymphknotenmetastasen ergab sich folgendes Bild: Patienten mit intestinalen Tumoren hatten zu 40 % (6 von 15) Mutationen in den befallenen Lymphknoten und zu 26,7 % (4 von 15) eine intertumorale Heterogenität. Der diffuse Typ weist mit 27,8 % (5 von 18) einen geringeren Wert an Mutationen in der Lymphknotenmetastase auf, zeigt aber mit ebenfalls 27,8 % (5 von 18) einen ähnlichen Wert an intertumoral heterogenen Tumoren. 40 % (6 von 15) Mutationen innerhalb der befallenen Lymphknoten waren beim Mischtyp zu verzeichnen bei einer intertumoralen Heterogenität von 20 % (3 von 15). Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 3.13 dargestellt.

Die Unterschiede waren bei p-Werten zwischen 0,41 und 1 statistisch nicht signifikant.

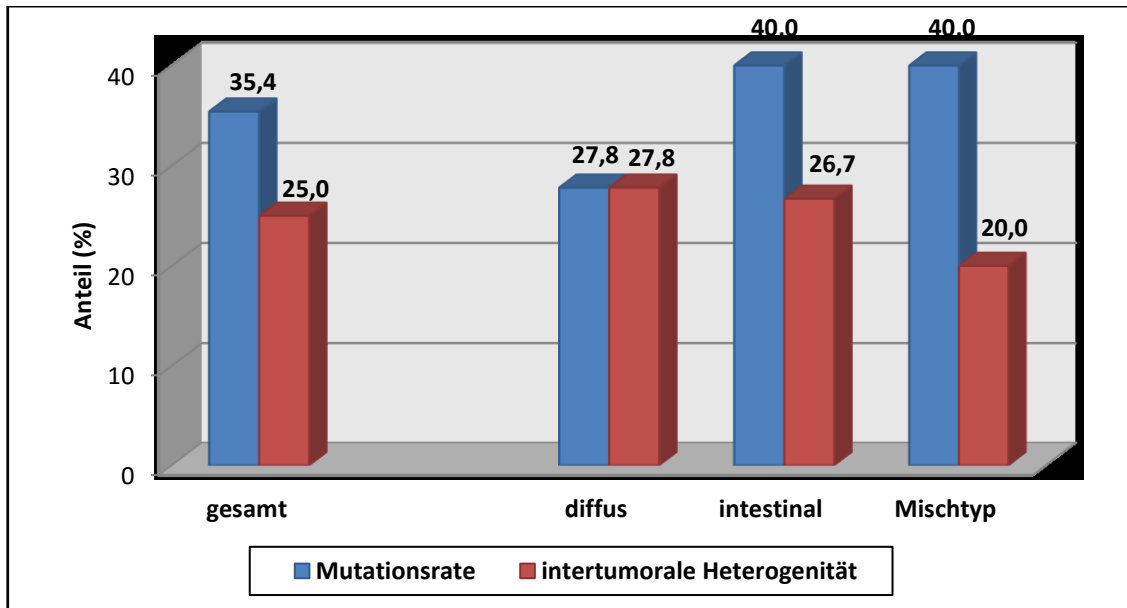


Abbildung 3.13: Darstellung von Mutationsrate in den Lymphknotenmetastasen der Magenkarzinome (blau) und intertumorale Heterogenität (rot) in Abhängigkeit vom Subtyp nach Laurén der Magenkarzinome.

*diffus = diffuser Subtyp nach Laurén, intestinal = intestinaler Subtyp nach Laurén, Mischtyp = Mischtyp nach Laurén*

### 3.4.5 Korrelation mit der WHO-Klassifikation

In dieser Arbeit waren fünf Tumorentitäten der WHO-Klassifikation enthalten: das papilläre sowie das tubuläre Adenokarzinom, das muzinöse Adenokarzinom, das Siegelringzellkarzinom, das gemischte Adenokarzinom und das medulläre oder lymphoepitheliale Karzinom. Die beiden letztgenannten waren dabei jeweils nur einmal vertreten, so dass sie bei der folgenden statistischen Auswertung außer Acht gelassen wurden.

Die papillären und tubulären Adenokarzinome ließen in 44,7 % (21 von 47) Mutationen innerhalb des Primärtumors erkennen, die intratumorale Heterogenität lag dabei bei 12,8 % (6 von 47). Die Gruppe der muzinösen Adenokarzinome konnte eine Mutationsrate von 33,3 % (1 von 3) aufweisen, wobei keine intratumorale Heterogenität erkennbar war. Mit 45,8 % (11 von 6) zeigte das Siegelringzellkarzinom sowohl die höchste Mutationsrate im Primärtumor, als auch mit 16,7 % (4 von 24) die höchste Rate an intratumoraler Heterogenität.

Die p-Werte lagen dabei zwischen 0,44 und 0,93, waren also statistisch nicht signifikant.

Bei Betrachtung der Mutationen in befallenen Lymphknoten zeigte sich bei den papillären und tubulären Adenokarzinomen ein Wert von 41,4 % (12 von 29), sowie eine intertumorale Heterogenität von 20,7 % (6 von 29). Die muzinösen Adenokarzinome wiesen wiederum eine Mutationsrate von 33,3 % (1 von 3) in den befallenen Lymphknoten auf ohne eine intertumorale Heterogenität. Mit 26,7 % (4 von 15) konnte die Mutationsrate innerhalb der Lymphknotenmetastasen beim Siegelringzellkarzinom angegeben werden, wobei die intertumorale Heterogenität bei 33,3 % (5 von 15) lag.

Keiner der p-Werte von 0,34 bis 0,81 wies eine statistische Signifikanz auf.

## 4 DISKUSSION

*TP53*-Mutationen treten schätzungsweise in ca. 50 % aller menschlichen Tumore auf und sind damit ein sehr häufiges Ereignis während der Karzinogenese. Für Magenkarzinome ist die *TP53*-Mutationsrate laut COSMIC-Gendatenbank mit nahezu 30 % angegeben, so dass es das am häufigsten mutierte Gen innerhalb dieser Tumorentität darstellt.

Wie in über 80 % aller wissenschaftlichen Studien, die Mutationen im *TP53*-Gen untersucht haben (Soussi and Lozano, 2005), wurden auch in dieser Arbeit die Exons 5 bis 8 sequenziert, da in der DNA-Bindungsdomäne die meisten an maligner Entartung beteiligten Mutationen und alle sechs *hot-spot*-Mutationen liegen. Von den 76 in dieser Arbeit untersuchten Primärtumoren von Patienten mit Magenkarzinom wiesen 44,7 % eine oder mehrere *TP53*-Mutationen in diesen Exons auf. Der Prozentsatz liegt damit deutlich über den in der COSMIC-Gendatenbank angegebenen 30 % und auch über den in der Literatur genannten 25 bis 40 % (Bellini et al., 2012).

