

**Aus der Abteilung für Allgemeinchirurgie  
des Universitätskrankenhauses Eppendorf in Hamburg  
( Direktor Prof. Dr. med. J. R. Izbicki )**

**Die Bedeutung des Tumorsuppressorgens p53  
in der Karzinogenese  
neuroendokriner Tumoren**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
am Fachbereich Medizin der Universität Hamburg**

**vorgelegt von Jens Aberle**

# **INHALTSVERZEICHNIS**

## **I. EINLEITUNG**

### **1. Grundlagen der Krebsentstehung 4**

### **2. Onkogene und Antionkogene**

#### **2.1. Onkogene 5 - 10**

#### **2.2. Antionkogene 10 - 13**

### **3. Das p53-Gen**

#### **3.1. p53 Genstruktur 14 - 15**

#### **3.2. p53 Proteinstruktur 15 - 17**

#### **3.3. Biochemische Wirkungen des p53-Proteins 18 - 26**

#### **3.4. Regulation und Modulation der p53 Funktion 26 - 31**

#### **3.5. p53 Mutationen 31 - 33**

#### **3.6. Nachweisverfahren von p53 Mutationen 34**

### **4. Das Diffuse Neuroendokrine System**

#### **4.1. Die neuroendokrine Lunge 36**

#### **4.2. Das neuroendokrine Verdauungssystem 37**

### **5. Neuroendokrine Neoplasien**

#### **5.1. Klinisches Erscheinungsbild neuroendokriner Tumoren 41 - 43**

#### **5.2. Onkogene und Antionkogene in neuroendokrinen Tumoren 43 - 44**

## **II. MATERIAL UND METHODEN**

### **1. Patienten und Probenmaterial 45 - 46**

### **2. Reagenzien**

#### **2.1. Immunhistochemie 46 - 47**

#### **2.2. Molekularbiologie 47 - 48**

### **2. Immunhistochemie**

#### **3.1. Vorbereitung der Operationspräparate 49**

#### **3.2. Die Immunperoxidase-Technik 49 - 50**

#### **3.3. Auswertung 51**

### **3. Molekularbiologie**

#### **4.1. Patienten und Probenmaterial 51**

#### **4.2. Probenaufarbeitung 51 - 52**

#### **4.3. Die Polymerasekettenreaktion 52 - 53**

#### **4.4. Die SSCP 54 - 55**

## **III. ERGEBNISSE**

### **1. Ergebnisse der Immunhistochemie 56 - 57**

### **2. Ergebnisse der Molekularbiologie 58 - 59**

## **IV. DISKUSSION 60 - 74**

## **V. LITERATURVERZEICHNIS 75 - 79**

# **I. EINLEITUNG**

## **1. Grundlagen der Krebsentstehung**

Es gilt heute als gesichert, daß Tumoren durch genetische Veränderungen entstehen. Die Ursachen, welche zu Alterationen an der DNA führen, sind vielschichtig. Als chemische Karzinogene werden beispielsweise Substanzen bezeichnet, die beim Menschen oder im Tierversuch die Inzidenz maligner Tumoren erhöhen. In der Regel rufen chemische Karzinogene definierte Basenveränderungen an der DNA hervor. Ein bekanntes Beispiel ist Methyl-N-Nitrosoharnstoff, welcher über die Bildung von O<sup>6</sup>-Methylguanin eine Transition hervorrufen kann.

Ionisierende und nicht ionisierende Strahlung kann ebenfalls Tumoren beim Menschen induzieren. So kann UV-Strahlung z.B. zu Verknüpfungen zwischen den Basen der DNA führen. Die dabei am häufigsten beobachtete Läsion ist die Bildung sog. Thymin-Dimere, zwei Thymin-Basen, die über einen Zylobutanring miteinander verbunden sind.

Die Existenz krebserzeugender Viren ist bereits seit 1910 bekannt. Peyton Rous zeigte, daß abgegrenzte und mikroskopisch nicht sichtbare Erreger, die er aus einem Hühnersarkom filtrierte, bei gesunden Hühnern neue Sarkome hervorrufen konnten [1]. Der Erreger wurde in der Folgezeit als Virus erkannt und nach seinem Entdecker Rous Sarkom Virus (RSV) benannt. Inzwischen sind eine Reihe weiterer Viren mit tumorigenem Potential bekannt. Die meisten davon gehören zur Gruppe der sog. Retroviren, welche nach der Infektion einer Zelle ihr Genom in die DNA der Wirtszelle einbauen und auf unterschiedliche Weise zur Dysregulation bestimmter Wachstumsgene, sog. Onkogene führen. Auf diese Weise können sie ihr tumorigenes Potential entfalten.

In menschlichen Tumoren lassen sich darüber hinaus mit zytogenetischen Methoden charakteristische Chromosomenanomalien nachweisen. Häufig kommt es hierbei zu Chromosomenbrüchen, welche in der Folge zum Austausch von Chromosomenabschnitten, sog. Translokationen, führen können. Ein bekanntes Beispiel ist das Burkitt-Lymphom. In den betroffenen Zellen findet man in der großen Mehrzahl der Fälle einen reziproken Austausch zwischen den distalen Enden der langen Arme der Chromosome 8 und 14. Hierdurch kommt das Onkogen *c-myc* unter die Kontrolle von Immuglobulin-Sequenzen mit hoher Transkriptionsaktivität.

## 2. Onkogene und Antionkogene

Prinzipiell lassen sich zwei verschiedene Formen von genetischen Veränderungen in menschlichen Tumoren finden [2]. Zum einen können Gene, durch Mutationen oder Fehlregulation verändert, aktiv an der Onkogenese beteiligt sein. Solche Gene werden im allgemeinen als Onkogene bezeichnet. Zum anderen gibt es Gene, die durch den Verlust eines oder beider Allele zur malignen Transformation einer Zelle beitragen. Diese Gene werden als Antionkogene oder Tumorsuppressorgene bezeichnet.

Ein gemeinsames Merkmal von Tumoren ist die Fehlregulation der Zellproliferation. Es ist daher verständlich, wenn viele Onkogene und Antionkogene an der Steuerung der Zellteilung mitwirken.

### 2.1. Onkogene

Die Onkogene kodieren für eine Gruppe von Proteinen, die über eine Stafette von Signalübertragungen die Zellvermehrung steuern. Dabei haben sie eine dominante Wirkung, d.h. es genügt die Änderung in einem Allel, um eine übermäßige bzw. nicht zyklusgerechte Genexpression auszulösen [3]. Funktionell lassen sich die Onkogene in vier Gruppen einteilen: a. Wachstumsfaktoren, b. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, c. Signalübermittler von der Zellmembran zum Zellkern und d. Transkriptionsfaktoren.

#### a. Wachstumsfaktoren

Zur Gruppe der *Wachstumsfaktoren* gehört das Onkogen *c-sis*, welches die Information für die A-Kette des Blutplättchenwachstumsfaktors (PDGF) beinhaltet. Dieser ist in der Lage, nach seiner Freisetzung aus den Thrombozyten im Rahmen der Blutgerinnung das Wachstum von Fibrozyten anzuregen und so zur Wundheilung beizutragen.

## b. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren

Die Klasse der *Wachstumsfaktorrezeptoren* wird gebildet durch die sog. Rezeptortyrosinkinasen. Ihr Grundbauplan besteht aus einer extrazellulären Domäne, einem hydrophoben transmembranösen Anteil und einer zytoplasmatischen Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität.

Durch die Bindung des jeweiligen Liganden wird zunächst eine Dimerisierung der monomeren Rezeptorproteine in der Zellmembran ausgelöst. Diese Konformationsänderung bewirkt eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten der eigenen intrazytoplasmatischen Domäne und nachfolgend die Phosphorylierung von Tyrosinresten zellulärer Folgeproteine [4]. Die Tabelle I.1 faßt Gene und Genprodukte der Rezeptortyrosinkinasen zusammen.

Gen	Genprodukt
<i>erb B</i>	EGF-Rezeptor
PDGFR $\beta$	PDGF-Rezeptor $\beta$
<i>ret</i>	Rezeptor-Tyrosinkinase
<i>met</i>	HGF-Rezeptor
<i>trk</i>	NGF-Rezeptor
<i>kit</i>	SCF-Rezeptor
<i>fms</i>	CSF-1-Rezeptor

Tab. I.1 Gene und Genprodukte der Rezeptortyrosinkinasen

Bei durch Mutationen veränderten Rezeptortyrosinkinasen findet man häufig eine konstitutive Dimerisierung und Aktivierung. So zeigen sich in der Hälfte aller fortgeschrittenen Glioblastome und in etwa einem Viertel aller Mammakarzinome Punktmutationen in der transmembranösen Domäne des *erbB* Onkogens, was eine konstante Dimerisierung zur Folge hat [5].

## c. Signalübertragungsproteine

Bei den *intrazellulären Folgeproteinen der Wachstumsfaktorrezeptoren* handelt es sich ebenfalls um Tyrosinkinasen, jedoch ohne extrazelluläre oder transmembranöse Domäne. Die Tab. I.2 gibt einen Überblick über die verschiedenen sog. Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen.

Gen	Funktion
abl	unbekannt
ack	G-Proteingekoppelte Signalübermittlung
csk	src-Regulation
fak	Fokale Adhäsion
Janus	Signaltransduktion von Cytokin-Rezeptoren
src	Signaltransduktion verschiedener Systeme
zap 70	Signaltransduktion von T-und B-Zell-Rezeptoren

Tab. I.2 Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen

Bekanntester Vertreter dieser Gruppe ist das Produkt des *src*-Onkogens, pp60SRC [6]. Es ist unterhalb der Zellmembran lokalisiert und an dieser über einen N-terminalen Myristinsäurerest befestigt. Neben der katalytischen Domäne mit Kinaseaktivität enthält das Protein zwei sog. SRC-Homologiedomänen (SH2 und SH3). Sie binden an phosphorylierte Tyrosinreste in typischer Aminosäuresequenz. Dadurch erfährt das Protein eine Konformationsänderung und wird in einen aktiven Zustand versetzt, verdeutlicht in Abb. I.1.

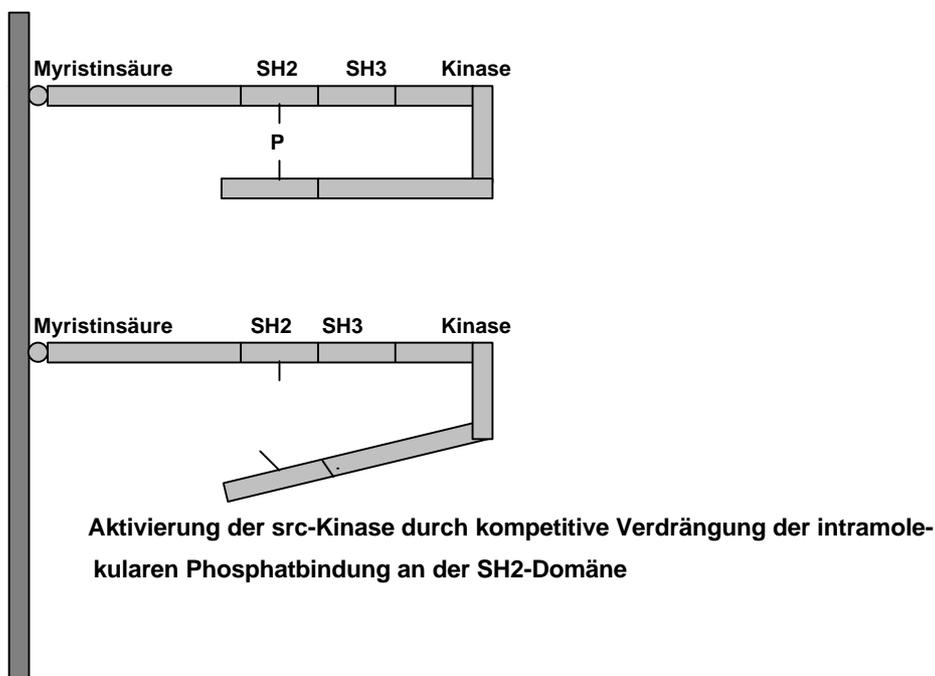


Abb. I.1 SRC-Aktivierung

Neben dem Onkoprotein pp60SRC binden die Tyrosinkinase-Rezeptoren der Wachstumsfaktoren eine Reihe weiterer zytoplasmatischer Folgeproteine. Die Bindung erfolgt in der Regel, wie beim Protein pp60SRC, über eine SH2 bzw. SH3 Domäne. Wie in Abb. I.2 dargestellt, treten die Proteine dabei in Kontakt mit einem Phosphotyrosinrest des intrazellulären Abschnitts des Tyrosinkinase-rezeptordimers.

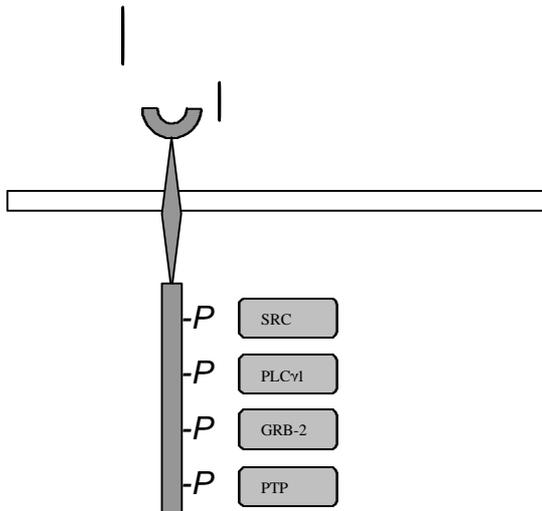


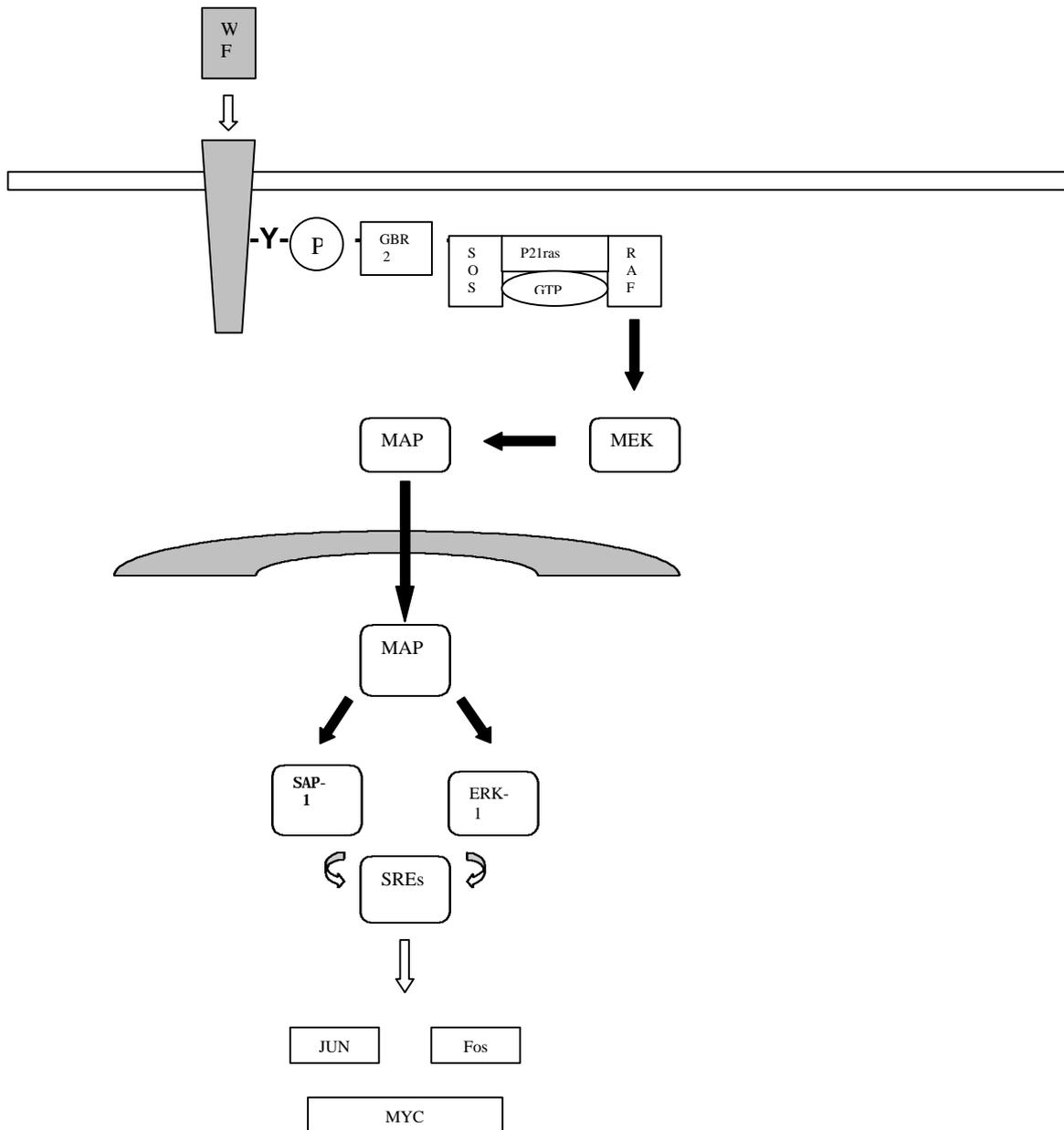
Abb. I.2 Folgeproteine der Tyrosinkinase-rezeptoren

#### d. Transkriptionsfaktoren

Die vierte Gruppe der Onkogene bilden die sog. *Transkriptionsfaktoren*. Deren Aktivierung steht in der Regel am Ende einer Reaktionskaskade, die durch die Bindung eines Wachstumsfaktors an den entsprechenden Membranrezeptor in Gang gesetzt wurde. Die Transkriptionsfaktoren wiederum können an Promoterbereiche verschiedener Gene binden und dadurch deren Expression steigern. Bekannte Vertreter dieser Gruppe der Onkogene sind die sog. "early response factors" *fos* und *jun* sowie das Produkt des Onkogens *c-myc*.

Am Beispiel einer erst seit kurzer Zeit bekannten Signalkaskade sollen die verschiedenartigen Funktionen der Onkogene exemplarisch verdeutlicht werden. Wie auch in Abbildung I.3 zu erkennen ist, folgt nach der Bindung eines *extrazellulären Wachstumsfaktors* an den *transmembranösen Rezeptor* und dessen Aktivierung, die Phosphorylierung einer Reihe von *signalübertragenden*

**Folgeproteinen.** Nach Translokation des Signals in den Zellkern erfolgt dort die Aktivierung von *Transkriptionsfaktoren* [7,8].