Von den 37 gefundenen Mutationen sind die meisten *missense*-Punktmutationen; dies stimmt mit der Literatur überein (Renault et al., 1993). 32,4 % der Mutationen zeigten sich an den *hot-spots*, wobei die Position 248 in Exon 7 mit 16,2 % erwartungsgemäß deutlich am häufigsten betroffen war. Auffällig ist, dass an den beiden *hot-spots* 249 und 273 keine Mutationen detektiert werden konnten; dies lässt sich am ehesten auf die geringe untersuchte Patientenanzahl zurückführen.

### 4.1 Intratumorale Heterogenität von *TP53*-Mutationen

Die Mutationsheterogenität innerhalb eines Tumors rückt immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung. *TP53*-Mutationen sind dabei vor allem in kolorektalen Karzinomen untersucht worden, wobei unter anderem folgende Aspekte von großem Interesse sind: Zu welchem Zeitpunkt der Kanzerogenese treten *TP53*-Mutationen auf und welche Rolle spielen sie bei der Metastasierung (Albanese et al., 2004)? Können mit Hilfe des *TP53*-Mutationsstatus Aussagen über den Erfolg einer *targeted therapy* mit monoklonalen Antikörpern gemacht werden (Oden-Gangloff et al., 2009)? In Bezug auf Magenkarzinome stehen ähnliche Fragen im Vordergrund, da auch seine Kanzerogenese noch wenig verstanden ist und die Forschung immer weitere Fortschritte

bei der Suche nach Therapieoptionen, die an verschiedenen Punkten von TP53 ansetzen oder in dessen Regelkreislauf eingreifen (siehe 1.2.3), macht.

Daher wurden in dieser Arbeit Proben des Tumorzentrums und der Invasionsfront von 76 Magenkarzinomen getrennt voneinander auf Mutationen im *TP53*-Gen untersucht. Dies erfolgte ähnlich wie in einer früheren Arbeit, die kolorektale Karzinome auf Mutationen in *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* und deren Heterogenität überprüfte (Baldus et al., 2010). Eine intratumorale Heterogenität konnte in 13,2 % aller Fälle detektiert werden, was einem Anteil von 29,4 % an den Tumoren mit *TP53*-Mutationen entspricht. Diese Ergebnisse divergieren teilweise von denen bekannter Studien: Iwamatsu untersuchte sieben Fälle des superfiziell spreitenden Typs des Magenfrühkarzinoms (siehe 1.3) und konnte eine Heterogenität von *TP53*-Mutationen innerhalb des mucosalen Teils des Tumors von 42,9 % (3 von 7) nachweisen. Der Vergleich von Tumoranteilen innerhalb der Mucosa mit denen innerhalb der Submucosa zeigte jedoch keinerlei intratumorale Heterogenität (Iwamatsu et al., 2001). Die Diskrepanz der Ergebnisse ist am dabei am ehesten auf die geringe Fallzahl jener Studie zurückzuführen. Cho hat dagegen 46 Areale aus zwölf fortgeschrittenen Magenkarzinomen untersucht, bei denen im Vorfeld eine Mutation in *TP53* nachgewiesen worden war. Hier zeigte sich bei 25 % eine Heterogenität zwischen oberflächlichen und tiefer infiltrierenden Tumorschichten (Cho et al., 1994), was von den vorhandenen Studien am ehesten auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Areale „Tumorzentrum“ und „Tumorfront“ übertragbar ist. Dies entspricht annähernd dem oben genannten Wert von 29,4 % aus dieser Arbeit.

Interessanterweise zeigten in der vorliegenden Arbeit 9,2 % aller Patienten (20,6 % derer mit *TP53*-Mutationen) eine Mutation im Tumorzentrum, die nicht in der Tumorfront zu finden war, gegenüber einer deutlich niedrigeren Mutationsrate von lediglich 2,6 % aller Patienten (5,9 % derer mit *TP53*-Mutationen) in der Invasionsfront ohne Mutation im Tumorzentrum. In einem Fall (1,3 % aller Patienten; 2,9 % derer mit *TP53*-Mutationen) waren in Tumorzentrum und Invasionsfront unterschiedliche Mutationen zu finden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Tumorproben, die zur Bestimmung des Mutationsstatus im Hinblick auf eine potenzielle Therapie entnommen werden, eher aus dem Tumorzentrum gewonnen werden sollten.

## 4.2 Intertumorale Heterogenität von *TP53*-Mutationen

Im Zusammenhang mit der Frage, in welchem Tumorareal Proben zur weiteren Untersuchung entnommen werden sollten, ist ein weiterer wichtiger Aspekt die Heterogenität der *TP53*-Mutationen zwischen Primärtumor einerseits und Lymphknoten- sowie Fernmetastasen andererseits. Bis jetzt sind weder Studien veröffentlicht worden, die diese intertumorale Heterogenität in Magenkarzinomen zwischen Primärtumor und zugehöriger Lymphknotenmetastase, noch zwischen Primärtumor und zugehöriger Fernmetastase untersucht haben. In dieser Arbeit wurde daher ebenfalls Material von 48 Patienten, die Lymphknotenmetastasen aufwiesen, auf Mutationen in den Exons 5 bis 8 von *TP53* untersucht und der Mutationsstatus mit dem zugehörigen Primärtumor verglichen. Von den 48 Fällen mit Lymphknotenmetastase zeigten 35,4 % Mutationen im *TP53*-Gen. Von diesen wiesen 25 % aller Fälle mit Lymphknotenmetastase und 48 % der Fälle mit *TP53*-Mutationen eine intertumorale Heterogenität auf. Diese Ergebnisse stehen am ehesten mit zwei Studien im Einklang, in denen *TP53*-Mutationen und deren Heterogenität in kolorektalen Karzinomen betrachtet wurden. Zhang untersuchte 40 Fälle eines kolorektalen Karzinoms (Dukes C) mit korrespondierenden Lymphknotenmetastasen auf Mutationsheterogenität im *TP53*-Gen. Dabei wiesen 18 % aller Fälle und damit 36,8 % aller Patienten mit *TP53*-Mutationen eine Heterogenität des *TP53*-Mutationsstatus zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase auf (Zhang et al., 1997), was mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmt. Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch Albanese, in deren Studie 30 kolorektale Karzinome (Dukes D) und deren Lebermetastasen auf Mutationsheterogenität untersucht wurden und eine intertumorale Heterogenität von 16,7 % an allen Patienten, sowie von 33,3 % an allen mit *TP53*-Mutationen nachgewiesen werden konnte (Albanese et al., 2004). Zwar wurden in dieser Studie keine Lymphknoten analysiert, dennoch steht die ähnliche Rate intertumoral heterogener Fälle im Einklang mit der vorliegenden Arbeit.