**Abb. I.3 Zellstimulation durch einen Wachstumsfaktor**  
**WF, Wachstumsfaktor; MAP, „microtubule associated protein kinases“;**  
**ERK, „extracellular signal related kinases“; SRE, „serum response element“**

Es ist heute bekannt, daß *c-myc* den Zellzyklus verschiedenartig beeinflussen kann. So ist es in der Lage, nach Phosphorylierung durch die *cdk2*-Kinase, den Cyclin A – Promoter zu transaktivieren. Cyclin A ist notwendig zur Progression des Zellzyklus von der S- und der G2- Phase [9].

## 2.2. Antionkogene

Die Antionkogene oder Tumorsuppressorgene stellen als negative Regulatoren der Zellteilung den Gegenpunkt der Onkogene dar [10]. Mit Ausnahme der Leukämien und Lymphome sind in der Mehrzahl der menschlichen Krebsarten die Antionkogene die häufiger veränderten Gene. Zusätzlich sind eine Reihe von hereditären Erkrankungen bekannt, denen eine heterozygote Veränderung in einem Tumorsuppressorgen zu Grunde liegt. Die korrespondierenden, nichterblichen Krebsarten zeigen häufig die gleichen Abnormalitäten in den Antionkogenen, wie sie in hereditären Fällen gefunden werden. Sieben Antionkogene konnten bis 1993 geklont werden, und verschiedene andere wurden beschrieben. Hier soll nun zunächst kurz auf die am besten bekannten Antionkogene eingegangen werden und im Folgenden das p53-Gen ausführlich beschrieben werden.

- Das Retinoblastomgen

Das Retinoblastomgen ist auf dem Chromosom 13q14.2 lokalisiert. Es kodiert für ein nukleäres Phosphoprotein mit einer relativen Molmasse von 105.000 Dalton. Das Protein besitzt verschiedene funktionell bedeutsame Domänen, darunter die sog. Retinoblastomtasche („RB-Pocket“). Diese besteht aus den, durch eine kurze Aminosäuresequenz getrennten A- und B-Subdomänen. Mit ihr assoziieren sich Faktoren, die für die Wirkung des RB-Proteins essentiell sind. Außerdem liegen sämtliche in humanen Tumoren gefundenen Punktmutationen im Bereich der RB-Bindungstasche. Die biochemische Funktion des RB-Genproduktes ist nur teilweise geklärt. Es wird vor allem in der G1-Phase des Zellzyklus von dem kinaseaktiven ZyklinD1-CDK4-Komplex an Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Dadurch werden verschiedene mit RB assoziiert vorliegende Bindungsproteine freigesetzt, darunter D-Zykline, die ABL-Kinase und der Transkriptionsfaktor E2F1. Dieser bildet in freier Form ein Heterodimer mit dem



Seine Wirkung als Tumorsuppressorprotein scheint daher in einer Proliferationshemmung und Differenzierungsförderung zu bestehen [13].

- **NF-1 und NF-2**

Das NF-1 Gen ist auf dem Chromosom 17q11 lokalisiert und kodiert für ein großes, ubiquitär exprimiertes Protein mit der Bezeichnung Neurofibromin. Seine biochemische Funktion entspricht der des Gap-Genproduktes. Es stimuliert die GTPase-Aktivität des RAS-Proteins und die Hydrolyse von GTP zu GDP. Ein Ausfall des Neurofibromins resultiert in einer konstitutionellen Aktivierung des RAS-Proteins, welches mitogene Signale weiterleitet. So werden in Patienten mit Neurofibromatose Typ 1, aber auch in spontanen menschlichen Tumoren, Mutationen im NF-1 Gen gefunden, die dann mit einer Abnahme der GTPase-Aktivität verbunden sind [14].

Das NF-2 Gen ist auf dem Chromosom 22q12 lokalisiert und kodiert für ein Protein an der Schnittstelle zwischen Zellmembran und Zytoskelett. Seine genaue biochemische Funktion ist jedoch noch nicht bekannt.

- **DCC**

Das DCC- („deleted in colon carcinoma“) Gen wurde durch LOH- („loss of heterozygosity“) Studien identifiziert, mit welchen man Deletionen auf dem Chromosom 18q entdeckte. Es kodiert für ein Oberflächenmolekül mit starker Strukturähnlichkeit zu einem Zelloberflächenrezeptor und ähnelt damit den Zelladhäsionsmolekülen N-CAM und ICAM. Seine Aufgabe besteht in der Signalüberleitung aus der Zellumgebung in das Zellinnere. Der extrazelluläre Anteil des Proteins erkennt und bindet einen bisher nicht genau bekannten Bestandteil der extrazellulären Matrix. Der Kontakt mit diesem Baustein der Matrix ist das entsprechende Signal, welches einer Kolonzelle vorgibt, die Vermehrung einzustellen. Das DCC-Gen wird daher in normalen Mukosazellen des Kolons nachweisbar exprimiert, jedoch ist seine Expression in der Mehrzahl der Kolonkarzinome reduziert oder aufgehoben [15].

- APC

Eine der am besten bekannten hereditären Prädispositionen zur Entwicklung von malignen Neoplasien ist die Adenomatöse Polyposis Coli (APC). Personen mit einem heterozygot veränderten APC-Gen auf dem Chromosom 5q21 entwickeln zunächst Adenome und in der Folge Karzinome des Dickdarms. Die Manifestation erfolgt dabei meist in der 2. - 3. Lebensdekade. Veränderungen des APC-Gens finden sich jedoch auch in sporadischen Neoplasien des Kolons. Das Protein selbst ist im Zytoplasma lokalisiert und interagiert wahrscheinlich mit den Produkten anderer Onkogene [16].

### 3. Das p53-Gen

Veränderungen des p53-Gens gehören zu den häufigsten genetischen Aberrationen in menschlichen Krebszellen. Insgesamt beinhalten ungefähr 55 % aller Krebsarten Mutationen in beiden Allelen des Gens [17]. Es wurde erstmals 1979 in SV 40 („simian virus“) transformierten Zellen als ein 54 Kilodalton (kD) schweres zelluläres Protein beschrieben, welches in der Lage ist, einen stabilen Komplex mit dem „large T“- Antigen des SV 40 einzugehen [18]. In der Folge fand man erhöhte p53-Konzentrationen in vielen transformierten Zelllinien, so auch in Zellen von menschlichen Tumoren unterschiedlichen Typs.

#### 3.1. p53-Genstruktur

Das p53-Gen, welches aus vielen verschiedenen Spezies isoliert werden konnte, darunter Xenopus, Huhn, Regenbogenforelle, Affe, Ratte und Maus, weist eine hochkonservierte Struktur auf. Bemerkenswerte Ähnlichkeiten bestehen zwischen dem humanen und dem murinen Gen. Im menschlichen Genom nimmt das Gen eine 20 Kilobasen (kb) große Region auf dem Chromosom 17p13.1 ein. Es besteht aus 11 Exons, welche durch 10 Introns separiert werden. Ungewöhnlich ist die Größe des ersten Introns, das eine Länge von 10kb einnimmt [19]. Ebenfalls von bemerkenswerter Größe ist das menschliche Intron 9. Mit einer Länge von 2,5kb ist es ungefähr drei Mal so groß wie sein murines Äquivalent [20]. Die humanen Exons variieren in ihrer Länge zwischen 22 und 1268 bp. In jeder bisher untersuchten Spezies beinhaltet jedoch das erste Exon keine kodierenden Sequenzen und wird demnach auch nicht translatiert. Jedoch lassen sich dyadische Symmetrien in der Basenabfolge feststellen. S1-Nuklease Analysen korrespondierender Maus mRNA legen den Schluß nahe, daß sich der Transkriptions-Startpunkt in einem Bereich 5' des dyadischen Elements befindet. Vermutlich bildet sich durch diese Symmetrie in der Basenabfolge in der mRNA eine stabile „hairpin“- Struktur aus [21].

Das menschliche p53-Gen wird durch zwei verschiedene Promoterbereiche kontrolliert [22]. Die stärkeren Regulationssequenzen ( P1 ) liegen innerhalb des ersten Introns, ungefähr 1000bp unterhalb des ersten p53 Exons. Der zweite und etwas schwächere Promoterbereich liegt 100 bis 250 bp oberhalb des nicht kodierenden ersten Exons. Die Struktur dieser beiden Promoter ist ungewöhnlich. Beide enthalten keine der regelmäßig in eukaryontischen Genen gefundenen Basensequenzen, wie die TATA- oder CAAT-box. Auch weisen sie keine GC-reichen

Bereiche auf, wie man sie häufig in „housekeeping“-Genen findet. Jedoch lassen sich durch genauere Analysen Bindungsstellen für das Neurofibromatose 1-Gen (NF 1) und für einen AP-1 („activator protein 1“) ähnlichen, hitzeinduzierbaren Faktor finden. Des Weiteren beinhalten die p53 Promoter eine konservierte Erkennungssequenz für die Gruppe DNA-bindender Proteine, welche eine sog. basische „helix-loop-helix“-Struktur aufweisen. Auch läßt sich in diesem Bereich eine Konsensussequenz für die *myc*/ *myo D* Proteinfamilie finden.

An den Positionen 33 und 44 des ersten Introns liegen zwei Guanidinnukleotide, deren Austausch durch T und C in einer verminderten p53-Expression resultiert. Es scheint daher, daß dieser Bereich eine Enhancer-ähnliche Funktion hat [23].

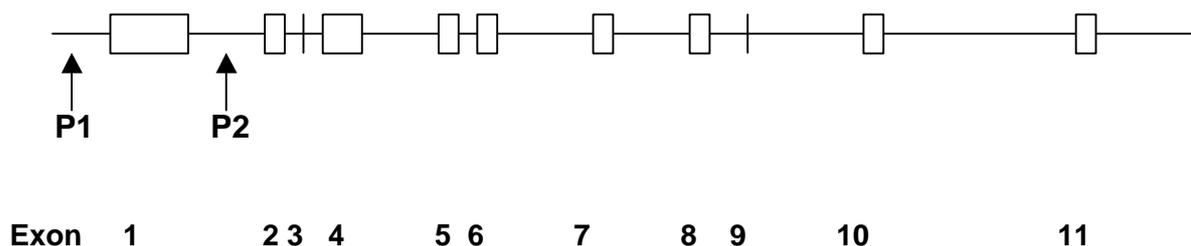


Abb. 1.5: Struktur des p53 Gens

Die mRNA des menschlichen p53 besitzt eine Größe von ungefähr 2,8 kb. Sie wird stabilisiert durch ein A/T-reiches Element (ATTTA), welches durch eine Alu-Sequenz am 3' -Ende des p53-Gens kodiert wird [24].

### 3.2. p53-Proteinstruktur

p53 ist ein im Zellkern lokalisiertes Phosphoprotein, das aus 393 Aminosäuren besteht. Es weist multiple Serin-Reste auf. Im N-terminalen Bereich werden diese durch das Enzym Kaseinkinase I, im C-terminalen Abschnitt je ein Ser-Rest durch die Kaseinkinase II an Position 392 bzw. durch die cdc2-Kinase an Position 315, phosphoryliert [25]. Der Phosphorylierungsstatus des p53-Proteins variiert in Übereinstimmung mit seiner Lokalisation im Zellkern und der Funktion der cdc2-Kinase als Zellzyklusprotein in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus. So

erreicht die cdc2-vermittelte Phosphorylierung ihren Höhepunkt während der Mitose [26].

Wenn man die Gen- bzw. Proteinstruktur aller bisher untersuchten Arten vergleicht, findet man in der Basen- bzw. Aminosäuresequenz des p53-Proteins fünf, im Verlauf der Evolution hochkonservierte Abschnitte, die Domänen I bis V [27]. Sie beinhalten zwei Strecken von 17 (Domäne V) bzw. 23 (Domäne IV) Aminosäuren mit annähernd 100% Übereinstimmung, während die die Domänen flankierenden oder verbindenden Sequenzen eine wesentlich höhere Divergenz aufweisen. Interessanterweise sind die Domänen I, III, IV und V jeweils in den Exon 2, 5, 7 bzw. 8 enthalten. Lediglich für die Domäne II ist die Situation etwas unterschiedlich, da sie durch die Exons 4 und 5 spezifiziert ist. Strukturell liegen die Domänen II bis V in der spezifischen DNA-Bindungsdomäne des Proteins. Hier findet sich auch die überwiegende Anzahl der beim Menschen gefundenen Mutationen. Die Domäne V bindet dabei an die große Furche („major groove“) der DNA.

Funktionell lassen sich im p53-Protein drei verschiedene Abschnitte unterscheiden. N-terminal liegt die durch eine große Dichte saurer Aminosäuren gekennzeichnete transaktivierende Domäne, welche mit den Proteinen des Transkriptionsapparates interagiert [28]. Der Bereich umfaßt die Aminosäuren 1 bis 80 und stellt zudem die Bindungsstelle des adenoviralen E1B-Proteins und des mdm2-Proteins dar. Der mittlere Teil des Proteins enthält zahlreiche Prolin-Reste und ist demnach stark hydrophober Natur. Er beinhaltet die spezifische DNA-Bindungsdomäne. Außerdem bindet in diesem Bereich das große T-Antigen des SV 40 Virus.

C-terminal liegt ein stark basischer Abschnitt. Dieser Bereich umfaßt die Aminosäuren 319 bis 393 und vermittelt über die darin enthaltenen Aminosäuren 320 bis 360 die Oligomerisierung einzelner p53-Proteine. Über die Aminosäuren 330 bis 393 bindet das Protein unspezifisch an DNA-Enden, wodurch seine Fähigkeit zur Erkennung von Einzelstrangbrüchen begründet sein könnte [30]. Außerdem liegt zwischen den Aminosäuren 319 und 323 die bedeutendste Signalsequenz (NLS I, „nuclear localization signal“) zur Lokalisation des Proteins im Zellkern. Die beiden anderen bisher identifizierten nukleären Signalsequenzen (NLS II und III) gruppieren sich ebenfalls im Bereich des C-Terminus des p53-Proteins. Mutationen im C-terminalen Abschnitt (z.B. Substitution von Arginin durch Glutamin an Aminosäure 306) verhindern den Transport von p53 vom Ort seiner Synthese, dem Zytoplasma, zum Ort seiner funktionellen Aktivität, dem Zellkern. Das E6-Protein der onkogenen humanen Papillomviren, Typ 16 und 18, bindet an den C-terminalen Abschnitt von p53. Die Abbildung I.6 skizziert die Struktur des p53 Proteins.

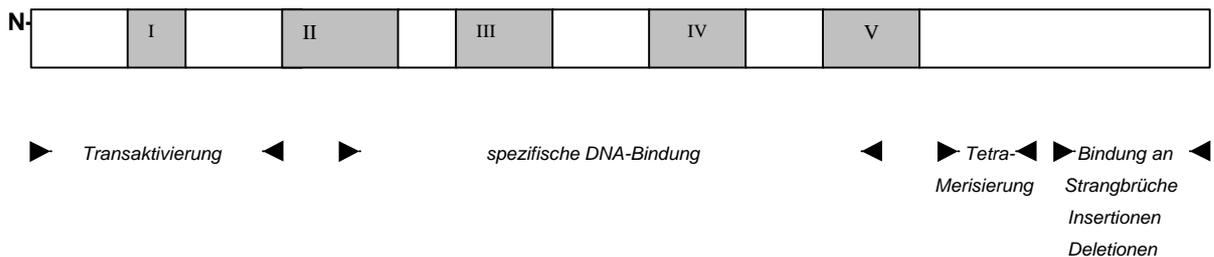


Abb. I.6 : Struktur des p53-Proteins

Innerhalb des p53-Proteins liegen zwei Protease-resistente Bereiche, ungefähr zwischen den Aminosäuren 100 und 290 bzw. 330 und 360. Hingegen sind der N-Terminus und Teile des C-Terminus sensitiver gegenüber enzymatischem Angriff. Dies geht einher mit der Beobachtung, daß die meisten anti-p53-Antikörper mit Epitopen innerhalb der N- und C-Termini reagieren. Das Zentrum des Proteins ist demnach kompakt gefaltet und äußeren Einflüssen gegenüber relativ unzugänglich.

Durch röntgenologische Untersuchungen konnte die genaue Tertiärstruktur kürzlich beschrieben werden. So weist die oligomere C-terminale Domäne des Proteins einen „turn“ (Aminosäuren 324-326), ein  $\beta$ -Faltblatt (Aminosäuren 326-334), einen zweiten „turn“ (Aminosäuren 335-336) und eine  $\alpha$ -Helix (Aminosäuren 337-355) auf [19]. Zwei monomere p53 Proteine interagieren über diese Strukturelemente und bilden Dimere. Zwei solcher Dimere wiederum bilden ein Bündel aus vier Helices und eine tetramere Form des Proteins. Die Transaktivierungsdomäne besteht aus einem „ $\beta$ -sandwich“, welches zwei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter beinhaltet. Dies dient als Gerüst für die strukturellen Elemente an der Protein-DNA-Schnittstelle. Es sind dies zum einen ein „loop-sheet-helix“-Motiv (LSH), das an die große Furche der DNA bindet und im Kontakt des p53 mit den Basen der DNA involviert ist. Zum anderen sind dies zwei große „loops“ (L2 und L3), welche so interagieren, daß der Aminosäure-Rest 248, der sich in L3 befindet, mit einer A/T-reichen Sequenz in der kleinen Furche der DNA einen Kontakt eingeht. Sie werden stabilisiert durch zwei Zinkatome, welche mit je zwei Aminosäureresten von L2 bzw. L3 verbunden sind. Auf diese Weise verwoben, beeinflußt praktisch alles, was L2 oder L3 verändert, die Interaktion von R248 mit der DNA. Die dreidimensionale Struktur des Proteins ist in Abb. I.7 sichtbar.

### 3.3. Biochemische Wirkung des p53-Proteins

Werden Zellen einer Bestrahlung durch UV-Licht oder ionisierenden Strahlen ausgesetzt, oder behandelt man sie mit DNA-schädigenden Substanzen wie Actinomycin D, so beobachtet man in der Folge eine zelluläre Akkumulation von p53. Dies ist die Folge eines posttranslatorischen Stabilisierungsmechanismus, der bereits 1984 von Maltzman und Czyzyk beschrieben wurde [30]. Die Akkumulation von p53 geht in der Regel mit einem G1-Wachstumsstop einher. Dieses wurde bestätigt in einem Versuch, in dem p53-positive und p53-negative Fibroblasten in einer Zellkultur mit dem Uridin-Biosynthese-Hemmstoff N-(Phosphonoacetyl)-L-Aspartat (PALA) behandelt wurden. Die Substanz bewirkt eine Verminderung der intrazellulären Konzentrationen von Uridin-, Cytidin- und Thymidinphosphaten. Normale, nicht jedoch p53-defiziente Zellen, antworten auf PALA-Behandlung mit einem Stop in der G1-Phase. In den p53-defizienten Zellen beobachtet man in der Folge die Entwicklung einer ausgeprägten Aneuploidie. Aus diesen Experimenten läßt sich vermuten, daß die Hochregulation von p53 und die konsekutive Pause in der G1-Phase zur Reparatur von DNA-Defekten genutzt wird [31].

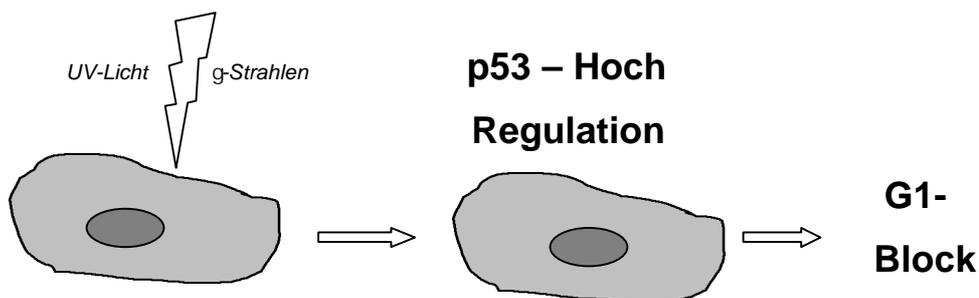


Abb.1.8 : p53-Konzentrationsanstieg

Ein anderes Schlüsselexperiment weist auf die Funktion von p53 als Apoptosevermittler hin [32]. Hierbei wird eine p53-defiziente murine Leukämie-Zelllinie mit einer temperatursensitiven p53 Mutante infiziert. Bei Temperaturen, in denen p53 in mutanter Form vorliegt, proliferieren die Zellen. Wird jedoch die Temperatur gesenkt, so daß p53 in die Wildtyp-Konformation übergeht, so folgt ein massiver Zelluntergang im Sinne einer Apoptose.

Dieser Befund, daß p53 unter bestimmten Bedingungen den selbstinduzierten Zelluntergang vermittelt, wurde durch weitere Erkenntnisse untermauert. So werden im Verlauf der embryonalen T-Zell-Entwicklung im Thymus fehlgeprägte autoreaktive Lymphozyten durch Apoptose eliminiert. Dies kann imitiert werden, indem Thymozyten ionisierenden Strahlen ausgesetzt oder sie mit Glucokortikoiden behandelt werden oder in dem man eine Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors auslöst. In p53-defizienten Thymozyten jedoch findet auf keinen dieser Reize hin eine Apoptose statt. Übrigens ist auch die nach einem Sonnenbrand auftretende Abstoßung der Haut Folge einer p53-vermittelten Apoptose.

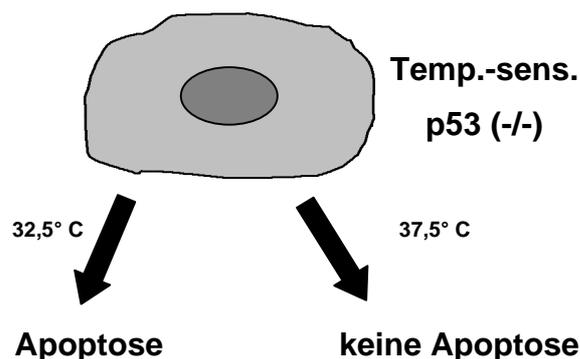


Abb. I.9 : p53 vermittelte Apoptose

Die zu beobachtende p53-vermittelte Apoptose ist hierbei jedoch nicht die Folge einer gesteigerten mRNA- oder Proteinbiosynthese. P53 scheint in diesem Zusammenhang eher entweder in der Lage zu sein, Gene zu unterdrücken, welche notwendig für das Überleben der Zellen sind, oder aber das p53 Protein ist ein Instrument im enzymatischen Abbau der DNA, der im Rahmen der Apoptose beobachtet wird.

Erst kürzlich wurde bekannt, daß der Promoter des bax-Gens vier Motive mit Homologie zur p53 Konsensussequenz besitzt. In einer Transfektionsuntersuchung mit p53-defizienten Tumorzellen konnte gezeigt werden, daß Wildtyp p53-Plasmide die Expression des bax-Gens transaktivieren können. Mutante p53-Plasmide waren

dazu jedoch nicht in der Lage. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß das bax-Gen an einem p53-regulierten Apoptoseweg beteiligt ist [33].

### **p53 als Transkriptionsfaktor**

Wie oben bereits erwähnt, besitzt p53 eine N-terminale Transaktivierungsdomäne und eine zentrale spezifische DNA-Bindungsdomäne. Somit erfüllt p53 die funktionellen und strukturellen Kriterien eines Transkriptionsfaktors. Mit Hilfe von Bindungsanalysen wurde als Konsensus-Sequenz für die spezifische DNA-Bindung das Palindrom 5' PuPuPuC (A/T)(T/A)GPyPy 3' identifiziert. Mit ihrem C-terminalen Bereich (Aminosäuren 320 - 360) lagern sich monomere p53 Proteine zu Tetrameren zusammen. Die spezifische DNA-Bindung erfolgt dann über die Aminosäuren 1-80 am N-Terminus. Dabei binden die p53 Oligomere nur dann an die Konsensussequenz, wenn die C-terminalen Serin-Reste phosphoryliert sind. Die Phosphorylierung scheint daher die inaktiven Tetramere durch eine Konformationsänderung in die transkriptionell aktive Form zu überführen [34].

Verschiedene Gene sind bisher identifiziert worden, deren Promoter eine solche spezifische Bindungssequenz aufweist. Jeder dieser Promoter besitzt eine TATA-box und eine 20kb Sequenz mit starker Homologie zur p53 Konsensus-Sequenz. Es sind aber vor allem vier, die bisher näher untersucht und für das Verständnis der p53 Funktionen von besonderer Bedeutung sind:

- das p21 Protein

Das p21-Protein wurde zeitgleich von verschiedenen Wissenschaftlern entdeckt und je nach Funktion und experimentellem Zusammenhang mit unterschiedlichen Abkürzungen versehen (WAF1, CIP1, SDI1) [35]. In der Literatur hat sich jedoch mit „p21“ die Bezeichnung nach der relativen Molmasse durchgesetzt. Es ist auf dem Chromosom 6p21.2 lokalisiert. Sein Promoter ist GC-reich und besitzt eine TATA-box 43bp oberhalb der Transkriptionsstartstelle. Das p53 Konsensuselement konnte 2.4kb oberhalb von p21 identifiziert werden.

In normalen Zellen liegt p21 in einem Komplex vor, der neben Cyclin und CDK das sog. PCNA („proliferating cell nuclear antigen“), einer Untereinheit der Polymerase  $\delta$ , enthält. Die Konzentration von p21 steigt unmittelbar in Folge eines p53

Konzentrationsanstiegs an, z.B. nach Behandlung mit ionisierender Strahlung. Es konnte gezeigt werden, daß p21 an die Zellzyklusproteine cdk-2 und cdk-4 bindet und diese blockieren kann. Hierzu ist die Bindung mehrerer p21 Proteine an Cyklin-cdk-Komplexe notwendig. Seine physiologische Aktivität entfaltet das Protein in vivo allerdings nur in der G1-Phase [35].

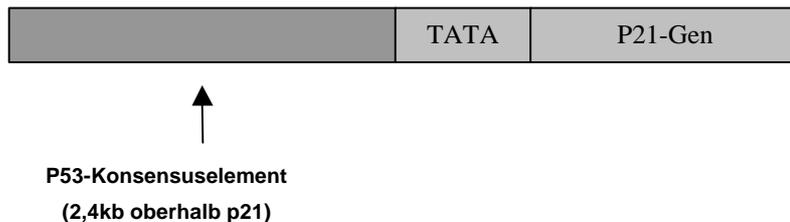


Abb. I.10 : p21-Gen und Promoter, Enhancer

- das GADD45 Protein

Ein zweites Protein, dessen Transkription durch p53 gesteigert wird, ist das sog. GADD45 Protein („growth arrest and damage dependend“). Die Bezeichnung beruht darauf, daß sich die Konzentration des Proteins nach Bestrahlung und in Verbindung mit einem Wachstumsstopp erhöht. Dies geschieht als Folge einer vorangehenden p53 Akkumulation. GADD45 besitzt in seinem dritten Intron ein p53 Bindungsmotiv. Es ist darüber hinaus mit Komponenten des DNA-Nukleotid-Exzisions-Systems assoziiert [36].

- das mdm-2 Protein

MDM-2 („murine double minute chromosome 2“) wurde ursprünglich als amplifiziertes Gen auf einem „double minute chromosome“ in einer spontan transformierten murinen BALB/c 3T3-Zelllinie entdeckt. Beim Menschen findet man amplifizierte mdm-2 Gene in etwa einem Drittel aller Weichteil-Sarkome und in Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen [37].

Das Produkt des mdm-2 Gens ist ein 90.000 D schweres Phosphoprotein.

Es bindet an den N-terminalen Bereich des p53 Proteins, zwischen den Aminosäuren 1 und 80, also an einen mit der Transaktivierungsdomäne des p53

überlappenden Abschnitts. Im Komplex mit mdm-2 ist p53 nicht mehr in der Lage, an p53-DNA-Bindungsmotive zu binden. MDM-2 hemmt also die transaktivierende Aktivität von p53 .

Außer mit p53 assoziiert mdm-2 mit einem der p53 Bindungsdomäne homologen Motive des Transkriptionsfaktors E2F1. Zusätzlich bindet das Protein an DP1, den Dimerisierungspartner von E2F1. Im Gegensatz zu p53, welches von mdm-2 negativ reguliert wird, stimuliert mdm-2 in diesem Fall die Transaktivierungsaktivität des Transkriptionsfaktordimers E2F1/DP1.

Im ersten Intron des mdm-2 Gens befindet sich ein p53-Bindungselement. Die Konzentration von mdm-2 kann also durch p53 vermittelte Geninduktion erhöht werden. Dies wird verständlich im Sinne eines autoregulativen, negativen Rückkopplungsmechanismus. Eine exogen ausgelöste p53 Akkumulation wird gefolgt von einer Erhöhung der mdm-2 Konzentration, was dann wiederum die verstärkte p53 Wirkung in der Zelle neutralisiert [37].

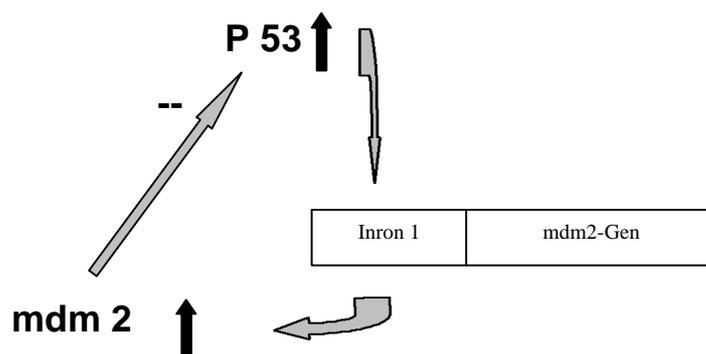


Abb. I.11 : mdm2 und p53

- das bax-Protein

Das bereits mehrfach erwähnte bax-Protein ist Mitglied einer Familie homologer Proteine, deren Funktion in der Regulation der Apoptose besteht. Das Produkt des bax-Gens lagert sich mit dem bcl-2-Protein in heterodimerer Form zusammen und blockiert dadurch dessen Wirkung als Hemmer der Apoptose [33].

Das humane bax-Gen weist in seinem Promoter an der Position -486 bis -448 eine exakte und drei ungefähre p53 Konsensus-Sequenzen auf.

Experimentell konnte gezeigt werden, daß p53 an dieses Element bindet. Hierdurch kann p53 die Expression des bax-Gens steigern. Dieser Anstieg wird begleitet von

einer Abnahme der „steady-state“-Konzentration von bcl-2- mRNA und Protein. Eine solche Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen bax und bcl-2 resultiert aus einem Überwiegen der bax-gesteuerten Wirkungen auf die Zelle [33].

Andere Genpromoter, mit denen p53 nachweislich interagiert, sind das Retinoblastomgen, dessen Transkription durch p53 gesteigert werden kann. In Kooperation mit dem wt-1 Transkriptionsfaktor kann p53 einen transkriptionsinduzierenden Effekt auch auf den Promoter des Muskelkreatinkinasegens ausüben.

Auf der anderen Seite kann p53 bestimmte Genpromoter negativ regulieren. So wird z.B. die Expression von Interleukin 6, *c-fos*, *c-jun*, multidrug resistance gene, P-Glykoprotein,  $\beta$ -Aktin-Gen und des bcl-2 Gens von p53 supprimiert [38,39]. Häufig jedoch findet man in Promotern solcher Gene, die von p53 negativ moduliert werden, keine DNA-Bindungsstellen für p53. Die Hemmung der Transkription wird eher auf die Interaktion von p53 mit Proteinen zurückgeführt, die an der TATA-Box binden. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß p53 mit TBP („TATA-box binding protein“), einem Element des TFIID-Komplexes, in Verbindung treten kann. Auf diese Weise könnte p53 direkt auf die Transkription von bestimmten Genen Einfluß nehmen [40].

Ein weiteres Protein, welches in funktioneller Beziehung zu p53 steht, ist der DNA-bindende Proteinkomplex RPA. RPA ist der erste Faktor, der zu Beginn der DNA-Replikation an diese bindet und zu ihrer Entwindung führt. P53 besitzt zwei Bereiche, einen N-terminal und einen C-terminal gelegen, die eine Bindung mit RPA eingehen können. Auch kann p53 an die „nuclear matrix attachment region“ (MAR) der DNA binden. Die MAR-DNA spielt eine Rolle in der Organisation der Transkription von Genen und in der DNA-Replikation. MAR-DNA Elemente befestigen DNA-Schleifen an der nukleären Matrix, wo Transkription und Replikation initiiert werden [41].

Die Abb. I.12 faßt die Ereignisse zusammen, die in funktionellem Zusammenhang mit p53 stehen.

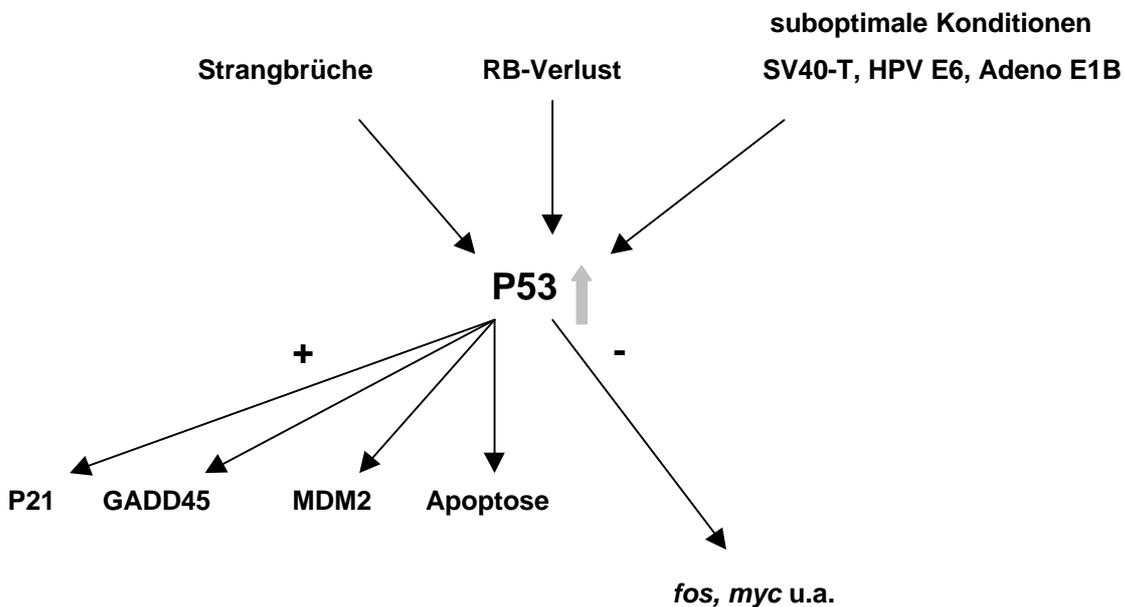


Abb. I.12 Ereignisse in funktionellem Zusammenhang mit p53

### Zusammenfassung der p53 Funktionen

Das adäquate Signal, welches in der Zelle die Heraufregulation von p53 induziert, ist die Anwesenheit von DNA-Strangbrüchen. Diese bewirken nach kurzer Latenz die rasche Erhöhung des intrazellulären p53-Gehalts.

Je nach Zellart führt die Akkumulation von p53 zu einem Zellzyklusstop in der G1-Phase („G1-Arrest“) mit anschließender Reparatur der DNA oder zur Apoptose der Zelle.

Die G1-Stop kann dabei über p21 durch Inhibition der zur weiteren Progression des Zellzyklus notwendigen Cyklin-CDK-Kinase erfolgen. Auch die Hemmung der proliferationsfördernden Gene *c-myc* und *c-fos* kann bei der negativen Wachstumsregulation eine Rolle spielen. Die Assoziation mit mdm-2 beendet zum einen die Wirkung von p53 und erlaubt der Zelle nach erfolgter DNA-Reparatur in ihr normales Zellzyklusgeschehen zurückzukehren. Zum anderen wird mdm-2 durch Komplexbildung mit p53 dem Transkriptionsfaktor E2F1/DP1 entzogen, wodurch deren Stimulierung entfällt. Ihre proliferationsfördernden Zielgene (*c-myc*,

DNA-Polymerase  $\alpha$ , CDC2, Dihydrofolat-Reduktase u.a.) werden konsekutiv in vermindertem Maße exprimiert.

Über die Induktion von GADD45 kann p53 die DNA-Reparatur indirekt beeinflussen.

Die Inangsetzung der Apoptose infolge einer p53 Akkumulation scheint ein vom G1-Stop separater Prozess zu sein. Auf welche Weise und unter welchen Konditionen er abläuft, ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. Eine Rolle scheint die Beeinflussung des Gleichgewichtes zwischen bax und bcl-2 zu spielen. Möglicherweise ist p53 aber auch direkt am Prozeß der DNA-Degradation beteiligt.