Bei genauerer Betrachtung ist zu erkennen, dass in dieser Arbeit 16,7 % aller Fälle mit Lymphknotenmetastasen (32 % derer mit *TP53*-Mutationen) eine Mutation des *TP53*-Gens im Primärtumor aufweisen, nicht jedoch in der Lymphknotenmetastase, während lediglich 6,2 % (12 % derer mit *TP53*-Mutationen) eine Mutation in der Lymphknotenmetastase zeigten, ohne dass diese im Primärtumor auftrat. Ein Fall (2,1%

beziehungsweise 4 %) zeigte wiederum zwei unterschiedliche Mutationen in Primärtumor und Lymphknotenmetastase. Von den drei Fällen mit Fernmetastase wies nur einer eine intertumorale Heterogenität auf, wobei eine Mutation im Primärtumor zu detektieren war, nicht aber in der korrespondierenden Fernmetastase. Auch hier wird deutlich, dass eine Probenentnahme zu diagnostischen Zwecken eher aus dem Primärtumor erfolgen sollte, als aus den Lymphknotenmetastasen oder den Fernmetastasen. Dieser Aspekt sollte im Hinblick auf mögliche zukünftige Therapiekonzepte, die an TP53 oder dessen Regelkreis ansetzen, bedacht werden. Nur mit Hilfe einer korrekten Erfassung des Mutationsstatus, welche intra- und intertumorale Heterogenität berücksichtigt, wird es möglich sein, die Patientengruppen herauszufiltern, die von einer derartigen Therapie profitieren könnten, ohne dabei diejenigen zu „übersehen“, deren Tumor vielleicht nur in geringen Anteilen *TP53*-Mutationen aufweist, sich aber eventuell anderen Behandlungsstrategien entzieht und somit ein erhöhtes Risiko für ein Rezidiv hat. In diesem Kontext kann wiederum ein Bezug zum kolorektalen Karzinom hergestellt werden: Oden-Gangloff et al. untersuchten 2009 64 Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen, die mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab behandelt wurden, auf ihren *TP53*- und *KRAS*-Mutationsstatus. Dabei wurde ersichtlich, dass vor allem Patienten mit *TP53*-Mutation und ohne *KRAS*-Mutation eine höhere progressionsfreie Überlebenszeit zeigten und mit einer kontrollierten Krankheit (in der Studie als „komplettes oder teilweises Ansprechen auf die Behandlung“ oder „keine Progression des Tumorwachstums“ definiert) assoziiert waren. So wird deutlich, dass *TP53*-Mutationen einen prädiktiven Wert bezüglich der Cetuximab-Sensitivität eines kolorektalen Karzinoms besitzen und wie außerordentlich wichtig eine korrekte Bestimmung des Mutationsstatus ist.

### **4.3 Mutationsheterogenität von *TP53* und Karzinogenese des Magenkarzinoms**

Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse in Bezug auf die Karzinogenese von Magenkarzinomen, bestätigen diese eher die These der frühzeitigen Entstehung von *TP53*-Mutationen innerhalb von Tumoren beziehungsweise speziell innerhalb des Magenkarzinoms. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenso wie in kolorektalen Karzinomen (Albanese et al., 2004) (Zhang et al., 1997) ein größerer Anteil intra- und

intertumoral homogener TP53-Mutationen, was darauf hindeutet, dass der Tumor aus einem mutierten Zellklon entsteht, sich ausbreitet und metastasiert, wie es auch schon von Cho vermutet wird (Cho et al., 1994). Besonders deutlich wird dies, wenn Tumorzentrum und Invasionsfront miteinander verglichen werden: Von den insgesamt 34 Magenkarzinomen mit TP53-Mutation zeigten 70,6 % die gleiche Mutation, während lediglich 31,6 % eine Heterogenität bezüglich des TP53-Mutationsstatus aufwiesen.

Nichtsdestotrotz muss diese Aussage beim Vergleich des Primärtumors mit der zugehörigen Lymphknotenmetastase eingeschränkt werden: Bei insgesamt 25 Fällen mit TP53-Mutationen fanden sich 52 % in ihrem TP53-Mutationsstatus homogene und 48 % heterogene Tumore. Dies deutet darauf hin, dass die oben aufgezeigte Entwicklung in der Kanzerogenese nicht für alle Magenkarzinome zutrifft. Ein Erklärungsansatz wäre, dass schon eine TP53-Heterogenität im Primärtumor vorliegt und sowohl Zellen mit als auch ohne TP53-Mutation durch andere Prozesse und Mutationen die Fähigkeit erlangen, sich aus dem Verband des Primärtumors zu lösen und zu migrieren, was den ersten Schritt zur Metastasierung darstellt. Somit wären TP53-Mutationen nicht für die Dissemination von entarteten Zellen des Magenkarzinoms verantwortlich oder für diese zwangsweise nötig, ähnlich wie es Offner für das kolorektale Karzinom festgestellt hat (Offner et al., 1999). In jener Studie, die Karzinome verschiedener Entitäten und deren Mikrometastasen im Knochenmark auf ihren TP53-Mutationsstatus untersucht, wird dabei der Schluss gezogen, dass TP53-Mutationen im Primärtumor erst nach der Aussaat von Metastasen entstehen. Zumindest partiell dagegen spricht bei Betrachtung der Ergebnisse dieser Studie die mit 52,1 % doch eher hohe TP53-Mutationsrate innerhalb der Lymphknotenmetastasen. Nicht auszuschließen ist allerdings die Hypothese, dass sich neue TP53-Mutationen während der Entwicklung der Lymphknotenmetastasen bilden und somit eine intertumorale Heterogenität (Mutation in der Lymphknotenmetastase, aber nicht im Primärtumor) entsteht.

Insgesamt gesehen überwiegt also bei TP53-Mutationen in Magenkarzinomen die intra- und intertumorale Homogenität, besonders der hohe Prozentsatz von 48 % heterogenen Tumoren an allen Tumoren mit Mutationen beim Vergleich von Patienten mit Lymphknotenmetastase zeigt jedoch, dass TP53-Mutationen auch nur in einem Anteil eines Tumors entstehen oder vorhanden sein können.



#### 4.4 Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

Da Magenkarzinome eine große Heterogenität hinsichtlich ihrer histologischen Erscheinungsformen und ihrer Läsionen auf molekularer Ebene (wie unter anderem auch in dieser Arbeit gezeigt) aufweisen, ist eine einheitliche Klassifikation, die im Idealfall auch Aussagen über die Prognose des erkrankten Patienten zulässt, erschwert. Daher wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit erstmals die Prävalenz von *TP53*-Mutationen und die Heterogenität dieser Mutationen innerhalb eines Tumors mit den Parametern TNM-Stadium, Grading, Stadium nach AJCC, Subtyp nach Laurén und WHO-Klassifikation korreliert.

Dabei wurden bei der Korrelation der Stadieneinteilung nach AJCC mit der intratumoralen Heterogenität teilweise statistisch signifikante Werte nachgewiesen. Es zeigte sich bei höheren AJCC-Stadien eine eher niedrigere Rate an intratumoraler Heterogenität, was darauf hindeutet, dass intratumorale Heterogenität vor allem bei wenig fortgeschrittenen Magenkarzinomen von Bedeutung ist. Dies ließe sich mit der *field cancerization theory* erklären, nach der sich ein Magenkarzinom aus ursprünglich mehreren kleineren Atypien zusammensetzt und dementsprechend heterogen ist. Ein weiterführender Ansatz wäre, dass im Verlauf der Entwicklung einer dieser mutierten Zellklone der dominanteste und größte innerhalb des Tumors wird und die anderen zumindest so weit verdrängt, dass sie sozusagen als *sampling error* in weiter fortgeschrittenen Tumoren selten nachgewiesen werden und diese somit als weniger heterogen erscheinen (wie auch in der vorliegenden Studie).