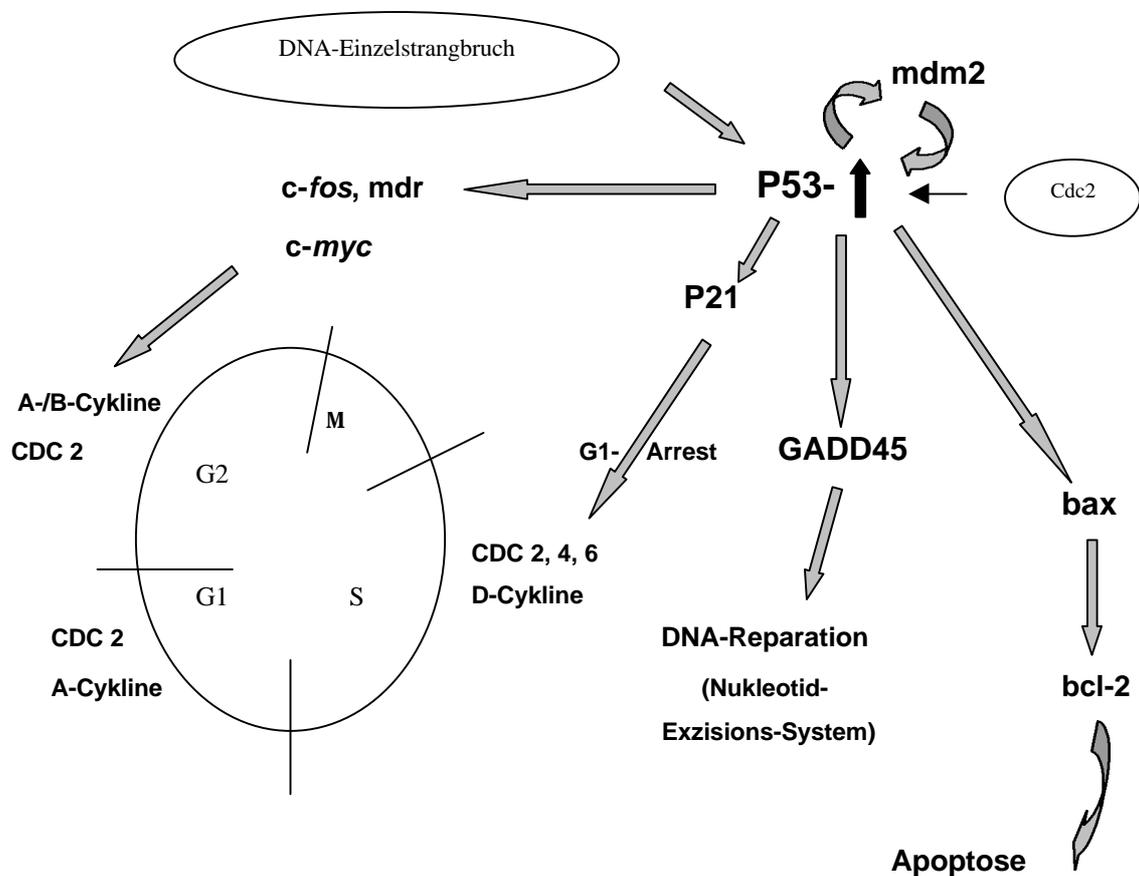


Abb. I.13 p53 Signalwege

### 3.4. Regulation und Modulation der p53 Funktion

Wie oben erläutert, fungiert p53 als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression anderer Gene. Jedoch kann auch p53 in verschiedener Weise in seiner Funktion beeinflusst werden.

- Regulation durch Proteininteraktion

Einen ersten Hinweis darauf, daß die DNA-Bindungs- und Transaktivierungsfunktion von p53 durch Proteininteraktion reguliert werden könnte, erhielt man durch die Feststellung, daß das große T-Antigen des SV 40 an p53 bindet und dadurch seine biochemischen Funktionen beeinträchtigt [42]. Das T-Antigen bindet an zwei unabhängige Regionen des p53-Proteins, zwischen den Aminosäuren 123 und 215 bzw. 236 und 289, und geht auf diese Weise einen Komplex mit dem Protein ein. Die funktionelle Folge dieser Komplexbildung ist der Verlust der DNA-Bindungsaktivität von p53 und folglich seiner Transaktivierungsfähigkeit. Interessanterweise jedoch sind viele mutante p53 Formen nicht in der Lage, mit dem T-Antigen eine Bindung einzugehen.

Auch andere Tumovirusproteine sind in der Lage p53 zu beeinflussen. So bindet das Protein E1B des Adenovirus Typ 2 und 5 an einen Bereich zwischen den Aminosäuren 14 und 66 des p53 Proteins [43]. Dadurch wird p53 zwar stabilisiert, jedoch scheint das angelagerte Virusprotein mit anderen Proteinen des transkriptionellen Initiationskomplexes sterisch zu interferieren und so die Transaktivierungsfunktion von p53 zu supprimieren.

Im Gegensatz zu dem adenoviralen Protein resultiert die Bindung des E6-Proteins des Humanen Papillomvirus Typ 16 und 18 an p53 in einem proteolytischen Abbau des Tumorsuppressorgens durch eine Ubiquitin-abhängige, proteolytische Fermentierung. Dieser Mechanismus steht im Einklang mit der Beobachtung, daß zervikale HPV-positive Krebszellen in der Regel den p53 Wildtyp exprimieren [44].

Erst seit kurzer Zeit ist die Fähigkeit des „nuclear antigen 5“ des Epstein-Barr Virus bekannt, einen Komplex mit p53 zu formieren und es funktionell zu inaktivieren [45].

Ein konstitutiv exprimiertes Mitglied der „heat shock“ Protein Familie, das hsc 70 Protein, bindet an bestimmte mutante Formen von p53, jedoch nicht an p53 Wildtypen. Es konnte in diesem Zusammenhang eine Korrelation zwischen dem

transformierenden Potential der jeweiligen p53 Mutante und ihrer Bindungsfähigkeit an hsc 70 bestimmt werden. So zeigen die mutanten Formen p53val135 und p53phe132, welche eine stabile Bindung mit hsc 70 eingehen, eine signifikant höhere Aktivität, Nagerzellen in Kooperation mit dem Harvey-*ras* Onkogen zu transformieren, als die mutante Form p53cys270, welche eine stark verminderte Bindungsfähigkeit mit hsc 70 aufweist [46].

Ein anderes Protein, welches im physiologischen Zellzyklusgeschehen an p53 bindet und seine Transaktivierungsfunktion außer Kraft setzt, wurde bereits im Rahmen der biochemischen Wirkungen von p53 erwähnt. Das mdm2 Protein bindet p53 im Bereich der N-terminalen Transaktivierungsdomäne [47]. Ebenso das TATA-bindende Protein TBP, welches nach Bindung an die TATA-box die Transkription von Genen initiieren kann. Die Fähigkeit von Wildtyp -, nicht jedoch von mutantern p53, TBP zu binden, ist in Beziehung gesetzt worden mit der Beobachtung, daß p53 verschiedene Promoter negativ regulieren kann, ohne daß diese eine p53 Bindungssequenz aufweisen [48].

Auch das p53 Protein wird in seiner Funktion negativ von anderen Transkriptionsfaktoren beeinflusst. So vermittelt der CAAT-Bindungsfaktor (CBF) die Bindung von Wildtyp p53 an den hsp 70 Promoter [49]. Darüber hinaus scheint der Sp1 Transkriptionsfaktor auf eine bisher nicht näher bekannte Weise Einfluß auf die Aktivität von p53 zu nehmen [48]. Der Wilms Tumor Transkriptionsfaktor (wt1) assoziiert mit p53 und übt einen kooperativen Effekt auf die Fähigkeit von p53 aus, den Muskelkreatinkinase Promoter zu transaktivieren. Auf der anderen Seite ist wt1 ein potenter Aktivator des „early growth response gene 1“. In Anwesenheit von p53 jedoch wird diese Funktion durch die Bindung an p53 aufgehoben, und der Proteinkomplex fungiert nun als ein Repressor desselben Gens [50].

- Regulation durch Phosphorylierung

Eine Rolle in der Modulation von p53 durch Phosphorylierung läßt sich durch die Erkenntnis erahnen, daß das Protein verschiedene Phosphorylierungsstellen aufweist. Im C-terminalen Bereich sind dies die Aminosäuren 315 bzw. 392 als Substrate der cdc2-Kinase bzw. der Kaseinkinase II. Im Bakterienmodell zeigt sich für die unphosphorylierte Form des p53 eine nur schwache DNA-Bindungsaktivität [51]. Nach Phosphorylierung durch die Kaseinkinase II jedoch steigt die DNA-Bindungsfähigkeit des Proteins stark an. Auch im Mausmodell läßt sich der Einfluß

des Phosphorylierungsstatus des p53 Proteins auf seine Aktivität experimentell belegen [52].

Durch Veränderung der murinen Phosphorylierungsstelle 389 erlischt die antiproliferative Aktivität des Proteins.

Die C-terminale Phosphorylierung moduliert die Konformation der 100 C-terminal gelegenen Aminosäuren. Dies verursacht dann Veränderungen in der Tertiärstruktur des gesamten Proteins einschließlich der N-terminal gelegenen spezifischen DNA-Bindungsdomäne, was wiederum in einer verminderten oder aufgehobenen Transaktivierungsfähigkeit mündet [53].

Aber auch direkt am N-Terminus des Proteins können Phosphorylierungen seine Funktion regulieren. So sind die Aminosäuren 15 und 37 des humanen p53 potentielle Phosphorylierungsstellen der Kaseinkinase I.

Im Mausmodell vermindert sich die Fähigkeit von p53ala15-Mutanten, die Zellzyklusprogression in der G1-Phase zu blockieren [54].

Des Weiteren attenuiert die Substanz „okadaic acid“ die transkriptionelle Aktivität von p53 durch Hyperphosphorylierung [55].

Veränderungen im Phosphorylierungsstatus des p53-Proteins führen auch zu immunhistochemisch nachweisbaren Veränderungen der p53 Proteinkonformation. So konnte gezeigt werden, daß der p53-Antikörper PAb421 unterschiedliche Affinitäten zu seiner spezifischen Bindungsstelle auf dem Protein in Abhängigkeit vom Phosphatgruppengehalt aufweist [55].

- Regulation durch RedOx-Mechanismen

Die p53 Tertiärstruktur wird durch zwei Zinkschleifen innerhalb der konformationellen Domäne des Proteins stabilisiert. Die Zinkionen stehen dabei in Kontakt mit Zysteinresten der Schleifen L2 und L3 [19].

Der Oxidationsstatus der Zysteinreste kann sich verändern und infolge dessen die Konformation des Proteins beeinflussen. In stark oxidiertem Form verhindern die Zysteinreste die DNA-Bindung von Wildtyp p53. Auch 1,10-Phenanthrolin, ein Zink-Chelator, führt nachweislich zu einer Veränderung in der räumlichen Struktur von p53 [56].

- Regulation durch Konzentrationsänderung

Ein bekanntes Beispiel zur Verdeutlichung der Beziehung zwischen der intranukleären Konzentration eines Proteins und seiner Aktivität ist das des

Transkriptionsfaktors *c-myc*. Die DNA-Bindungsfähigkeit von *c-myc* besteht nur in Form eines Heterodimers mit dem Protein Max. Die Dimerisierung erfolgt über ein carboxyterminales basisches „helix-loop-helix-leucin-zipper“-Motiv im *c-myc*-Protein. In heterodimerer Form kann der aminoternale Teil des *c-myc* dann seine transaktivierende Funktion ausüben. Diese aktiven *myc/max*-Komplexe konkurrieren konzentrationsabhängig mit den inaktiven *max*-Monomeren um die DNA-Bindungsstellen. Je höher die intranukleäre Konzentration von *c-myc* ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Dimerisierung mit *max*.

Monomere p53 Proteine sind zwar in der Lage, eine wachstumsinhibierende Wirkung auszuüben, jedoch können sie keine Bindung mit spezifischen p53 Konsensussequenzen eingehen. Lediglich p53-Dimere und Tetramere besitzen diese Fähigkeit [57]. Eine Erhöhung der Konzentration von intranukleärem p53, wie man sie z.B. nach Bestrahlung von Zellen findet, unterstützt die Formation von p53 Oligomeren und damit die Induktionsfähigkeit von p53 abhängigen Faktoren. Diese Erkenntnisse werden unterstützt durch die Überlegung, daß die intrazelluläre p53 Konzentration über die Bindungsfähigkeit an bestimmte, spezifische DNA-Sequenzen in den Promoterbereichen von Genen die Expression von p53 induzierten Faktoren moduliert.

- Regulation über gesamtzelluläre Verteilung von p53

Die zelluläre Lokalisation des p53 ist abhängig von den die Zelle umgebenden Wachstumsbedingungen und unterscheidet sich in verschiedenen Zelltypen und Geweben. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, daß sich p53 in einem Typ transformierter Zellen vorwiegend im zentralen Bereich des Zellkerns aufhält, während es in nichttransformierten Zellen der gleichen Herkunft in überwiegender Maße die Zellkernperipherie säumt [58]. Auch zeigen serumstimulierte, normale Zellen eine nukleäre Konzentrierung von p53, während das Protein in ruhenden Zellen überwiegend perinukleär zu finden ist. Diese Befunde sind jedoch unstetig, da z.B. die Serumstimulation bei MCF-7 Brustkrebszellen eine Translokation der p53 Proteine vom Zellkern in das Zytoplasma bewirkt [58]. In wachstumsstimulierten BALB/c 3T3 Zellen akkumuliert p53 während der G1-Phase und wandert zum Beginn der S-Phase in den Zellkern [59]. Zahlreiche andere Untersuchungen beschreiben die Lokalisation von p53. Die Vielzahl der Befunde ist weiter erklärungsbedürftig, jedoch läßt die heterogene Verteilung und intrazelluläre Kompartimentierung von p53 vermuten, daß das tumorigene Potential des Proteins von zytoplasmatischer und nukleärer Lokalisation aus vermittelt werden kann.

- Zell- und gewebespezifische Regulation von p53

Regulationsfaktoren verschiedener Art zeigen häufig gewebespezifische Verteilungen. In besonderem Maße variiert die Expression von Transkriptionsfaktoren beträchtlich in Geweben unterschiedlichen Typs. So werden z.B. die Transkriptionsfaktoren *tcf-1* und *ets-1* nur in Lymphozyten exprimiert, *krf-1* ist keratinozytenspezifisch und die Transkriptionsfaktoren *hnf-3*, *c/ebp* und *lfb-1* finden sich nur in Lebergewebe [73].

Für die Existenz von gewebespezifischen, p53 modulierenden Substanzen gibt es bisher nur indirekte Belege. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, daß Gal4-Wildtyp p53 eine dreifach höhere Transaktivierung des CAT Gens in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzellen der Linie H1299 gegenüber der Linie H358 aufweist. Beide Zelllinien besaßen dabei deletierte p53 Gene. Eine andere Studie beschreibt zellspezifische Unterschiede in der Fähigkeit von p53, den MCK Promoter zu modulieren. Während Wildtyp-p53 den MCK Promoter in CV 1 Zellen aktiviert, supprimiert er diesen in HeLa Zellen. Im Gegensatz dazu supprimiert p53 den Interleukin 6 Promoter in beiden Zelllinien [60].

Weiterhin scheinen intrazelluläre Gegebenheiten die Stabilität und die Halbwertszeit von Wildtyp- und mutantern p53 zu regulieren. So konnte eine auf ca. 3 Stunden verlängerte Halbwertszeit des Wildtyp-p53 und die Expression des Epitops PAb 240 in normalen Säugerepithelzellen demonstriert werden. In normalen Säugerfibroblasten hingegen war die Halbwertszeit auf ungefähr 30 Minuten beschränkt [61].

- Regulation durch allosterische Modifikation

Im Vorangehenden sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden, die die Konformation des p53 Proteins zu beeinflussen vermögen.

In verschiedenen Studien ist belegt worden, daß normales p53 in unterschiedlichen Konformationen existiert, abhängig von Wachstumsbedingungen und Zellwachstum [62,63]. In ruhenden murinen Lymphozyten beispielsweise exprimiert das Protein die Epitope für die monoklonalen Antikörper PAb248 und RA3.2C2, wohingegen in wachstumsstimulierten Lymphozyten die Epitope der Antikörper PAb122 und PAb421 nachweisbar sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Wildtyp p53 von einer PAb246-negativen in eine PAb246-positive Form konvertiert. Dies geschieht in 3T3 Zellen innerhalb einer Stunde nach Zugabe von frischem Zellmedium .

Auch konnten unterschiedliche Konformationen von p53 in verschiedenen Differenzierungsstufen von Keratinozyten erfolgreich demonstriert werden. Selbst solche Konformationen, welche sonst nur in mutanten p53 Proteinen bekannt sind, können von normalem p53 eingenommen werden [62].

In diesem Zusammenhang postulierten Milner und Watson, daß eine (normale) konformationelle Form des p53 Proteins die wachstumsinhibierende Funktion ausübt, während eine andere (mutantenähnliche) Form die wachstumsfördernde Aktivität besitzt. Normales p53 oszilliert dynamisch zwischen der wachstumsinhibierenden und der wachstumsfördernden Form. Welche Konstitution eingenommen wird, hängt ab vom Stadium des Zellwachstums [63].

### 3.5. p53 Mutationen

Funktionelle Veränderungen des p53 Gens sind ein universeller Schritt in der Genese von Krebs. Hierzu können eine ganze Reihe von Mechanismen führen. Es gehören dazu neben Deletionen, Insertionen und Rekombinationen v.a. Punktmutationen. Diese treten sowohl als Transitionen als auch in Form von Transversionen auf. Die überwiegende Mehrzahl von „missense“ Mutationen gruppieren sich zwischen den Aminosäuren 107 und 310. Innerhalb dieses Bereiches wiederum finden sich die Veränderungen häufig in vier verschiedenen Regionen, zwischen den Aminosäureresten 117 und 142, 171 und 181, 234 und 258 und 270 und 286. Interessanterweise entsprechen diese Abschnitte exakt den vier am höchsten konservierten Domänen (Domäne II bis V) des p53 und ungefähr den Exons 5-8 [17].

Die vier Regionen beinhalten 86% aller bisher entdeckten Mutationen des p53-Gens.