Die Korrelation der Stadieneinteilung nach AJCC mit der Mutationsrate innerhalb der Primärtumoren zeigte ebenfalls teilweise statistisch signifikante p-Werte. Diese ergeben sich jedoch aus den sehr hohen Mutationsraten der Stadien I und IV im Vergleich zu den Stadien II und III, so dass kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Stadium nach AJCC und der Mutationsrate in den Primärtumoren gezeigt werden konnte. Ein anderes Bild ergibt sich, wenn man die AJCC-Stadien mit der Mutationsrate innerhalb der Lymphknotenmetastasen und der intertumoralen Heterogenität korreliert: Es zeigt sich ein Trend zu einer höheren Mutationsrate und intertumoralen Heterogenität in hohen AJCC-Stadien, was wiederum die These bestätigt, dass *TP53*-Mutationen eher nach der Tumordissemination in fortgeschrittenen Magenkarzinomen entstehen.

In den in dieser Studie untersuchten Siegelringzell-Karzinomen wurden die höchste *TP53*-Mutationsrate innerhalb des Primärtumors, sowie die größte intra- und intertumorale Heterogenität im Vergleich mit den anderen histologischen Subtypen des Magenkarzinoms nachgewiesen, auch wenn die Ergebnisse nicht statistisch signifikant waren. Dies kann als ein Aspekt für das gegenüber den anderen häufigen histologischen Entitäten des Magenkarzinoms aggressivere Wachstum dieser Form, welches gleichzeitig oft mit einer schlechteren Prognose einhergeht, angesehen werden. Andere aussagekräftige Korrelationen von *TP53*-Mutationsraten oder Heterogenitäten dieser Mutationen mit anderen klinischen Parametern konnten nicht festgestellt werden.

Abschließend betrachtet zeigt auch diese Arbeit, wie komplex die einzelnen Aspekte der Kanzerogenese beim Magenkarzinom sind. Wichtig ist jedoch, dass inter- und intratumorale Heterogenität von *TP53*-Mutationen in Magenkarzinomen eine große Rolle spielt. Gerade im Hinblick auf neue Therapiekonzepte, die auf Eingriffen in das *TP53*-Netzwerk basieren, wird in naher Zukunft eine weiterführende Forschung auf diesem Gebiet nötig sein, um Patienten mit Magenkarzinomen effizienter und erfolgreicher therapieren zu können.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Magenkarzinom als vierthäufigster Tumor weltweit stellt trotz der in den letzten Jahren vor allem in Europa stetig sinkenden Inzidenz eine häufige Tumorerkrankung insbesondere in Ostasien dar. Problematisch ist vor allem, dass ungefähr die Hälfte der Magenkarzinome in Deutschland aufgrund fehlender Frühsymptome und mangels Screeninguntersuchungen erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird und somit häufig kein kurativer Ansatz mehr möglich ist. Trotz der kontinuierlich verbesserten vor allem chirurgisch dominierten Therapieansätze ist die Prognose daher weiterhin mit 5-Jahres-Überlebensraten von circa 30 % in Deutschland schlecht.

*TP53* ist ein Tumorsuppressorgen, das als Transkriptionsfaktor eine zentrale Stellung in der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der Zellalterung inne hat. Ein Funktionsverlust dieses „*guardian of the genome*“ führt in höchstem Maße zur Zellentartung und somit zur Tumorentstehung, wobei Mutationen im *TP53*-Gen in ungefähr 50 % aller menschlichen Tumoren zu finden sind. Außerdem ist bekannt, dass innerhalb eines Primärtumors und dessen korrespondierenden Metastasen eine Mutationsheterogenität vorhanden sein kann, mit deren Analyse es möglich ist, die Karzinogenese besser zu verstehen. Insbesondere beim Magenkarzinom liegt die Vermutung nahe, dass die genetische Heterogenität eine korrekte Klassifikation und Prognose bis jetzt erschwert hat.

Daher wurde in dieser Arbeit Gewebe von 76 Patienten mit einem diagnostizierten Magenkarzinom und 48 zugehörige Lymphknoten- und drei Fernmetastasen mit Hilfe der DNA-Sequenzierung auf intra- und intertumorale Heterogenität hin untersucht und diese, sowie die Häufigkeit der Mutationen mit den Parametern TNM-Stadium, Grading, Stadium nach AJCC, Subtyp nach Laurén und WHO-Klassifikation korreliert. Es zeigte sich eine intratumorale Heterogenität von 13,2 % aller Fälle (29,4 % an den Tumoren mit *TP53*-Mutationen), sowie eine intertumorale Heterogenität von 25 % aller Fälle mit Lymphknotenmetastase (48 % der Fälle mit *TP53*-Mutationen), so dass eine ähnliche Heterogenität wie in kolorektalen Karzinomen vorhanden ist. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass vor allem die intertumorale Heterogenität von *TP53*-Mutationen in Magenkarzinomen durchaus häufig ist und in Hinblick auf Probenentnahmen zu diagnostischen Zwecken, die am besten aus dem Tumorzentrum erfolgen sollten, beachtet werden muss. Ähnliches gilt für potenzielle neue Therapiekonzepte, die an

TP53 und seinem Regelkreis ansetzen. Die insgesamt höhere Homogenität der *TP53*-Mutationen weist zwar darauf hin, dass diese im Regelfall frühzeitig in der Karzinogenese entstehen, insbesondere der hohe Prozentsatz von 48 % heterogenen Tumoren an allen Tumoren mit Mutation bei der Betrachtung der Patienten mit Lymphknotenmetastase zeigt jedoch, dass *TP53*-Mutationen auch nur in einem Anteil eines Tumors entstehen oder vorhanden sein können. Mutationsrate und –heterogenität ließen sich am ehesten mit der AJCC-Klassifikation korrelieren; weitere Analysen mit größeren Patientenkollektiven müssen noch größere Klarheit auch im Hinblick auf prognostische Vorhersagen schaffen.

## 6 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Ahn, J., Prives, C., 2001. The C-terminus of p53: the more you learn the less you know. *Nature Structural Biology* **8**, 730–732.
- Aird, I., Bentall, H.H., 1953. A relationship between cancer of stomach and the ABO blood groups. *British Medical Journal* 799–801.
- Al-Moundhri, M.S., Nirmala, V., Al-Hadabi, I., Al-Mawaly, K., Burney, I., Al-Nabhani, M., Thomas, V., Ganguly, S.S., Grant, C., 2005. The prognostic significance of p53, p27kip1, p21waf1, HER-2/neu, and Ki67 proteins expression in gastric cancer: A clinicopathological and immunohistochemical study of 121 Arab patients. *Journal of Surgical Oncology* **91**, 243–252.
- Albanese, I., Scibetta, A.G., Migliavacca, M., Russo, A., Bazan, V., Tomasino, R.M., Colomba, P., Tagliavia, M., La Farina, M., 2004. Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **325**, 784–791.
- Amundsen, S.A., Myers, T.G., Fornace Jr., A.J., 1998. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* **17**, 3287–3299.
- Bach, G., 1980. Beitrag zur Diagnose des Frühkarzinoms des Magens. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **105**, 1748–1751.
- Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Ajioka, Y., White, R., Vogelstein, B., 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**, 217–221.
- Baldus, S.E., Schaefer, K.-L., Engers, R., Hartleb, D., Stoecklein, N.H., Gabbert, H.E., 2010. Prevalence and Heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA Mutations in Primary Colorectal Adenocarcinomas and Their Corresponding Metastases. *Clinical Cancer Research* **16**, 790–799.
- Bang, Y.-J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H.C., Shen, L., Sawaki, A., Lordick, F., Ohtsu, A., Omuro, Y., Satoh, T., Aprile, G., Kulikov, E., Hill, J., Lehle, M., Rüschoff, J., Kang, Y.-K., 2010. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet* **376**, 687–697.

- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., Oren, M., 1993. Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *The EMBO Journal* **12**, 461–468.
- Barber, M.E., Save, V., Carneiro, F., Dwerryhouse, S., Lao-Sirieix, P., Hardwick, R.H., Caldas, C., Fitzgerald, R.C., 2008. Histopathological and molecular analysis of gastrectomy specimens from hereditary diffuse gastric cancer patients has implications for endoscopic surveillance of individuals at risk. *The Journal of Pathology* **216**, 286–294.
- Bellini, M.F., Cadamuro, A.C.T., Succi, M., Alcantara Proenca, M., Silva, A.E., 2012. Alterations of the TP53 gene in gastric and esophageal carcinogenesis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**, 891961.
- Bertuccio, P., Chatenoud, L., Levi, F., Praud, D., Ferlay, J., Negri, E., Malvezzi, M., La Vecchia, C., 2009. Recent patterns in gastric cancer: A global overview. *International Journal of Cancer* **125**, 666–673.
- Bettag, M., Blatt-Bodewig, M., Bokemeyer, C., Honecker, F., Glaßen, J., Distler, L., 2010. *Taschenbuch Onkologie: Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2010/2011, 15. Auflage*. W. Zuckerschwerdt Verlag, München.
- Boeckler, F.M., Joerger, A.C., Jaggi, G., Rutherford, T.J., Veprintsev, D.B., Fersht, A.R., 2008. Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 10360–10365.
- Bonenkamp, J.J., Hermans, J., Sasako, M., Welvaart, K., Songun, I., Meyer, S., Plukker, J.T.M., Van Elk, P., Obertop, H., Gouma, D.J., van Lanschot, J.J.B., Taat, C.W., de Graaf, P.W., von Meyenfeldt, M.F., Tilanus, H., van de Velde, C.J.H., 1999. Extended lymph-node dissection for gastric cancer. *New England Journal of Medicine* **340**, 908–914.
- Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise, N.D. (Eds.), 2010. *WHO classification of tumours of the digestive system, 4. Auflage*. World Health Organisation, Lyon.
- Brenner, H., Weyermann, M., Rothenbacher, D., 2006. Clustering of *Helicobacter pylori* infection in couples: differences between high- and low-prevalence population groups. *Annals of Epidemiology* **16**, 516–520.
- Brooks, C.L., Gu, W., 2003. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 164–171.

- Buob, D., Fauvel, H., Buisine, M.P., Truant, S., Mariette, C., Porchet, N., Wacrenier, A., Copin, M.-C., Leteurtre, E., 2012. The complex intratumoral heterogeneity of colon cancer highlighted by laser microdissection. *Digestive Diseases and Sciences* **57**, 1271–1280.
- Bykov, V.J.N., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K.G., Selivanova, G., 2002. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature Medicine* **8**, 282–288.
- Charlton, A., Blair, V., Shaw, D., Parry, S., Guilford, P., Martin, I.G., 2004. Hereditary diffuse gastric cancer: predominance of multiple foci of signet ring cell carcinoma in distal stomach and transitional zone. *Gut* **53**, 814–820.
- Chen, S., Chen, J., Ma, G., Xi, W., Xu, Q., Xu, W., Yin, G., 2011. Clinical therapeutic effect and biological monitoring of p53 gene in advanced hepatocellular carcinoma. *American Journal of Clinical Oncology* **90**, 2182–2186.
- Chen, W., Zheng, R., Zhang, S., Zhao, P., Li, G., Wu, L., He, J., 2013. The incidences and mortalities of major cancers in China, 2009. *Chinese Journal of Cancer* **32**, 106–112.
- Cho, J.H., Noguchi, M., Ochiai, A., Uchino, S., Hirohashi, S., 1994. Analysis of regional differences of p53 mutation in advanced gastric carcinoma: relation to heterogeneous differentiation and invasiveness. *Modern Pathology* **7**, 205–211.
- Cross, S.M., Sanchez, C.A., Morgan, C.A., Schimke, M.K., Ramel, S., Idzerda, R.L., Raskind, W.H., Reid, B.J., 1995. A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* **267**, 1353–1356.
- Devesa, S.S., Fraumeni Jr., J.F., 1999. The rising incidence of gastric cardia cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 747–749.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., Wahl, G.M., 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and a long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & Development* **8**, 2540–2551.
- Dietrich, C.F., Kratzer, W., Strobe, D., Danse, E., Fessler, R., Bunk, A., Vossas, U., Hauenstein, K., Koch, W., Blank, W., Oudkerk, M., Hahn, D., Greis, C., 2006. Assessment of metastatic liver disease in patients with primary extrahepatic tumors by contrast-enhanced sonography versus CT and MRI. *World Journal of Gastroenterology* **12**, 1699–1705.

- Donehower, L.A., 2002. Does p53 affect organismal aging? *Journal of Cellular Physiology* **192**, 23–33.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.M., McArthur, M.J., Montgomery Jr., C.A., Butel, J.S., Bradley, A., 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215–221.
- El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics* **1**, 45–49.
- Eliyahu, D., Goldfinger, N., Pinhasi-Kimhi, O., Shaulsky, G., Skurnik, Y., Arai, N., Rotter, V., Oren, M., 1988. Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. *Oncogene* **3**, 313–321.
- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H., Weissman, A.M., 2000. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 8945–8951.
- Felsher, D.W., Zetterberg, A., Zhu, J., Tlsty, T., Bishop, J.M., 2000. Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 10544–10548.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W., Tan, T.H., Eliyahu, D., Oren, M., Levin, A.J., 1988. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms a hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 531–539.
- Fischbach, W., Malfertheiner, P., Hoffmann, J.C., Bolten, W., Bornschein, J., Götze, O., Höhne, W., Kist, M., Koletzko, S., Labenz, J., Layer, P., Miehlke, S., Morgner, A., Peitz, U., Preiß, J.C., Prinz, C., Rosien, U., Schmidt, W.E., Schwarzer, A., Suerbaum, S., Timmer, A., Treiber, G., Vieth, M., 2009. S3-Leitlinie “*Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulcuskrankheit” der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DVGs). *Gastroenterology* **47**, 68–102.
- Fitzgerald, R.C., Hardwick, R., Huntsman, D., Carneiro, F., Guilford, P., Blair, V., Chung, D.C., Norton, J., Ragnath, K., Van Krieken, J.H., Dwerryhouse, S., Caldas, C., 2010. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *Journal of Medical Genetics* **47**, 436–444.
- Fock, K.M., Talley, N., Moayyedi, P., Hunt, R., Azuma, T., Sugano, K., Xiao, S.D., Lam, S.K., Goh, K.L., Chiba, T., Uemura, N., Kim, J.G., Kim, N., Ang, T.L., Mahachai, V., Mitchell, H., Rani, A.A., Liou, J.M., Vilaichone, R., Sollano, J., 2008. Asia-Pacific consensus guidelines on gastric cancer prevention. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **23**, 351–365.