Im großen Spektrum der p53 Mutanten zeichnet sich die überwiegende Mehrzahl durch eine verlängerte Halbwertszeit aus. Weist Wildtyp p53 in der Regel eine Halbwertszeit von ca. 20 Minuten auf, so kann diese in mutanten Formen auf einige Stunden verlängert sein. Dies ist auch der Grund für die immunhistochemische Nachweisbarkeit von alteriertem p53. Der Grund für die mutationsbedingte Akkumulation ist wahrscheinlich eine durch Konformationsänderungen im mutanten p53 bedingte, verminderte Zugänglichkeit für proteolytische Fermente. Die Phänotypen, die bei mutationsbedingten Veränderungen entstehen, zeichnen sich häufig durch drei distinkte Eigenschaften aus. Zum einen verlieren die meisten

mutanten Formen ihre proliferationsinhibierenden Fähigkeiten. Zum anderen erlangen sowohl menschliche als auch murine p53 Mutanten eine bemerkenswerte Eigenschaft. Viele sind in dieser Form in der Lage, nachdem sie in p53-defiziente Zelle übertragen worden sind, Tumorstadium zu verstärken oder gar zu induzieren. Schließlich konnte man feststellen, daß verschiedene Mutanten die Zelle unterschiedlich transformieren. In den meisten Fällen verhalten sich mutante p53 Proteine in einer sog. dominant-negativen Weise. Dies bedeutet, daß die Veränderung eines Allels ausreicht, um auch die Funktion des Wildtypallels zu hemmen. Der Grund dafür ist in der für die Ausübung der Funktion notwendigen Oligomerisierung des p53 Proteins zu suchen. So scheint das mutante p53 Monomer nach Oligomerisierung mit intakten p53 Proteinen den gesamten tetrameren Komplex in eine unfunktionelle Konformation zu zwingen. Es wurden jedoch auch mutante Formen beobachtet (z.B. p53trp248), welche weit weniger stark in der Lage sind, Wildtyp-p53 in den mutanten Phänotyp zu überführen.

Eine häufige Entdeckung bei p53 mutierten Tumoren ist die sog. „loss of heterozygosity“ (LOH) . In diesen Fällen ist ein p53 Allel deletiert, während auf dem korrespondierenden Chromosom 17p ein kleiner Teil im Bereich des p53 Gens deletiert ist. Einen solchen Befund zeigen beispielsweise ca. 67% aller p53 mutierten kolorektalen Karzinome [64]. In diesem Zusammenhang ist die Hypothese aufgestellt worden, daß zu einem unbestimmten Zeitpunkt in der Tumorigenese eines der p53 Allele durch eine Punktmutation verändert wird und das tetramere Protein in unterschiedlichem Ausmaß in eine fehlerhafte Konformation zwingt. Der transformierende Prozeß kann dann durch den Verlust des zweiten, bisher intakten Allels potenziert werden, und die p53 Funktion wird völlig außer Kraft gesetzt. Der Einfluß, den das LOH-Ereignis auf die Tumorentstehung bzw. Progression hat, ist abhängig von der Schwere des durch die Punktmutation bedingten Funktionsverlustes. Diese Hypothese findet sich darin bestätigt, daß der überwiegende Anteil solcher Tumoren, die zwar ein durch Punktmutation verändertes Allel besitzen, dieses jedoch eine nur geringe Dominanz in der Ausbildung der Tertiärstruktur des Oligomers hat, eine „loss of heterozygosity“ für das Chromosom 17p aufweisen.

40% aller p53 Mutationen in menschlichen Tumoren treten an fünf Aminosäureresten auf, nämlich an den Positionen 175, 248, 249, 273 und 282.

Die hohe Frequenz dieser „hot spot“ Mutationen steht in Zusammenhang mit den Ursprungsgeweben der Tumoren.

Zum Beispiel finden sich Mutationen des Codon 175 in ca. 32% aller kolorektalen Karzinome. In 53% der hepatozellulären Karzinomen, welche in Regionen mit hoher Inzidenz (vor allem Südchina) vorkommen, lassen sich Mutationen im Kodon 249 entdecken [65].

Neben dem Ort der Mutation läßt sich auch für die Art der Veränderung eine gewebespezifische Verteilung beschreiben. In nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen sind z.B. G:C/T:A Transversionen die am häufigsten gefundenen Alterationen, während in kolorektalen Karzinomen fast ausschließlich Transversionen auftreten und zwar überwiegend an CpG Dinukleotiden. In hepatozellulären Karzinomen spielen G/T Mutationen eine große Rolle. Als Ursache für diese Beobachtungen wird die Verschiedenheit der Mutagene, welche die genetischen Alterationen auslösen, verantwortlich gemacht. So kann auf experimentelle Weise dargestellt werden, daß Aflatoxin B1, das als potentes Leberkarzinogen bekannt ist, vorwiegend G/T Transversionen auslöst, und dies in hohem Maße am Kodon 249. Die Substanz Benzo(a)pyren, die in Zigarettenrauch enthalten ist und sog. „bulky adducts“ an der DNA bildet, verursacht typischerweise G/T Transversionen, wie sie in Lungenkarzinomen gefunden werden.

Die Abb. I.14 gibt einen Überblick über die Häufigkeit von p53 Mutationen in menschlichen Malignomen.

### 3.6. Nachweisverfahren von p53 Genmutationen

Verschiedene Methoden sind zum Aufdecken von p53 Mutationen in menschlichen Tumoren verwandt worden. Hierbei haben sowohl immunhistochemische als auch molekularbiologische Methoden erfolgreich zur Identifikation und Charakterisierung von p53 Alterationen beitragen können.

Immunhistochemische Analysen sind mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern durchgeführt worden. In Abhängigkeit von der Bindungsstelle des Antikörpers sind solche Antikörper zu unterscheiden, die beide, Wildtyp- und mutantes p53, entdecken können (z.B. PAb 1801, DO-1, DO-7) und solche, die spezifisch für das mutante Protein sind (z.B. PAb240). Immunhistochemische Methoden sind jedoch beschränkt auf die Detektion von unphysiologisch akkumuliertem p53, da in normalen Zellen die Konzentration des Proteins unterhalb der Nachweisgrenze dieser Analyseform liegt. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, daß durch die Dynamik des p53 das Protein in einer dem Antikörper nicht zugänglichen Konformation vorliegt und somit dem Nachweis entgeht.

Molekularbiologische Analyseformen sind durch die Einführung der Polymerasekettenreaktion (PCR) erheblich erleichtert worden. Zum Mutationsnachweis hat sich die SSCP („single strand conformation polymorphism“) in Kombination mit der PCR als sehr sensitive Methodik erwiesen. So können mit ihr 10% an mutanten Sequenzen unter Wildtyp DNA nachgewiesen werden. Diese Form der Mutationssuche eignet sich besonders für Mutationen, die über einen großen Raum innerhalb eines Gens verteilt liegen, wie dies beim p53 Gen der Fall ist. Die Art der Mutation kann im Anschluß mit Hilfe der Gensequenzierung aufgedeckt werden.

Für die PCR werden in der Regel Primer benutzt, mit denen jedes Exon separat amplifiziert werden kann. Die Primersequenzen korrespondieren dann entweder mit der Sequenz des entsprechenden Exons oder mit der eines flankierenden Introns.

#### 4. Das Diffuse Neuroendokrine System

Mit dem Begriff „Diffuses Neuroendokrines System“ (DNS) beschreibt man eine Gruppe von im Körper verstreut liegenden Zellen, Zellgruppen und Organen, die bestimmte, immunhistochemisch nachweisbare, Identifikationsmarker exprimieren und deren gemeinsame embryologische Abstammung vermutet wird. Dieser Hypothese zufolge wandern die Zellen in der frühen Embryonalphase aus dem Neuralrohr aus und verteilen sich über den ganzen Organismus. Die Abbildung I.15 faßt einige der neuroendokrinen Zellen bzw. Zellsysteme zusammen.

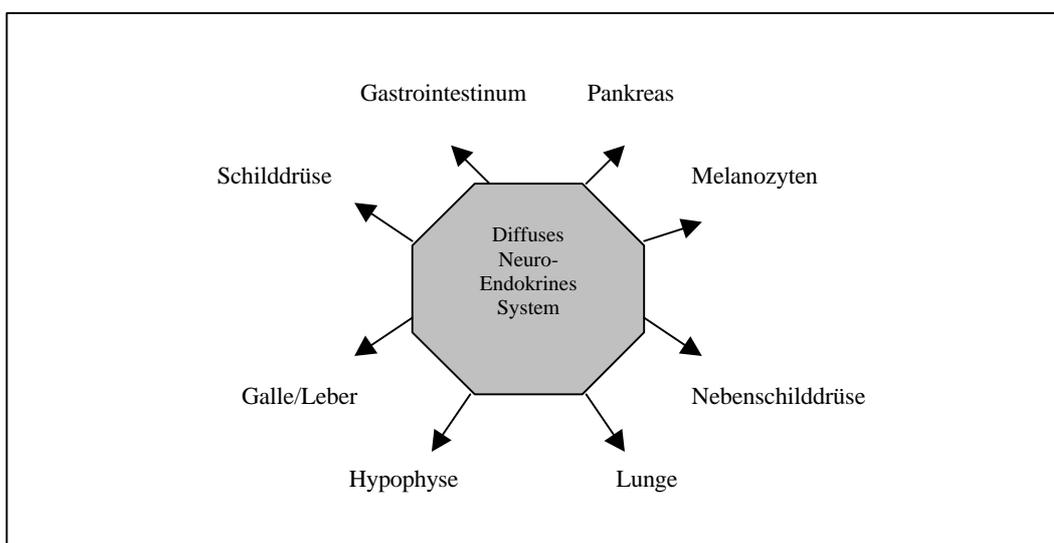


Abb. I.15 Das Diffuse Neuroendokrine System

Die von den Zellen bzw. Zellgruppen des DNS exprimierten Identifikationsmarker können unterteilt werden zum einen in sog. generelle, also gemeinsame Marker, die von der überwiegenden Zahl der neuroendokrinen Zellen exprimiert werden und eine Zelle oder Zellgruppe als zum DNS zugehörig klassifizieren, zum anderen in die sog. spezifischen Marker, also von den einzelnen Zellen synthetisierte Hormone oder biogene Amine. Die Tabelle I.3 subsumiert die generellen und spezifischen Identifikationsmarker neuroendokriner Zellen [66].

Generelle Marker	Spezifische Marker
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Synaptophysin</li> <li>• Neuronen-spezifische Enolase</li> <li>• Chromogranine A-C</li> <li>• PGP9.5</li> <li>• Leu7</li> <li>• 7B2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GI-Trakt: Gas, Ser, Mot, PP, SRIH, sP, CCK, GIP, VIP, GRP(Bomb), NT, GHRH, Tet, Enk, GI</li> <li>• Lunge: Ser, Enk, GRP(Bomb), SRIH, CT</li> <li>• Thymus: Ser, SRIH</li> <li>• C-Zellen: CT, Ser, GRP, SRIH</li> <li>• Pankreas: Ins, GI, Ser, PP, SRIH</li> <li>• Hypophyse: Prl, GH, ACTH, End, LH, FSH, TSH</li> <li>• Nebennierenmark: Ser, NA, A, Enk, NT, NpY, CT, SRIH</li> <li>• Brust, Ovar, Zervix, Prostata u.a.: Ser, SRIH, ACTH, u.a.</li> </ul>

Tab. I.3 Generelle und spezifische Identifikationsmarker des DNS  
(A, Adrenalin; Bomb, Bombesin; CCK, Cholezystokinin; CT, Calcitonin; Enk, Enkephalin; FSH, Follikel Stimulierendes Hormon; Gas, Gastrin; GH, Growth Hormone; GRH, Growth Hormone Releasing Hormone; GIP, Gastrin Inhibiting Peptide; GI, Glukagon; Ins, Insulin; LH, Luteinisierendes Hormon; Mot, Motilin; NA, Noradrenalin; NpY, Neuropeptid Y; NT, Neurotensin; PP, Pankreatisches Polypeptid; Prl, Prolaktin; Ser, Serotonin; sP, Substanz P; SRIH, Somatostatin; TSH, Thyroidea Stimulierendes Hormon; VIP, Vasointestinales Peptid)

#### 4.1. Die neuroendokrine Lunge

Die neuroendokrinen, oder Kulchitsky - Zellen des tracheobronchialen Baumes bilden eine normale Komponente der basalen Schicht der bronchialen Mukosa. Sie stellen sich mikroskopisch als zilienlose, eosinophile Zellen mit unterschiedlich langen zytoplasmatischen Fortsätzen dar. Zum Teil bilden sie häufchenförmige Zellaggregate, die von Lauwernys et al. als neuroepitheliale Körper („neuroepithelial body“) bezeichnet wurden [67]. Sie sezernieren eine Vielzahl von Polypeptiden und Hormonen, darunter Serotonin, Bombesin bzw. sein Äquivalent Gastrin Releasing Peptide (GRP), Calcitonin, Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP), Leu-Enkephalin, sowie die  $\alpha$  -Untereinheit des Humanen Chorion Gonadotropin (HCG).

Die Funktion ihrer neuroendokrinen Signalübertragung ist noch nicht endgültig geklärt. Es ist jedoch bekannt, daß die pulmonalen endokrinen Zellen ihre Zellprodukte unter normalen Bedingungen nicht in die Blutbahn abgeben. Es wird daher eine Funktion als lokale Chemorezeptoren oder als parakrine Mediatoren vermutet. Pathohistologische Befunde zeigen zudem eine fokale Proliferation neuroepithelialen Gewebes in der Umgebung narbig-fibröser Herde und in Verbindung mit weiteren bronchopulmonalen Erkrankungen wie Bronchiektasie, chronischer Bronchitis u.a. [67].

## 4.2. Das neuroendokrine Verdauungssystem

Das neuroendokrine Verdauungssystem wird in seiner Gesamtheit als das größte endokrine Organ des Körpers bezeichnet. Es sind dort bereits eine Vielzahl von Substanzen auf der Basis ihrer funktionellen Aktivität immunhistochemisch charakterisiert worden. Um aus der Fülle der beschriebenen Moleküle die richtigen auszuwählen, wurden stringente Kriterien entwickelt, deren Erfüllung die Voraussetzung für die Eingruppierung in die Klasse der gastrointestinalen Hormone ist. Hierzu muß die Substanz (a) an dem Ort isolierbar sein, auf den zuvor ein physiologischer Stimulus gewirkt hat; (b) sie muß nach der Einwirkung eines bekannten physiologischen Stimulus in die Blutbahn oder das umliegende Gewebe abgegeben werden; (c) exogen zugeführt, muß die Substanz bei Erreichen eines physiologischen Spiegels das Auftreten des entsprechenden Effekts bewirken; (d) die Substanz muß durch chemische Verfahren isoliert werden können und (e) seine Struktur muß durch biochemische Syntheseverfahren bestätigt sein [68].

Die Tabelle I.5 illustriert die Lokalisation und die Hauptfunktion der wichtigsten neuroendokrinen Peptide und Neuropeptide im menschlichen Verdauungssystem.

SUBSTANZ	LOKALISATION	HAUPTFUNKTION
Cholezystokinin	I-Zellen des Dünndarms	Pankreatische Enzymsekretion
Enkephaline	Nerven des Verdauungssystems	Inhibition der Motorik
Gastrin	Antrale G-Zellen, Intestinale IG-Zellen	Stimulation der Magensäuresekretion
GIP(Bombesin)	K-Zellen des Dünndarms	Stimulation der Insulinsekretion
Glucagon-like Immunoreactivit	L-Zellen des Dünn-und Dickdarm	Glukose Regulation
Motilin	M-Zellen des Dünndarm	Interdigestive intestinale Motorik
Neurotensin	N-Zellen des Ileum	Vaskuläre Regulation
Pankreatisches Polypeptid (PP)	PP-Zellen des Dünndarm	Pankreatische Enzyminhibition
Polypeptid YY	Unbekannte Kolonzelle	Unbekannt
Sekretin	S-Zelle des Verdauungs- traktes	Stimulation der Bikarbonatsekretion
Somatostatin	D-Zelle des Verdauungs- traktes	Multipler Inhibitor
Substant P	EC-und andere Zellen	Neurotransmitter
VIP	Nerven des Verdauungs-systems	Neurotransmitter

Tab. I.4 Peptide und Neuropeptide im neuroendokrinen Verdauungssystem

## 5. Neuroendokrine Neoplasien

Neuroendokrine Neoplasien sind für praktisch jedes Organsystem des Körpers beschrieben worden. Am häufigsten jedoch finden sich Karzinoide im gastrointestinalen Trakt (73,7%), gefolgt vom bronchopulmonalen System (25,1%) [69]. Die Klassifikation der neuroendokrinen Neoplasien hat ebenso wie die Suche nach einer einheitlichen Definition der zugehörigen Zellen bereits verschiedene Revisionen erfahren. Der Terminus „Karzinoid“ wurde erstmals 1907 von Oberndorfer eingeführt [70]. Er beschrieb damit eine Gruppe von Tumoren des Ileums, die eine charakteristische Morphologie aufwiesen und mit bestimmten klinischen Symptomen einhergingen. In den Jahren 1952 bis 1954 wurde dann das Krankheitsbild des Karzinoidsyndroms beschrieben und die von den Tumoren produzierten Hormone isoliert. Williams und Sandler teilten 1963 die endokrinen Tumoren des Darms auf der Basis von klinischen und pathologischen Unterscheidungsmerkmalen in Tumoren des Vorderdarms (Magen, Pankreas, Duodenum und oraler Anteil des Jejunum), des Mitteldarms (aboraler Anteil des Jejunum, Ileum, Appendix und Zäkum) und des Hinterdarms (Kolon und Rektum) [71] ein.

Nach der 1980 entstandenen WHO-Klassifikation soll der Begriff „Karzinoid“ auf alle Tumoren des Diffusen Neuroendokrinen Systems angewandt werden, mit Ausnahme von endokrinen Tumoren des Pankreas, von medullären C-Zell-Karzinomen der Schilddrüse, Paragangliomen, kleinzelligen Lungenkarzinomen und Merkel Zell Tumoren der Haut. Die demzufolge als Karzinoide zu betrachtenden Neoplasien werden auf der Basis von verschiedenen Silberfärbemethoden subklassifiziert in (a) Enterochromaffine (EC) Zell Karzinoide, (b) Gastrin (G) Zell Karzinoide und (c) andere Karzinoide. Die Anwendung dieses Systems hat sich jedoch als zunehmend schwierig erwiesen, da durch die Verwendung neuerer Färbeverfahren immense Unterschiede zwischen den Tumoren der einzelnen Gruppen entdeckt werden konnten.