- Freed-Pastor, W.A., Prives, C., 2012. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & Development* **26**, 1268–1286.
- Fridman, J.S., Lowe, S.W., 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030–9040.
- Fujioka, T., Honda, S., Tokieda, M., 2000. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma in animal models. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **15**, D55–59.
- Fukunari, H., Iwama, T., Sugihara, K., Miyaki, M., 2003. Intratumoral heterogeneity of genetic changes in primary colorectal carcinomas with metastasis. *Surgery Today* **33**, 408–413.
- Gabrilovich, I.D., 2006. INGN 201 (Advexin®): adenoviral p53 gene therapy for cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* **6**, 823–832.
- Ghosh, P., Zhang, J., Shi, Z.-Z., Li, K., 2013. Synthesis and evaluation of an imidazole derivative–fluorescein conjugate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **21**, 2418–2425.
- Glimelius, B., Ekström, K., Hoffman, K., Graf, W., Sjödén, P.-O., Haglund, U., Svensson, C., Enander, L.-K., Linné, T., Sellsröm, H., Heuman, R., 1997. Randomized comparison between chemotherapy plus best supportive care with best supportive care in advanced gastric cancer. *Annals of Oncology* **8**, 163–168.
- Göhler, T., Jäger, S., Warnecke, G., Yasuda, H., Kim, E., Deppert, W., 2005. Mutant p53 proteins bind DNA in a DNA structure-selective mode. *Nucleic Acid Research* **33**, 1087–1100.
- Gonçalves, A.R., Carneiro, A.J.V., Martins, I., de Faria, P.A.S., Ferreira, M.A., de Mello, E.L.R., Fogaça, H.S., Elia, C.C.S., de Souza, H.S.P., 2011. Prognostic significance of p53 protein expression in early gastric cancer. *Pathology & Oncology Research* **17**, 349–355.
- Guilford, P., Hopkins, J., Harraway, J., McLeod, M., McLeod, N., Harawira, P., Taite, H., Scoular, R., Miller, A., Reeve, A.E., 1997. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* **392**, 402–405.
- Hainaut, P., Hall, A., Milner, J., 1994. Analysis of p53 quaternary structure in relation to sequence-specific DNA binding. *Oncogene* **9**, 299–303.

- Hamashima, C., Shibuya, D., Yamazaki, H., Inoue, K., Fukao, A., Saito, H., Sobue, T., 2008. The Japanese guidelines for gastric cancer screening. *Japanese Journal of Clinical Oncology* **38**, 259–267.
- Han, S.R., Schneider, T., Loos, M., Bhakdi, S., Maeurer, M.J., 1999. One-step polymerase chain reaction-based typing of *Helicobacter pylori* vacA gene: association with gastric histopathology. *Medical Microbiology and Immunology* **188**, 131–138.
- Hansen, S., Hupp, T.R., Lane, D.P., 1996. Allosteric regulation of the thermostability and DNA binding activity of human p53 by specific interacting proteins. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 3917–3924.
- Herold, G., 2010. *Innere Medizin*. Köln.
- Howlader, N., Noone, A., Krapcho, M., Neyman, N., Dominguez, R.L., Altekruse, S.F., Kosary, C.L., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Cho, H., Mariotto, A., Eisner, M.P., Lewis, D.R., Chen, H., Feuer, E.J., Cronin, K.A. (Eds.), 2012. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), based on November 2011 SEER data submission. *National Cancer Institute, Bethesda, MD*.
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., Lane, D.P., 1992. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* **71**, 875–886.
- Issaeva, N., Bozko, P., Enge, M., Protopopova, M., Verhoef, L.G.G.C., Masucci, M., Pramanik, A., Selivanova, G., 2004. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53–HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nature Medicine* **10**, 1321–1328.
- Iwamatsu, H., Nishikura, K., Watanabe, H., Ajioka, Y., Hashidate, H., Kashimura, H., Asakura, H., 2001. Heterogeneity of p53 mutational status in the superficial spreading type of early gastric carcinoma. *Gastric Cancer* **4**, 20–26.
- Juvan, R., Hudler, P., Gazvoda, B., Repse, S., Bracko, M., Komel, R., 2007. Significance of genetic abnormalities of p53 protein in Slovenian patients with gastric carcinoma. *Croatian Medical Journal* **48**, 207–217.
- Kastriakis, W.V., Ramchurren, N., Rieger, K.M., Hess, D.T., Loda, M., Steele, G., Summerhayes, I.C., 1995. Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression. *Oncogene* **11**, 647–652.

- Kitamura, K., Yamaguchi, T., Okamoto, K., Nishida, T., Takahashi, T., 1996. Superficial spreading type of early gastric cancer. *British Journal of Cancer* **74**, 1834–1837.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R., May, P., 1979. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti simian virus 40 tumor serum. *Journal of Virology* **31**, 472–483.
- Kwee, R.M., Kwee, T.C., 2007. Imaging in local staging of gastric cancer: A systematic review. *Journal of Clinical Oncology* **25**, 2107–2116.
- Lane, D.P., Crawford, L.V., 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261–263.
- Laurén, P., 1965. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* **64**, 31–49.
- Lehmann, S., Bykov, V.J.N., Ali, D., Andrén, O., Cherif, H., Tidefelt, U., Uggla, B., Yachnin, J., Juliusson, G., Moshfegh, A., Paul, C., Wiman, K.G., Andersson, P.-O., 2012. Targeting p53 in vivo: A first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* **30**, 3633–3639.
- Linzer, D.I.H., Levine, A.J., 1979. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43–52.
- Lu, H., Levine, A.J., 1995. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5154–5158.
- Macchiarulo, A., Giacchè, N., Mancini, F., Puxeddu, E., Moretti, F., Pellicciari, R., 2011. Alternative strategies for targeting mouse double minute 2 activity with small molecules: novel patents on the horizon? *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **21**, 287–294.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni Jr., J.F., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., Tainsky, M.A., 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science* **250**, 1233–1238.
- Maltzman, W., Czyzyk, L., 1984. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Molecular and Cellular Biology* **4**, 1689–1694.

- Matsuda, A., Matsuda, T., Shibata, A., Katanoda, K., Sobue, T., Nishimoto, H., The Japan Cancer Surveillance Research Group, 2013. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2007: A study of 21 population-based cancer registries for the monitoring of cancer incidence in Japan (MCIJ) project. *Japanese Journal of Clinical Oncology* **43**, 328–336.
- Mendonça Guimaraes, R., Drumond Muzi, C., 2012. Trend of mortality rates for gastric cancer in Brazil and regions in the period of 30 years (1980-2009). *Arquivos de Gastroenterologia* **49**, 184–188.
- Ming, S.-C., 1998. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: A critical review. *Gastric Cancer* **1**, 31–50.
- Moehler et al., 2011. S3-Leitlinie „Magenkarzinom“ – Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs. *Gastroenterology* **49**, 461–531.
- Moll, U.M., Wolff, S., Speidel, D., Deppert, W., 2005. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Current Opinion in Cell Biology* **17**, 631–636.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., Levine, A.J., 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53 mediated transformation. *Cell* **69**, 1237–1245.
- Murphy, G., Pfeiffer, R., Camargo, M.C., Rabkin, C.S., 2009. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology* **137**, 824–833.
- Oda, I., Saito, D., Tada, M., Iishi, H., Tanabe, S., Oyama, T., Doi, T., Otani, Y., Fujisaki, J., Ajioka, Y., Hamada, T., Inoue, H., Gotoda, T., Yoshida, S., 2006. A multicenter retrospective study of endoscopic resection for early gastric cancer. *Gastric Cancer* **9**, 262–270.
- Odenbreit, S., Swoboda, K., Barwig, I., Ruhl, S., Borén, T., Koletzko, S., Haas, R., 2009. Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infection and Immunity* **77**, 3782–3790.
- Oden-Gangloff, A., Di Fiore, F., Bibeau, F., Lamy, A., Bougeard, G., Charbonnier, F., Blanchard, F., Tougeron, D., Ychou, M., Boissière, F., Le Pessot, F., Sabourin, J.-C., Tuech, J.-J., Michel, P., Frebourg, T., 2009. TP53 mutations predict disease control in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-based chemotherapy. *British Journal of Cancer* **100**, 1330–1335.

- Offner, S., Schmaus, W., Witter, K., Baretton, G.B., Schlimok, G., Passlick, B., Riethmüller, G., Pantel, K., 1999. p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 6942–6946.
- Oliner, J.D., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1993. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* **362**, 857–860.
- Oliveira, C., Senz, J., Kaurah, P., Pinheiro, H., Sanges, R., Haegert, A., Corso, G., Schouten, J., Fitzgerald, R., Vogelsang, H., Keller, G., Dwerryhouse, S., Grimmer, D., Chin, S.-F., Yang, H.-K., Jackson, C.E., Seruca, R., Roviello, F., Stupka, E., Caldas, C., Huntsman, D., 2009a. Germline CDH1 deletions in hereditary diffuse gastric cancer families. *Human Molecular Genetics* **18**, 1545–1555.
- Oliveira, C., Seruca, R., Carneiro, F., 2009b. Hereditary gastric cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **23**, 147–157.
- Paterson, H.J., 1931. The early diagnosis of gastric cancer. *The Post-Graduate Medical Journal* **6**, 87–92.
- Peng, Z., 2005. Current status of Gendicine in China: Recombinant human ad-p53 agent for treatment of cancers. *Human Gene Therapy* **16**, 1016–1027.
- Plummer, M., Franceschi, S., Muñoz, N., 2004. Epidemiology of gastric cancer. *IARC scientific publications* **157**, 311–326.
- Porras, C., Nodora, J., Sexton, R., Ferreccio, C., Jimenez, S., Dominguez, R.L., Cook, P., Anderson, G., Morgan, D.R., Baker, L.H., Greenberg, E.R., Herrero, R., 2013. Epidemiology of Helicobacter pylori infection in six Latin American countries. *Cancer Causes Control* **24**, 209–215.
- Puli, S.-R., Batapati Krishna Reddy, J., Bechtold, M.L., Antillon, M.R., Ibdah, J.A., 2008. How good is endoscopic ultrasound for TNM staging of gastric cancers? A meta analysis and systematic review. *World Journal of Gastroenterology* **14**, 4011–4019.
- Qiu, M., Cai, M., Zhang, D., Wang, Z., Wang, D., Li, Y., Xu, R., 2013. Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of Lauren classification in gastric adenocarcinoma in China. *Journal of Translational Medicine* **11**, 1–7.
- Reim, D., Loos, M., Vogl, F., Novotny, A., Schuster, T., Langer, R., Becker, K., Höfler, H., Siveke, J., Bassermann, F., Friess, H., Schuhmacher, C., 2013.

Prognostic implications of the seventh edition of the International Union Against Cancer classification for patients with gastric cancer: The western experience of patients treated in a single-center european institution. *Journal of Clinical Oncology* **31**, 263–271.

- Renault, B., van den Broek, M., Fodde, R., Wijnen, J., Pellegata, N.S., Amadori, D., Khan, P.M., Ranzani, G.N., 1993. Base transitions are the most frequent genetic changes at p53 in gastric cancer. *Cancer Research* **53**, 2614–2617.
- Renault, T.T., Floros, K.V., Chipuk, J.E., 2013. BAK/BAX activation and cytochrome c release assays using isolated mitochondria. *Methods* **61**, 146–155.
- Retzlaff, M., Rohrberg, J., Küpper, N.J., Lagleder, S., Bepperling, A., Manzenrieder, F., Peschek, J., Kessler, H., Buchner, J., 2013. The regulatory domain stabilizes the p53 tetramer by intersubunit contacts with the DNA binding domain. *Journal of Molecular Biology* **425**, 144–155.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2012. *Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe*. Berlin.
- Robert Koch-Institut (Hrsg.), 2010. *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Berlin.
- Schmidt-Kittler, O., Ragg, T., Daskalakis, A., Granzow, M., Ahr, A., Blankenstein, T.J.F., Kaufmann, M., Diebold, J., Arnholdt, H., Müller, P., Bischoff, J., Harich, D., Schlimok, G., Riethmüller, G., Eils, R., Klein, C.A., 2003. From latent disseminated cells to overt metastasis: Genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 7737–7742.
- Schön, D., Bertz, J., Görsch, B., Haberland, J., Kurth, B.-M., 2004. *Die Dachdokumentation Krebs. Eine Surveillance-Einrichtung der Krebsregistrierung in Deutschland. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **47**, 429–436.
- Schrader, K.A., Masciari, S., Boyd, N., Wiyrick, S., Kaurah, P., Senz, J., Burke, W., Lynch, H.T., Garber, J.E., Huntsman, D.G., 2008. Hereditary diffuse gastric cancer: association with lobular breast cancer. *Familial Cancer* **7**, 73–82.
- Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C. (Eds.), 2009. *TNM classification of malignant tumours, 7. Auflage*. International Union Against Cancer. John Wiley & Sons, Chichester.