Die von Klöppel et al. 1995 revidierte Form umfaßt alle Neoplasien des DNS [72]. Die einzelnen Neoplasien, nun als „Neuroendokrine Tumoren“ bezeichnet, werden zunächst nach ihrem Ursprungsort kategorisiert. Weitere Unterteilungskriterien sind dann ihre Dignität (Differenzierungsgrad, Invasion in umliegendes Gewebe oder in Gefäße, Metastasierung), morphologische Charakteristika (Zellgröße) und schließlich ihre Syntheseleistung. Vereinfacht ist dies in Tab. I.5 dargestellt.

## Lunge

---

- **Benigne :**
  - Nichtfunktional (typisches Karzinoid)
  - Funktional
- **Niedrigmaligne :**
  - Nichtfunktional (atypisches Karzinoid)
  - Funktional
- **Hochmaligne :**
  - Nichtfunktional oder funktional mit Subklassifizierung in großzellig/kleinzellig

## Pankreas

---

- **Benigne/kleinzellig :**
  - Nichtfunktional
  - Funktional mit Subklassifizierung in Insulinom/andere
- **Benigne oder Niedrigmaligne und intermediärzellig :**
  - Nichtfunktional
  - Funktional mit Subklassifikation in Insulinom/andere
- **Niedrigmaligne und großzellig oder angioinvasiv :**
  - Nichtfunktional
  - Funktional mit Subklassifikation in Insulinom/andere
- **Hochmaligne :**
  - Nichtfunktional/Funktional als intermediärzellig der kleinzellig

## Magen

---

- **Benigne (Nichtfunktional/kleinzellig)**
- **Benigne oder Niedrigmaligne (Nichtfunktional/intermediärzellig)**
- **Niedrigmaligne :**
  - Nichtfunktional/großzellig
  - Nichtfunktional anderer Zellgröße
- **Hochmaligne :**
  - Nichtfunktional/Funktional als intermediärzellig/kleinzellig

## Duodenum

---

- **Benigne :**
  - Nichtfunktional
  - Gangliozytisches Paragangliom
- **Benigne oder Niedrigmaligne :**
  - Nichtfunktional intermediärzellig mit Angioinvasion
  - Nichtfunktional kleinzellig ohne Angioinvasion

- **Niedrigmaligne :**  
     **Nichtfunktional und großzellig**  
     **Funktional jeder Zellgröße**
- **Hochmaligne :**  
     **Nichtfunktional/Funktional als intermediär-**  
     **zellig/kleinzellig**

#### Jejunum und Ileum

---

- **Benigne (Nichtfunktional/kleinzellig)**
- **Benigne oder Niedrigmaligne**  
     **(Nichtfunktional/intermediärzellig)**
- **Nidriegmaligne :**  
     **Nichtfunktional großzellig oder mit Angioinvasion**  
     **Funktional jeder Größe**
- **Hochmaligne :**  
     **Nichtfunktional/Funktional als intermediär-**  
     **zellig/kleinzellig**

#### Appendix

---

- **Benigne (Nichtfunktional/kleinzellig)**
- **Benigne oder Niedrigmaligne**  
     **(Nichtfunktional/großzellig)**
- **Niedrigmaligne :**  
     **Nichtfunktional großzellig**  
     **Funktional jeder Größe**
- **Hochmaligne :**  
     **Nichtfunktional/Funktional als intermediaär-**  
     **zellig/kleinzellig**

#### Kolon und Rektum

---

- **Benigne (Nichtfunktional/kleinzellig)**
- **Benigne oder Niedrigmaligne**  
     **(Nichtfunktional/kleinzellig)**
- **Niedrigmaligne :**  
     **Nichtfunktional großzellig**  
     **Funktional jeder Größe**
- **Hochmaligne :**  
     **Nichtfunktional/Funktional als intermediär-**  
     **zellig/kleinzellig**

Tab. I.5 Klassifikation neuroendokriner Neoplasien

## 5.1. Klinisches Erscheinungsbild neuroendokriner Tumoren

Karzinoide sind die vielgestaltigsten und gleichzeitig häufigsten endokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes und machen annähernd 55% dieser Neoplasien aus. Die Inzidenz dieser Karzinoide beträgt in den USA ca. 15/1 Mio. Einwohner/Jahr [69]. Sie können in Erscheinung treten als gastrointestinale Blutung, durch einen Verschuß infolge Tumorwachstum oder Tumor-induzierter mesenterischer Fibrose oder durch Symptome, welche durch die vom Tumor synthetisierten Hormone hervorgerufen werden. Enterochromaffine (EC-) Zellen produzieren eine ganze Reihe von Hormonen. Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist darunter das am häufigsten sezernierte Produkt. Dazu wird von den Tumorzellen zirkulierendes Tryptophan enzymatisch umgebaut. Dies kann dazu führen, daß nur noch unzureichende Mengen dieses Substrates für den Einbau in Proteine und die Niacin-Synthese übrigbleiben. Als Konsequenz können Symptome der Mangelernährung oder Pellagra auftreten.

Serotonin induziert die intestinale Sekretion, hemmt die intestinale Absorption und stimuliert die Darmmotorik. Erhöhte Serotoninspiegel sind daher die wahrscheinlichste Ursache von Diarrhoen beim Karzinoidsyndrom. Auch stimuliert Serotonin das Wachstum von Fibroblasten, was die peritoneale Fibrose und Endokardfibrose vermitteln kann. Viele weitere pathophysiologische Veränderungen beim Karzinoidsyndrom werden auch durch erhöhte Spiegel anderer Substanzen vermittelt, wie die Tabelle I.6 erkennbar macht.

Klinisches Bild	Häufigkeit (%)	Mediatoren
Diarrhoe	78	5-HT, Histamin, Gastrin Prostaglandine
Kutaner Flush	94	5-HT, Histamin, Kallikrein, Substanz K, Substanz P
Brochokonstriktion	18	5-HT, Histamin
Endokardfibrose	40	5-HT
Abdominelle Schmerzen	51	Tumor, Peritonealischämie

Tabelle I.6 Symptome der Karzinoiderkrankung

Ein großer Anteil der Karzinoide jedoch verhält sich klinisch asymptomatisch. Als Gründe werden die Synthese von biologisch inaktiven Hormonen und der rapide Abbau der sezernierten Produkte vermutet.

Im Gegensatz zu anderen gastrointestinalen Karzinoiden ist die klinische Symptomatik bei den Inselzelltumoren des Pankreas in der Regel auf die Synthese eines Hormones zurückzuführen. Sie ist charakterisiert durch das gemeinsame Auftreten von schweren peptischen Ulzera, rezidivierenden Diarrhoen und Gastrinproduzierenden Tumoren des Pankreas. Gastrinome unterhalten ständig hohe Serum-Gastrinspiegel, die zu einer Hypersekretion von Magensäure und in Folge davon zu duodenalen oder jejunalen Ulzera und Diarrhoen führen. Das Kennzeichen von pankreatischen B-Zelltumoren ist die Entwicklung einer symptomatischen Hypoglykämie infolge nichtregulierbarer Insulin-Hypersekretion. Insulinome sind die zweithäufigsten funktionellen Inselzelltumoren. Die Whipple-Trias beschreibt das klassische Bild der Insulinome: Hypoglykämie bei Nahrungskarenz, hypoglykämische Anfälle und schlagartige Besserung nach intravenöser Glukosezufuhr.

Das Verner-Morrison-Syndrom ist gekennzeichnet durch das gemeinsame Auftreten von wäßriger Diarrhoe, Hypokaliämie und Achlorhydrie in Assoziation mit einem Nicht-B-Zelltumor der Pankreasinseln. Das klinische Bild dieses Syndroms wird durch hohe Spiegel des vasoaktiven intestinalen Polypeptids (VIP) bestimmt, welches von dem Tumor sezerniert wird. Vipome machen 2% der gastroenteropankreatischen Tumoren aus und haben eine Prävalenz von ca. 1/ 1 Mio. Einwohner/ Jahr.

Zusätzlich zu den beschriebenen Krankheitsbildern werden Inselzelltumoren mit einer Anzahl weiterer Syndrome des Hormonüberschusses in Verbindung gebracht. Dazu gehören Diabetes mellitus (Glukagon), die Trias aus Diabetes mellitus, Steatorrhoe und Cholelithiasis beim Somatostatinom oder Hyperkalzämie (PTH-ähnliches Peptid).

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Syndromen zeichnen sich die neuroendokrinen Tumoren des Bronchialsystems durch eine hohe Variabilität ihrer klinischen Manifestationen aus. Zentral liegende Tumoren machen sich zumeist durch eine Obstruktionssymptomatik, durch rezidivierende Pneumonien und durch Hämoptysen bemerkbar. Das Karzinoidsyndrom ist jedoch selten und tritt nur in ca. 2% der Fälle auf. Paraneoplastisch Symptome wie Hypoglykämie oder Cushing-Syndrom finden sich zumeist bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen.

Bei einigen familiär auftretenden Krankheiten verursachen neoplastische Veränderungen in mehreren endokrinen Organen Hormonüberschußsyndrome. Diese multiplen endokrinen Neoplasien werden in 3 Syndromgruppen eingeteilt, wie in Tabelle I.7 verdeutlicht.

MEN Typ	Erbgang	Klinische Symptome	Mutation
I (Wermer-Syndrom)	aut.-dom.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• primärer HPT</li> <li>• Pankreastumoren (Gastrinome, Glukagenome u.a.)</li> <li>• Hypophysentumoren (Prolaktinome, STH-Tumoren u.a.)</li> </ul>	
II A (Sipple-Syndrom)	aut.-dom.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• primärer HPT</li> <li>• Phäochromozytom</li> <li>• C-Zell-Karzinom</li> </ul>	Mutation im <i>ret</i> Onkogen
II B (Gorlin-Syndrom)	aut.-dom.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phäochromozytom</li> <li>• C-Zell-Karzinom</li> <li>• Schleimhautneurinome</li> <li>• marfanoider Habitus</li> </ul>	Mutation im <i>ret</i> Onkogen

Tab. I.7 Multiple Endokrine Neoplasien (MEN)

## 5.2. Onkogene und Antionkogene in neuroendokrinen Tumoren

Die Suche nach Alterationen in wachstumsregulierenden Genen hat in den letzten Jahren immens zugenommen. Die überwiegende Mehrzahl aller menschlichen Gewebe und Tumorarten sind auf mögliche genetische Läsionen in den für Onkoproteine und Tumorsuppressorproteine kodierenden Sequenzen untersucht worden. Dabei konnten große Unterschiede im Expressionsmuster einzelner, potentiell tumorfördernder Gene festgesellt werden. Beispielsweise ist das *ras* Onkogen in 90% aller pankreatischen Adenokarzinome, in 50% der Kolonkarzinome, in 30% aller Adenokarzinome der Lunge und in 30% der akuten myeloischen Leukämien verändert.

Ähnlich weit verbreitet sind Alterationen des p53. Wie bereits erwähnt, weisen beispielsweise ca. 70% der Kolorektalkarzinome, 60% aller malignen Blasentumoren und 40% der Ösophagealkarzinome Veränderungen des p53 Proteins auf [17].

Die molekulare Onkologie von neuroendokrinen Tumoren stellt in dieser Hinsicht eine Ausnahme dar. Aufgrund der wenigen bisher zu diesem Thema durchgeführten Untersuchungen ist die Tumorigenese der DNS-Tumoren bisher

wenig verstanden und bedarf weiterer Klärung. Tumorentwicklung ist ein "Multistep"-Prozess, der aus der funktionellen Abkopplung von Wachstum und Differenzierung regulierenden Systemen resultiert. Es sind daher eine Vielzahl von Untersuchungen notwendig, um ein sequentielles Entstehungsmodell ähnlich dem bei Kolorektalkarzinomen aufstellen zu können.

Auf die Ergebnisse von bisher zur Kanzerogenese bei neuroendokrinen Tumoren erschienenen Publikationen wird daher in Kapitel 4 ausführlich eingegangen.

In Untersuchungen, welche sich mit Veränderungen des p53 Gens in neuroendokrinen Neoplasien beschäftigten, ließ sich der Trend erkennen, daß p53 Alterationen eine untergeordnete Rolle in der Entstehung der neuroendokrinen Neoplasien zu spielen scheinen. So konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt werden, daß gastrointestinale, neuroendokrine Neoplasien nur ausnahmsweise p53 Veränderungen erkennen lassen. Höfler und Mitarbeiter untersuchten beispielsweise 1993 eine Anzahl von 40 neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems mit molekularbiologischen Methoden. Nur in einem Rektumkarzinoid konnte eine G/C-Transversion im Kodon 283 festgestellt werden. Interessanterweise handelte es sich bei diesem Tumor um eine benigne Läsion [74]. Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Studie von Wang et al. aus Belfast von 1994. Unter u.a. 58 neuroendokrinen Tumoren von Pankreas, Darm und Lunge konnte immunhistochemisch nur ein p53-positives Bronchialkarzinoid gefunden werden [75].

P53 Alterationen sind, wie oben bereits angesprochen, in vielen menschlichen Neoplasien auffindbar und spielen eine zentrale Rolle in der Genese vieler Karzinome. Würde sich daher der Trend verfestigen, daß p53 Veränderungen in der Entstehung von DNS-Tumoren keinen zentralen Schritt induzieren, so würde dies einen entscheidenden Impuls für weitere, sich mit der neuroendokrinen Tumorigenese beschäftigenden Arbeiten darstellen. Hierzu bedarf es jedoch weiterer Untersuchungsergebnisse.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Patienten und Probenmaterial

Das Patientenkollektiv umfaßt 30 Patienten mit einem neuroendokrinen Tumor, davon 14 weiblich und 16 männlich. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation betrug 58,8 Jahre. Die Patienten wurden in den Jahren 1990 bis 1995 im Universitätsspital Zürich, an der Medizinischen Hochschule Hannover und im Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg operiert. Zwei Patienten litten unter einem Karzinoid des Magens, zwei Patienten hatten ein Duodenalkarzinoid, zehn ein Ileumkarzinoid, zwei ein Appendixkarzinoid und zwei ein Rektumkarzinoid. Desweiteren wurde das Gewebe von fünf endokrinen Pankreastumoren (vier Insulinome, ein VIPom), einem Somatostatinom der Papille, einem Duodenumgastrinom und zwei pulmonalen Karzinoiden untersucht. Von zwei weiteren Patienten mit einem pulmonalen Karzinoid lagen Resektate hepatischer Metastasen vor. Ebenso von einem Patienten mit einem rektalen Primärtumor. Die weiteren Daten faßt die Tab. II.1 zusammen.

IPN	Geschlecht	Alter bei OP	Tumortyp
1	w	31 J.	Rektumkarzinoid
2	w	48 J.	VIPom des Pankreas
3	w	77 J.	Ileumkarzinoid
4	m	75 J.	Somatostatinom der Papille
5	m	75 J.	LM eines pulmonalen Karzinoids
6	w	81 J.	Ileumkarzinoid
7	m	46 J.	Rektumkarzinoid
8	m	53 J.	Appendixkarzinoid
9	m	36 J.	Duodenalkarzinoid
10	m	55 J.	LM eines pulmonalen Karzinoids
11	m	73 J.	Insulinom des Pankreas
12	w	63 J.	Duodenalkarzinoid
13	m	61 J.	Ileumkarzinoid
14	w	70 J.	Magenkarzinoid
15	w	58 J.	Ileumkarzinoid
16	m	71 J.	Ileumkarzinoid
17	w	85 J.	Ileumkarzinoid
18	m	67 J.	Ileumkarzinoid
19	m	13 J.	Appendixkarzinoid

20	m	83 J.	Gastrinom des Duodenum
21	w	52 J.	Ileumkarzinoid
22	w	56 J.	Insulinom des Pankreas
23	w	48 J.	Pulmonales Karzinoid
24	m	74 J.	Ileumkarzinoid
25	m	54 J.	LM eines Rektumkarzinoids
26	w	34 J.	Insulinom des Pankreas
27	w	29 J.	Insulinom des Pankreas
28	w	86 J.	Ileumkarzinoid
29	m	53 J.	Pulmonales Karzinoid
30	m	57 J.	Magenkarzinoid

Tab. II.1 Patientenkollektiv

(IPN=Interne Proben Nummer; LM=Lebermetastase)

## 2. Reagenzien

Es wurden die folgenden Reagenzien zur Durchführung der Versuche verwendet :

### 2.1. Immunhistochemie

- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 0,01M, pH 7,6

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat	1,48g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat	0,43g
NaCl	Natriumchlorid	7,2g

add 1000ml Aqua dest. (a.d.)

- Zitratpuffer, pH 6,0

A: (COOH) <sub>3</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O	Zitronensäure	21,08g add 1000ml a.d.
B: [(COOH) <sub>3</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O]Na	Natriumzitat	29,41g add 1000ml a.d.

10 fach Stock: 9ml Reagenz A + 41ml Reagenz B add 450ml a.d.

1 fach Zitratpuffer: Verdünnen des 10fach Stock 1:10 mit a.d.

- Wasserstoffperoxidreagenz

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	Wasserstoffperoxid	1,5ml
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline	185,0ml

- Normalserum

Normalserum	(Vector/ABC Maus Elite Kit, USA)	15µl
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline	1ml
BSA	Bovines Serum Albumin	+ 1%

- Primärantikörperserum

Primärantikörper	DO7, DAKO, USA	
PBS-Puffer	PAb 1801, Dianova, Deutschland	20µl
BSA	Phosphate Buffered Saline	1ml
	Bovines Serum Albumin	+ 1%

- Biotiniliertes Antikörperserum

Biotiniliertes Antikörperserum	(Vector/ABC Maus Elite Kit)	5µl
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline	1ml
BSA	Bovines Serum Albumin	+ 1%

- Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex)

AB-Komplex-Serum	(Vector/ABC Maus Elite Kit)	10µl A
		10µl B
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline	1ml

- 3,3-Diaminobenzidin Färbelösung (DAB)

DAB	320mg
a.d.	200ml
H2O2 30%	200µl

- Gill's Hämatoxylin Färbelösung

Hämatoxylin-Lösung	Gill Nr. 1	150ml
a.d.		150ml

## 2.2. Molekularbiologie

- Digestionspuffer

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	200µl
im Verhältnis 25:24:1	

- PCR-Reaktionspuffer (Boehringer, Deutschland)

KCl (Kaliumchlorid)	10mM
Tris-Cl (Tris-Chlorid)	100mM, pH 8,3
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumdichlorid)	15mM
Gelantine	0,01%

- PCR-Reaktionsansatz

Reaktionspuffer (Boehringer, Deutschland)	10µl
Nukleotide dATP (Adenosintriphosphat)	10nmol
dGTP (Guanosintriphosphat)	10nmol
dCTP (Cytidintriphosphat)	10nmol
dTTP (Thymidintriphosphat)	10nmol
DNA-Polymerase (Perkin-Elmer, USA)	1U
Primer	25nmol
DNA	1µl

- SSCP-Reaktionsansatz

NaOH (10mM)	Natriumhydroxid	1µl
EDTA (10mM)	Ethylendiamintetraacetat	1µl
Loading Dye Solution 6-fach (MBI, Deutschland)		1µl
Amplikon		5µl

- **SSCP-Längenstandard**

Längenstandard (Boehringer DNA Molecular Weight Marker VII)	1 µl
Loading Dye Solution (MBI, Hamburg)	1 µl
a.d.	2 µl

- **SSCP-Entwicklungsreagenz A**

C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH 100%	Ethanol abs.	100ml
CH <sub>3</sub> COOH	Essigsäure	5ml

ad 1000ml a.d.

- **SSCP-Silverstain-Reagenz**

AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat	1g
-------------------	--------------	----

ad 1000ml a.d.

- **SSCP-Entwicklungsreagenz B**

NaOH	Natriumhydroxid	15g
NaBH <sub>4</sub>	Natriumhydrogenbromid	0,1g
Formalin 37%		2ml

ad 1000ml a.d.

### 3. Immunhistochemie

#### 3.1. Vorbereitung der Operationspräparate

Die intraoperativ entnommenen Proben wurden in 10% gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Gefrieren wurden mit dem Mikrotom 4µm dicke Schnitte angefertigt.

#### 3.2. Die Immunperoxidase - Technik

Das Tumorantigen wurde immunhistochemisch mittels der Avidin-Biotin-Peroxidase Methode nachgewiesen. Diese Technik umfaßt im wesentlichen drei wichtige Schritte zur Darstellung eines bestimmten Tumormarkers [76]:

1. Die Inkubation mit einem gegen das spezifische Antigen gerichteten primären Antikörper von der Maus
2. Die Anwendung eines sekundären, mit Biotin konjugierten Antikörpers vom Pferd, der gegen das primäre Antiserum gerichtet ist
3. Die Hinzugabe eines Avidin-Biotin-Peroxidase Komplexes

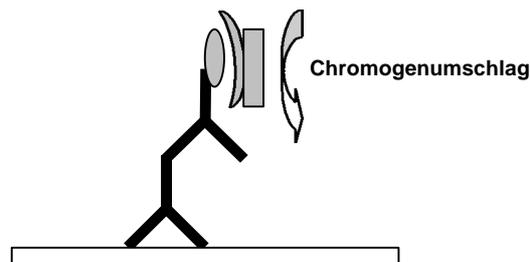


Abb. II.1: Avidin-Biotin-Peroxidase Methode

(  =Biotin an Sekundärantikörper gebunden;  =Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex)

Nach der Entparaffisierung wurden die Schnitte in der Mikrowelle vorbehandelt. Dazu wurden sie 20 Minuten lang in 10mM Zitratpuffer gekocht und anschließend auf Zimmertemperatur heruntergekühlt.

Verwendet wurden die Antikörper Pab1801, D0-7 und ein 1:1-Gemisch aus beiden Antiseren. Pab1801 bindet an ein denaturierungsresistentes Epitop zwischen den Aminosäuren 32 und 79 des p53 Proteins. D0-7 erkennt ein Epitop zwischen den Aminosäuren 1 und 45. Beide erkennen dabei sowohl Wildtyp- als auch mutiertes p53. In Kombination mit der Mikrowellenvorbehandlung konnten Resnick et al. für diese Antikörper, separat und in Mischung, jeweils eine 100%ige Sensitivität relativ zu optimalen immunhistochemischen Färbemethoden an Frischgewebe feststellen [77].

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Färbetechnik dargestellt.

- Entparaffinieren der Schnitte 2x5 Minuten in Rotihistol
- Dehydrieren in absteigender Alkoholreihe
- Kochen der Schnitte in 10mM Zitratpuffer für 20 Minuten
- Spülen in PBS
- Abblocken der endogenen Peroxidase durch 15 minütiges Spülen in 30% Wasserstoffperoxyd
- Spülen in PBS
- Inkubation mit Normalserum vom Pferd und 1% BSA bei 37°C für 10 Minuten
- Applikation des primären Antikörpers PAb 1801, DO-7 oder 1:1 Gemisch aus PAb 1801 und DO-7 in der Verdünnung 1:50
- 1 stündige Inkubation bei 37°C
- Spülen in PBS
- Inkubation mit dem Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:50 für 30 Minuten bei 37°C
- Spülen mit PBS
- Hinzugabe des AB-Komplexes und Inkubation für 30 Minuten
- Spülen mit PBS
- Anfärbung mit DAB-Substratlösung
- Spülen mit PBS
- Gegenfärbung mit Gill's Hämalaun pur für 20 Sekunden
- 10-minütiges Wasserbad
- Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe
- Klärung in Rotihistol
- Eindeckelung in Entelan

### **3.3. Auswertung**

Die Präparate wurden in wahlloser Reihenfolge evaluiert. Der Anteil der p53-positiven Zellen wurde semiquantitativ ausgewertet. Dabei wurde auf eine selektive Anfärbung der Zellkerne geachtet. Die unterschiedlichen Intensitäten der Anfärbung wurden eingeteilt in Grad 0 bis Grad 2.

- 0** negativ, d.h. keine selektiv positiven Zellkerne
- 1** bis 50% der Zellen positiv
- 2** über 50% der Zellen positiv

## **4. Molekularbiologie**

### **4.1 Patienten und Probenmaterial**

Untersucht wurde die DNA aus Paraffin-eingebettetem Gewebe. In fünf Fällen lag Frischgewebe vor, dem dann der Vorzug vor Paraffinproben gegeben wurde. Das intraoperativ entnommene Material wurde in diesen Fällen in flüssigem Stickstoff konserviert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70°C gelagert. Das Paraffingewebe wurde in 10% gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

### **4.2. Probenaufarbeitung**

Zur Isolierung der DNA mußte das Tumormaterial zunächst zerkleinert werden. Dazu wurden die Proben in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Lag Paraffingewebe vor, wurden die Proben zunächst mit Hilfe von m-Xylol und Ethanol abs. entparaffiniert. Die Aufarbeitung der DNA erfolgte mit Hilfe der bekannten Phenol/Chloroform-Fällung. Dabei wurden die Gewebeproteine zunächst durch das Digestionsenzym Proteinase K zerstört. Durch die Zugabe eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Gemisches (25:24:1) und die Abnahme der nukleinsäurehaltigen, wäßrigen oberen Phase trennte sich die DNA von den lipophilen Bestandteilen des Gewebes. Es folgte die Präzipitation der DNA in einem

Gemisch aus 3M NaAzetat und Ethanol abs. bei -20°C über Nacht. Nach weiterer Aufreinigung in Ethanol 70% wurde die isolierte DNA in TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentrationen und mögliche Proteinkontamination konnten anschließend photometrisch bei 260nm bzw. 310nm bestimmt werden.

#### 4.3. Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR) geht auf K. Mullis zurück und wurde von Saiki et al. 1985 erstmals beschrieben [78]. Ausgehend von geringen Mengen an genetischem Material (DNA,RNA), ermöglicht sie es, innerhalb kurzer Zeit große Mengen einer gesuchten Zielsequenz zu erhalten. Hierzu sind neben dem Ausgangsmaterial Oligonukleotide, sog. Primer, notwendig. Diese binden als Startsequenzen spezifisch an den Enden der zu amplifizierenden Sequenz und bilden damit das für die Bindung der DNA-Polymerase notwendige 3'-OH-Ende. Außerdem benötigt man die vier Nukleotide (dATP,dGTP,dCTP,dTTP) und eine Pufferlösung, die das Reaktionsmilieu für das verwendete Enzym herstellt, heutzutage fast ausschließlich die sog. Taq-Polymerase. Das Gemisch dieser Substrate wird in einem Thermocycler einer periodischen Wiederholung von Denaturierung (Trennen der Doppelstrang-DNA), Annealing (Anlagern der Startsequenz) und Polymerisieren (Anlagerung der komplementären Basen an die Einzelstränge) durch die DNA-Polymerase unterworfen.

Amplifiziert wurden die Exons 5 bis 8 des p53 Gens. Die Sequenzen der zur Amplifikation notwendigen Primer entstammen vergleichbaren Publikationen. Es wurden verschiedene Oligonukleotide getestet und die mit den besten Ergebnissen zur weiteren Analyse verwandt. Die Synthese der Primer erfolgte im Institut für Zytochemie, Hamburg . Die Sequenzen der Primer, mit denen die besten Ergebnisse erzielt wurden, sind im Folgenden aufgeführt.

Amplifiziertes Fragment	Sequenz
A	5' TTCCT CTTCC TGCAG TACTC 3' 5' GCAAA TTTCC TTCCA CTCGG 3'
B	5' ACCAT GAGCG CTGCT CAGAT 3' 5' AGTTG CAAAC CAGAC CTCAG 3'
C	5' GTGTT GTCTC CTAGG TTGGC 3' 5' CAAGT GGCTC CTGAC CTGGA 3'
D	5' CCTAT CCTGA GTAGT GGTA 3' 5' CCAAG ACTTA GTACC TGAAG 3'

Abb. II.3 Primersequenzen

Die PCR erfolgte in 100µl Ansätzen, die neben 1µl der DNA 10µl des 10fach konzentrierten Reaktionspuffers, je 10nmol der vier Nukleotide dATP,dGTP,dCTP und dTTP, je 25nmol der zwei entprechenden Primer und 1U der thermostabilen DNA-Polymerase des Bakteriums thermophilus aquaticus) enthielten.

Es wurden 0.5ml Eppendorf Reaktionsgefäße verwendet und eine sog. „Hot-Start-PCR“ in einem Thermocycler der Firma Eppendorf, Hamburg nach folgendem Schema durchgeführt:

1. 95°C für 5 Minuten
2. Zugabe der Polymerase
3. 40 Zyklen von : 95°C für 30 Sekunden  
56°C für 30 Sekunden  
72°C für 1 Minute
4. 72°C für 10 Minuten

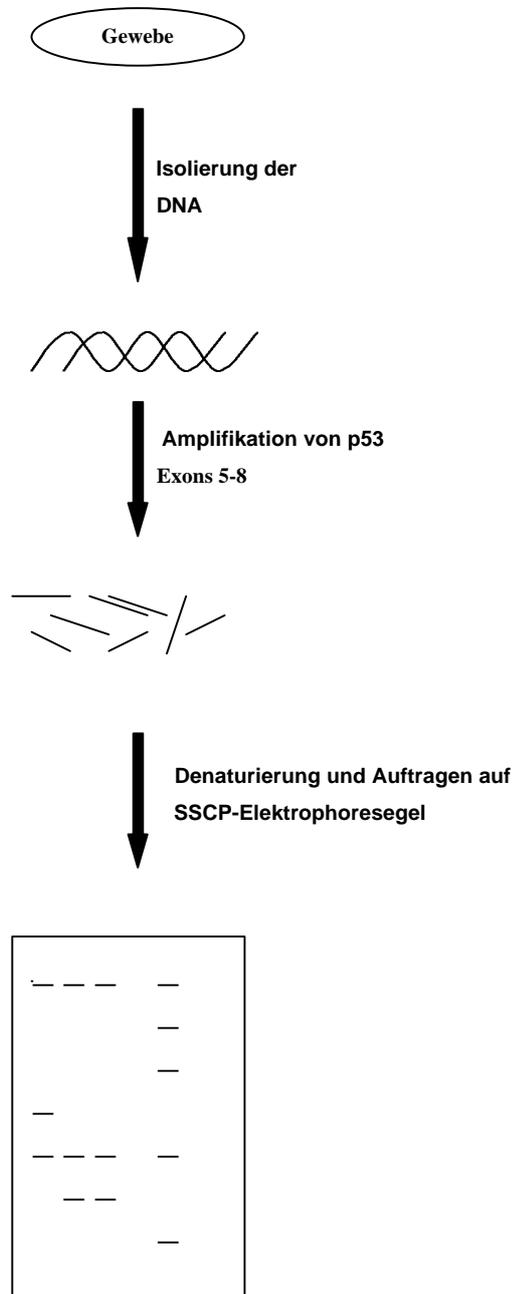
Die Spezifität und Ausbeute jeder PCR wurde durch Leerwertkontrollen und Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid-Fluoreszenzfärbung kontrolliert. War die Reaktion spezifisch, wurden die amplifizierten Sequenzen bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert.

#### 4.4. Die SSCP

Die SSCP („single strand conformation polymorphism“) ist eine Methode, mit der sich in einem Nukleinsäureeinzelstrang (DNA, RNA) Mutationen und Polymorphismen nachweisen, aber nicht beschreiben lassen. Sie basiert auf dem Prinzip, daß die elektrophoretische Beweglichkeit eines Moleküls in einer Gelmatrix von seiner Größe, Ladung und Form abhängt. DNA-Kopien müssen durch Hitzezufuhr denaturiert, d.h. in Einzelstränge gespalten werden, bevor sie der Elektrophorese auf einem nichtdenaturierenden Gel unterworfen werden. Bei der SSCP-Analyse genügt ein einziger Unterschied in der Basensequenz, damit sich unterschiedliche Faltstrukturen in den Einzelsträngen ausbilden. Im Gel offenbart sich diese veränderte Konformation in verschobenen Laufeigenschaften.

Untersucht wurden die amplifizierten Exons 5 bis 8 des p53 Gens. Sie besitzen eine Fragmentlänge von 214bp (Exon 5), 144bp (Exon 6), 139bp (Exon 7) und 166bp (Exon 8). Als Positivkontrollen dienten die Zelllinien CEM für Exon 5, A 204 für Exon 6, Jurkat für Exon 7 und Pune TV I für Exon 8. Diese wurden uns freundlicherweise vom onkologischen Labor der Universitätskinderklinik Hamburg zu Verfügung gestellt. Als Negativkontrolle diente DNA aus normalem menschlichen Muskelgewebe.

- Erstellen des Probenansatzes aus 5µl Amplikon, 1µl NaOH (10mM), 1µl EDTA (10mM) und 1µl Loading Dye Solution 6-fach in einem 0,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg)
- Inkubation des Probenansatzes für 4 Minuten bei 95°C
- Erstellen der Längenstandardlösung aus 1µl Längenstandard, 1µl Dye und 2µl destilliertem Wasser in einem 5ml Reaktionsgefäß
- Inkubation des Längenstandards für 4 Minuten bei 95 °C
- Auftragen der Proben und des Längenstandards auf ein 12% Polyacrylamidgel
- Inkubation für 3 Stunden bei einem Gradienten von 300 V/150 mA bzw. 5 W
- Entwicklung des Gels durch Inkubation im Entwicklungsreagenz A für 10 Minuten
- Silverstaining für 10 Minuten
- Inkubation im Entwicklungsreagenz B bis zum Erscheinen der Banden



**Abb. II.3 Schritte der molekularbiologischen Analyse**

### III. ERGEBNISSE

#### 1. Ergebnisse der Immunhistochemie

Mikrotomschnitte des paraffinegebetteten Gewebes wurden mit den Primärantikörpern PAb1801, DO-7 und einem 1:1-Gemisch aus beiden angefärbt.

Die Anfärbbarkeit mit dem Antikörper zeigt eine Akkumulation von p53 an, die in den meisten Fällen durch eine Mutation im Gen des Proteins bedingt ist. Da die Konzentrierung des Proteins meist im Zellkern erfolgt, findet sich die verstärkte Anfärbung in der Mehrzahl der Fälle ebenfalls im Nukleus. Dies kann gleichzeitig als Indikator für die Spezifität der Färbung gewertet werden. Die Tabelle III.1 gibt die Ergebnisse der Immunhistochemie wieder.

IPN	Tumorhistologie	Lokalisation	Intensität
1	Rektumkarzinoid	n	-
2	VIPom des Pankreas	n	-
3	Ileumkarzinoid	n	-
4	Somatostatinom der Papille	n	-
5	LM eines pulm. Karzinoids	n	-
6	Ileumkarzinoid	n	-
7	Rektumkarzinoid	n	-
8	Appendixkarzinoid	n	-
9	Duodenalkarzinoid	n	-
10	LM eines pulm. Karzinoids	n	-
11	Insulinom des Pankreas	n	-
12	Duodenalkarzinoid	n	-
13	Ileumkarzinoid	n	-
14	Magenkarzinoid	n	-
15	Ileumkarzinoid	n	-
16	Ileumkarzinoid	n	-
17	Ileumkarzinoid	n	-
18	Ileumkarzinoid	n	-
19	Appendixkarzinoid	n	-
20	Gastrinom des Duodenum	n	-
21	Ileumkarzinoid	n	-
22	Insulinom des Pankreas	n	-
23	pulmonales Karzinoid	n	-
24	Ileumkarzinoid	n	-
25	LM eines rekt. Karzinoids	n	-
26	Insulinom des Pankreas	n	-
27	Insulinom des Pankreas	n	-
28	Ileumkarzinoid	n	-
29	pulmonales Karzinoid	n	-
30	Magenkarzinoid	n	-

Tab. III.1 Ergebnisse der Immunhistochemie

Bei jeder Färbung wurden eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt. Ein anaplastisches Schilddrüsenkarzinom diente dabei als Positivkontrolle und normales menschliches Muskelgewebe als negativer Vergleich.

In den Versuchsreihen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Antikörperansätzen festgestellt werden. Alle zeigten bei dem als Positivkontrolle verwandten anaplastischen Schilddrüsenkarzinom eine gleichmäßige, intensive und auf den Zellkern beschränkte Anfärbung. Die Negativkontrollen zeigten in keinem Fall einen Hinweis auf DAB-Farbstoff Anreicherung.

Wie die Tabelle III.1 zeigt, konnte in keinem neuroendokrinen Tumor eine immunhistochemische Kernfärbung nachgewiesen werden. Auch trotz vielfacher Wiederholung der Färbeprozedur ergaben sich in keinem der 30 Neoplasien Hinweise für eine p53 Akkumulation.

Dies geht auch aus den Abbildungen hervor. Abbildung III.1 zeigt exemplarisch einen mit dem Antikörper PAb 1801 angefärbten Gewebeschnitt eines anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms. An den rötlich gefärbten Zellkernen lässt sich die Bindung des Primärantikörpers und somit das Vorhandensein von akkumuliertem p53 Protein erkennen. Im Gegensatz dazu imponieren in Abbildung III.2 Hämalaun-blau gefärbte Nuklei. In diesem Schnitt eines Ileumkarzinoids ist keine Anreicherung von P53 vorhanden.