- Soussi, T., Lozano, G., 2005. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331**, 834–842.
- Tahara, E., 1993. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **119**, 265–272.
- Tatematsu, M., Nozaki, K., Tsukamoto, T., 2003. Helicobacter pylori infection and gastric carcinogenesis in animal models. *Gastric Cancer* **6**, 1–7.
- Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R., Tjian, R., 1995. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* **267**, 100–104.
- Toshiyuki, M., Reed, J.C., 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293–299.
- Tovar, C., Higgins, B., Kolinsky, K., Xia, M., Packman, K., Heimbrook, D.C., Vassilev, L.T., 2011. MDM2 antagonists boost antitumor effect of androgen withdrawal: implications for therapy of prostate cancer. *Molecular Cancer* **10**, 49–59.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N., Liu, E.A., 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844–848.
- Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L., Baker, L., 1998. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *The EMBO Journal* **17**, 4668–4679.
- Villalonga-Planells, R., Coll-Mulet, L., Martínez-Soler, F., Castaño, E., Acebes, J.-J., Giménez-Bonafé, P., Gil, J., Tortosa, A., 2011. Activation of p53 by Nutlin-3a induces apoptosis and cellular senescence in human glioblastoma multiforme. *PLOS ONE* **6**, e18588.
- Wang, C., Chen, J., 2003. Phosphorylation and hsp90 binding mediate heat shock stabilization of p53. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 2066–2071.
- Washington, K., 2010. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: Stomach. *Annals of Surgical Oncology* **17**, 3077–3079.
- Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S., Nakao, M., 1998. Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* **115**, 642–648.

- Wei, C.-L., Wu, Q., Vega, V.B., Chiu, K.P., Ng, P., Zhang, T., Shahab, A., Yong, H.C., Fu, Y., Weng, Z., Liu, J., Zhao, X.D., Chew, J.-L., Lee, Y.L., Kuznetsov, V.A., Sung, W.-K., Miller, L.D., Lim, B., Liu, E.T., Yu, Q., Ng, H.H., Ruan, Y., 2006. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* **124**, 207–219.
- Wheeldon, T.-U., Hoang, T.T.H., Phung, D.C., Björkman, A., Granström, M., Sörberg, M., 2005. Long-term follow-up of *Helicobacter pylori* eradication therapy in Vietnam: reinfection and clinical outcome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **21**, 1047–1053.
- Wieczorek, A.M., Waterman, J.L., Waterman, M.J., Halazonetis, T.D., 1996. Structure-based rescue of common tumor-derived p53 mutants. *Nature Medicine* **2**, 1143–1146.
- Wong, B., Honda, S., Wong, W., Chen, J., Zheng, T., Feng, R., Lai, K., Hu, W., Yuen, S., Leung, S., Fong, D., Ho, J., Ching, C., Chen, J., 2004. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* **291**, 187–194.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., Levine, A.J., 1993. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & Development* **7**, 1126–1132.
- Zhang, J.-S., Caplin, S., Bosman, F.T., Benhattar, J., 1997. Genetic diversity at the p53 locus between primary human colorectal adenocarcinomas and their lymph-node metastases. *International Journal of Cancer* **70**, 674–678.
- Zhao, C.Y., Grinkevich, V., Nikulenkov, F., Bao, W., Selivanova, G., 2010. Rescue of the apoptotic-inducing function of mutant p53 by small molecule RITA. *Cell Cycle* **9**, 1847–1855.
- Zilberstein, B., Jacob, C.E., Cecconello, I., 2012. Gastric cancer trends in epidemiology. *Arquivos de Gastroenterologia* **49**, 177–178.



## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### (abgeleitete) SI-Einheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
h	Stunde(n)
kDa	Kilodalton
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
sec	Sekunde(n)

### sonstige Abkürzungen

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma 2-extra large</i>
bp	Basenpaar
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
CA	Karzinom
CagA	<i>cytotoxin-associated protein A</i>
cdk2	<i>cyclin-dependent kinase 2</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
COSMIC	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>

---

<b>DBD</b>	DNA-bindende oder Core-Domäne von p53
<b>ddNTP</b>	Didesoxyribonucleosidtriphosphat
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>dNTP</b>	Desoxyribonucleosidtriphosphat
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>H. pylori</b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>HCl</b>	Chlorwasserstoff
<b>HDGC</b>	<i>hereditary diffuse gastric cancer</i>
<b>HE-Färbung</b>	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
<b>HER-2</b>	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
<b>HNPCC</b>	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
<b>Hop</b>	<i>Helicobacter outer membrane porin</i>
<b>Hor</b>	<i>Hop related protein</i>
<b>Hsp</b>	<i>Heat shock protein</i>
<b>IGCLC</b>	<i>International Gastric Cancer Linkage Consortium</i>
<b>KRAS</b>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<b>MDM2 / HDM2</b>	<i>mouse double minute 2 / human double minute 2</i>
<b>NTD</b>	aminoternale Domäne von p53
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>PIK3CA</b>	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate3-kinase</i>
<b>PRIMA</b>	<i>p53 reactivation and induction of massive apoptosis</i>
<b>RB-Protein</b>	<i>retinoblastoma protein</i>
<b>RD</b>	carboxyterminale Regulierungsdomäne von p53
<b>RITA</b>	<i>reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis</i>
<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i>
<b>TBE-Puffer</b>	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<b>TD</b>	Tetramerisierungsdomäne von p53
<b>TE-Puffer</b>	Tris-EDTA-Puffer
<b>Tris</b>	Trishydroxymethylaminomethan
<b>UICC</b>	<i>Union for International Cancer Control</i>
<b>VacA</b>	<i>vacuolating toxin A</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organisation</i>

## 8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. med. Stephan E. Baldus für die Vergabe dieses Promotionsthemas, seine Unterstützung und Betreuung auf dem gesamten Weg.
- PD Dr. rer. nat. Karl Ludwig Schäfer für seine lange fachliche Beratung bezüglich der Auswertung und Statistik.
- Giuseppe Cadeddu für seine Hilfe und seinen Rückhalt in jeder Situation; für die vielen beantworteten Fragen, auch ohne offiziellen Betreuerstatus.
- Ingrid Büchmann für ihre ausführliche Anleitung der DNA-Extraktion und ihre Hilfe bei allen Fragen, die „zwischendurch“ auftraten.
- Marianne Niermann-Kaiser, Isabelle Messner und Yvonne Daniluk für ihre Unterstützung und Hilfestellung im Labor, das stundenweise Überlassen eines leistungsfähigen PC und die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Jeannine Meinrath für diverse Archivarbeiten, besonders als ich alleine arbeiten musste.
- Julianna Englisch, meiner Mitkämpferin an allen Fronten.
  
- Meinem Mann Thomas Mones, der mich motiviert und seine gesamte Geduld für mich aufgebracht hat.
- Meiner Mutter Anne Mones, die mir mein Studium und vieles mehr ermöglicht hat, für ihre Hilfe und Unterstützung in allen Phasen.
- Milanka Krämer, ohne die ein erfolgreiches Medizinstudium mit Promotion (und Spaß!) schlichtweg nicht möglich gewesen wäre.
- Und zuletzt: Diddi, die zwar nicht mehr hier, aber trotzdem immer bei mir ist.

## **9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

-----

Ort, Datum

-----

Daniela Mones