## **2. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung**

Mit der unter II 3.2 beschriebenen Methodik wurde die DNA jeder Probe isoliert. Die Ausbeute schwankte zwischen 1,1 pmol/µl und 4,9 pmol/µl. Gelelektrophoretisch zeigten die aus Frischgewebe extrahierten Nukleinsäuren einen nur geringen Degradierungsgrad und konnten in allen Fällen ohne weitere Aufarbeitung in die PCR eingesetzt werden.

Die aus Paraffingewebe gewonnene DNA hingegen erwies sich zum Teil als stark fragmentiert. Zusätzlich stellten sich einige Proben photometrisch als proteinkontaminiert dar und konnten in diesen Fällen erst nach weiterer Aufreinigung (DNA Purification Kit, Qiagene) zur weiteren Analyse verwendet werden.

Durch die PCR-SSCP kombinierte Analyse der Exons 5-8 von 30 Patienten mit neuroendokrinen Tumoren konnte in keinem Fall eine Mutation nachgewiesen werden. Keines der untersuchten Amplifikate zeigte eine mutationsverdächtige Veränderung der Laufeigenschaft auf dem Polyacrylamidgel. Auch in mehrfachen Wiederholungen der einzelnen Untersuchungsschritte wurde dies bestätigt.

Die Abbildung III.3 zeigt ein mit Ethidiumbromid angefärbtes Agarosegel, auf welches die Exons 7 und 8 des p53 Gens aufgetragen sind. Rechts auf dem Gel ist der Längenstandard erkennbar.

**Auf der Abbildung III.3 erkennt man ein SSCP-Polyacrylamidgel. In der linken, ersten Spur befindet sich die normale Kontrolle. Die Spuren 2-5 und 7 zeigen keine veränderten p53 Sequenzen. In der Spur 6 ist die Mutation der Positivkontrolle sichtbar.**

#### **IV. DISKUSSION**

Die Ergebnisse der Untersuchungen besagen, daß Alterationen des p53 Tumorsuppressorgens nicht maßgeblich an der Karzinogenese neuroendokriner Tumoren beteiligt sind. Weder mit immunhistochemischen Verfahren noch mit molekularbiologischen Techniken konnten Veränderungen im Gen oder Protein von p53 nachgewiesen werden. Der Befund wirft drei wesentliche Fragen auf, die im Anschluß näher besprochen werden sollen :

1. Können die Ergebnisse durch vergleichbare Studien bestätigt werden?
2. Können methodische Ursachen als Gründe in Frage kommen ?
3. Welche Faktoren sind ursächlich beteiligt an der Karzinogenese neuroendokriner Tumoren ?

Zu 1:

Im Gegensatz zu anderen Tumoren im menschlichen Körper ist die Onkogenese neuroendokriner Tumoren bisher nur wenig untersucht worden. Im Folgenden soll deshalb auf die wichtigsten Studien zum Thema p53 und neuroendokrine Tumoren eingegangen werden.

Eine umfangreiche Publikation, welche v.a. das Verhalten von p53 in Tumoren des Gastroenteropankreatischen Systems und der Lunge beleuchtet, stammt von Wang et al. Sie untersuchten 1995 immunhistochemisch mit dem Primärantikörper DO-7 eine Anzahl von 109 neuroendokrinen Neoplasien, darunter 19 Karzinoide des Darms in unterschiedlicher Lokalisation, 21 endokrine Tumoren des Pankreas und 18 pulmonale Karzinoide [75]. Trotz mehrfacher Wiederholungen konnte nur in einem pulmonalen Karzinoid eine leicht erhöhte Farbstoffanreicherung in verstreut liegenden Zellgruppen dargestellt werden. O'Dowd et al. kamen, ebenfalls 1995, zu einem ähnlichen Ergebnis. Auch sie konnten in keinem der 22 von ihnen untersuchten intestinalen Karzinoide immunhistochemisch eine Akkumulation von p53 feststellen [79]. Sie schlußfolgerten daraus, daß falls p53 in der Genese von DNS-Tumoren eine Rolle spielen sollte, die Natur der Veränderung von der

überwiegenden Mehrzahl der bis jetzt entdeckten Dysfunktionen abweicht und nicht zu einer Anreicherung des Proteins führt.

Beide Autoren geben jedoch zu bedenken, daß ihre Ergebnisse nur auf immunhistochemischen Analyseverfahren beruhen und durch molekularbiologische Untersuchungen zu verifizieren seien.

Diesen Ansatz verfolgten Lohmann et al. Sie studierten 1993 die Molekularbiologie von 40 neuroendokrinen Tumoren des GEP-Systems [74]. Im einzelnen handelte es sich dabei um vier Karzinoide des Magens, zwei Duodenalkarzinoide, 14 neuroendokrine Tumoren des Ileums, vier Appendixkarzinoide, sechs Karzinoide des Zäkums, drei Rektumkarzinoide und sieben endokrine Tumoren des Pankreas. Mit Hilfe von PCR, SSCA („single strand conformation analysis“) und Sequenzanalyse gelang es ihnen nur in einem Fall, eine Mutation darzustellen. Es handelte sich dabei interessanterweise um ein sich klinisch als gutartig darstellendes rektales Karzinoid, bei dem im Kodon 283 eine G/C-Transversion stattgefunden hatte.

Ihre Schlußfolgerung, daß genetische Alterationen in den Exons 5-8 des p53 Gens ein seltenes Ereignis in neuroendokrinen Tumoren darstellen, bestätigt die immunhistochemischen Befunde aus England.

Die Tab. IV.1 faßt die bisherigen Vergleichsstudien zusammen.

Wang et al., 1995	O'Dowd et al., 1995	Lohmann et al., 1993
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunhistochemische Analyse von 21 endokrinen Pankreastumoren, 19 Darmkarzinoiden und 18 Bronchialkarzinoiden</li> <li>• Ergebnis: Fleckenförmige Färbung in einem Bronchialkarzinoid</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunhistochemische Analyse von 22 Darmkarzinoiden</li> <li>• Ergebnis : Kein Hinweis auf p53 Akkumulation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Molekularbiologische Analyse von 7 endokrinen Pankreastumoren und 33 Darmkarzinoiden</li> <li>• Ergebnis : Eine G/C-Transversion in einem benignen Rektumkarzinoid</li> </ul>

Tab. IV.1 p53 in gastrointestinalen Karzinoiden

Pellegata et al. widmeten sich 1994 der Untersuchung von 57 Pankreastumoren, darunter 12 endokrinen Läsionen [80]. Durch PCR und DGGE- („Denaturierende Gradientenelektrophorese“) Analyse der Exons 5-8 des p53 Gens, in denen 97 % aller Mutationen zu finden sind, konnten sie in nur einem endokrinen Tumor eine Veränderung darstellen. Es handelte sich dabei um eine A/G-Punktmutation in einer histologisch atypisch erscheinenden, nicht aber malignen Neoplasie.

Keine Immunreaktivität für p53 konnten Bartz et al. 1996 bei der Untersuchung von u.a. 19 endokrinen Pankreastumoren feststellen [81]. Die Arbeitsgruppe aus Marburg, Berlin und Zürich verwandte dabei den polyklonalen p53 Antikörper CM1, welcher in den als Positivkontrollen mitgeführten Lebertumoren erwartungsgemäß eine p53 Akkumulation anzeigte. Die Ergebnisse der beiden Arbeiten faßt die Tab. IV.2 zusammen.

Pellegata et al., 1994	Bartz et al., 1995
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Molekularbiologische Analyse von 12 endokrinen Pankreastumoren</li> <li>• Ergebnis : Eine Punktmutation in einem Tumor mit histologischen Atypien</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunhistochemische Analyse von 19 endokrinen Pankreastumoren</li> <li>• Ergebnis : p53 Akkumulation nur in den 3 malignen Tumoren</li> </ul>

Tab. IV.2 p53 in endokrinen Pankreastumoren

Auch die p53 Expression in neuroendokrinen Tumoren der Lunge ist bisher vergleichsweise wenig untersucht worden. Wegweisend auf diesem Gebiet ist jedoch die häufig zitierte Arbeit von Barbareschi et al. [82]. Mit dem Ziel, die histologischen und biologischen Aspekte und Zusammenhänge in neuroendokrinen Lungentumoren näher zu beleuchten, untersuchten sie 1992 das Gewebe von 40 chirurgisch resezierten pulmonalen neuroendokrinen Neoplasien. Es befanden sich darunter 14 typische Karzinoide, 10 atypische Karzinoide, 12 Fälle von kleinzelligen Bronchialkarzinomen und vier sog. „borderline“-Tumoren, die histologisch zwischen kleinzelligen Läsionen und den klassischen Karzinoiden stehen.

Sie verwandten dazu Antikörper gegen diverse neuroendokrine Marker (Chromogranin A, Synaptophysin, NSE, u.a.), gegen PCNA („proliferating cell nuclear antigen“), einen Proliferationsmarker, und auch gegen die Tumorsuppressorgene p53 und RB. Sie fanden heraus, daß die Expression neuroendokriner Marker in der Reihenfolge typisches Karzinoid - atypisches Karzinoid - großzelliges/kleinzelliges Bronchialkarzinom abnimmt. Hingegen zeigten sich ausschließlich bei den kleinzelligen Läsionen, darin jedoch in 9 von 12 Fällen, erhöhte intranukleäre p53 Konzentrationen. In keinem typischen oder atypischen Karzinoid hingegen war eine p53 Akkumulation zu entdecken. Daraus zogen Barbareschi et al. den Schluß, daß mit zunehmender Entdifferenzierung des neoplastischen Gewebes vom typischen Karzinoid bis hin zum großzelligen bzw. kleinzelligen Tumor, welche mit einem Verlust an neuroendokrinen Markern einhergeht, die Wahrscheinlichkeit einer Antionkogenläsion ansteigt. Der Übergang zum kleinzelligen Karzinom ist dann häufig mit einem solchen Ereignis verknüpft.

Diese Aussage wird unterstützt durch die Arbeit von Roncalli et al. aus dem Jahre 1992 [83]. In dieser Studie wurden 59 neuroendokrine Tumoren der Lunge (15 typische Karzinoide, 22 atypische Karzinoide und 22 kleinzellige Tumoren) immunhistochemisch mit dem Markerantikörper PAb1801 untersucht. Immunreaktivität konnte in keinem der typischen Karzinoide festgestellt werden. Jedoch zeigte sich eine Farbstoffanreicherung in 10 atypischen Tumoren, hier jedoch vornehmlich in gering differenziertem Material, und in 14 kleinzelligen Neoplasien.

Die gleiche Anzahl von pulmonalen Karzinoiden (26 atypische Karzinoide, 15 großzellige Tumoren und 8 kleinzellige Bronchialkarzinome) wurden 1996 von der Gruppe um Przygodzki aus Rockville, Pittsburgh und Washington, D.C. analysiert [84]. Immunhistochemisch fand sich in keinem der typischen Karzinoide ein Anhalt für eine erhöhte p53 Konzentration. Jedoch zeigte sich in 7 der 26 atypischen Karzinoide eine fokale Farbstoffanreicherung und in 6 Fällen sogar eine fleckenförmige Färbung. In 12 der 15 großzelligen Tumoren und in 7 der 8 kleinzelligen Läsionen fanden sich diffuse Mehraneicherungen des Chromogens. Molekularbiologisch ließen sich interessanterweise jedoch nur in 4 großzelligen Neoplasien und in 4 kleinzelligen Tumoren Veränderungen zeigen.

In einer neueren Arbeit untersuchten Zirbes et al. aus Köln 16 typische und 4 atypische Bronchuskarzinoide mit immunhistochemischen Methoden im Hinblick auf die Expression der Gene p53, Ki67, p21, p27, mdm-2 und bcl-2 bzw. bcl-x [85]. Interessanterweise zeigten sich in keinem der Tumoren Anreicherungen von p53, Ki67, p21, p27 oder mdm-2. Jedoch fand die Gruppe eine erhöhte Expression des

**bcl-2 Proteins in atypischen Karzinoiden und eine Akkumulation von bcl-x in typischen Karzinoiden.**

**Die Tab. IV.3 subsumiert die auf die Untersuchung von Bronchialkarzinoiden ausgerichteten Arbeiten.**

Barbareschi et al., 1991	Roncalli et al., 1992	Przygodzki et al., 1996	Zirbes et al., 1998
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunhistologische Analyse von 40 neuroendokrinen Lungentumoren</li> <li>• Ergebnis: p53 Akkumulation nur in kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachweisbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunhistologische Analyse von 59 pulmonalen Karzinoiden</li> <li>• Ergebnis: Immunreaktivität nur in gering differenzierten atypischen Karzinoiden und in kleinzelligen Karzinomen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunhistologische und molekularbiolog. Analyse von 59 Bronchialkarzinoiden</li> <li>• Ergebnis: p53 Akkumulation bzw. Mutation nur in atypischen gro0- und kleinzelligen Karzinoiden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunhistologische Analyse von 20 Bronchialkarzinoiden</li> <li>• Ergebnis: p53 Akkumulation in keinem Tumor</li> </ul>

Tab. IV.3 p53 in Bronchialkarzinoiden

Die Ergebnisse der angeführten Studien im Hinblick auf die Rolle von p53 in Darmkarzinoiden deckt sich weitgehend mit den von uns gefundenen Hinweisen. Wang et al. und O'Dowd et al. konnten keine erhöhten p53 Konzentrationen in 19 bzw. 22 Darmkarzinoiden nachweisen, und Lohmann fand nur eine genetische Veränderung unter 33 neuroendokrinen Darmtumoren.

Auch in unseren Untersuchungen konnten in 21 bzw. 22 Fällen von intestinalen Karzinoiden keine Alterationen festgestellt werden.

Im Falle der endokrinen Pankreastumoren stimmen die Ergebnisse der aufgeführten Studien ebenfalls mit unseren Analysedaten überein. So konnten Wang et al. und Lohmann et al. unter 21 bzw. 7 solcher Neoplasien keine Veränderungen finden. Und während Pellegata et al. ebenfalls in 12 Tumoren nur eine Alteration aufzeigen konnte, gelang es auch Bartz und Mitarbeitern nicht, einen Hinweis auf eine p53 Akkumulation in 19 endokrinen Pankreastumoren zu finden.

Neuroendokrine Lungentumoren sind durch eine Vielfalt von histologischen Typen gekennzeichnet, wie auch aus der Tab. I.5 ersichtlich wird. Der häufigste Lungentumor, der definitionsgemäß zu den neuroendokrinen Neoplasien gehört, in der Regel jedoch gesondert behandelt wird, ist der kleinzellige Bronchialtumor.

Barbareschi und Mitarbeiter konnten zeigen, daß mit zunehmender Entdifferenzierung in der Reihenfolge typisches Karzinoid - atypisches Karzinoid - großzelliger/kleinzelliger Tumor und dem dadurch bedingten Verlust an neuroendokrinen Markern die Anzahl von Tumoren mit Veränderungen in Onkogenen und Antionkogenen steigt.

Diese Tendenz findet Bestätigung in den Arbeiten von Przygodzki et al. und Roncalli et al., denen es gelang, in einer Zahl atypischer Karzinoide und besonders in groß- und kleinzelligen Tumoren erhöhte p53 Konzentrationen nachzuweisen bzw. genetische Veränderungen aufzuzeigen. Auch diese Erkenntnisse gehen konform mit unseren Befunden, da die von uns untersuchten pulmonalen Tumoren alle eine deutliche und starke Immunreaktivität für die generellen neuroendokrinen Marker zeigten, also dem histologischen Typ eines typischen Bronchialkarzinoids entsprachen. Auch wir konnten an ihnen keine Genveränderungen oder Proteinakkumulation nachweisen.

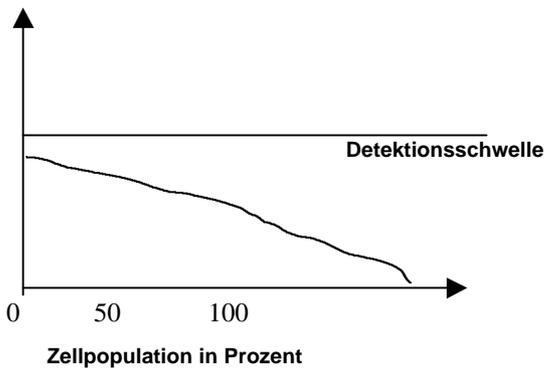
Zu 2:

Wenn man eine Population von Zellen auf ein bestimmtes Merkmal hin untersucht, so kann die Verteilung dieses Merkmals in der Zellpopulation sehr variieren und bedeutsam sein für das Ergebnis einer analytischen Evaluation. In Anlehnung an Hall und Lane soll dies graphisch verdeutlicht werden (Abb. IV.1a-e) [86].

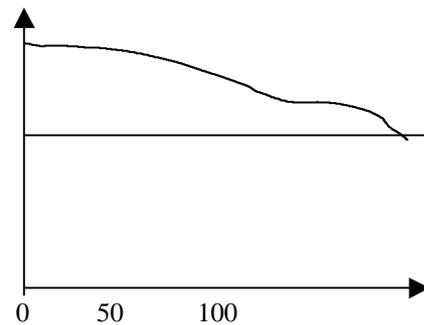
Der gestrichelte waagerechte Strich in den Abbildungen symbolisiert die Schwelle, unterhalb derer die Detektion des Merkmals durch ein bestimmtes Analyseverfahren nicht mehr möglich ist. Sie wird v.a. durch technische Parameter, wie beispielsweise die Sensitivität eines Verfahrens, die Vorbehandlung (Fixierungsmethodiken) und das Alter des Gewebes, die Affinität eines Antikörpers und die Verdünnung, in der er appliziert wird, oder auch Verunreinigungen der Proben bestimmt. So würden in Abb. IV.1a zwar einige Zellen das gesuchte Merkmal aufweisen, jedoch könnte dies nicht erkannt werden, da die Gesamtexpression des Merkmals unterhalb der Detektionsschwelle liegt. Genau der gegenteilige Fall liegt der Abb. IV.1b zu Grunde. Hier präsentieren annähernd alle Zellen das gesuchte Merkmal in einem für die Erkennung ausreichendem Maße. In Abb. IV.1c ist es zu einer Anhebung der Detektionsschwelle gekommen, beispielsweise durch eine für das Verfahren problematische Fixierungsmethode. Dies führt dazu, daß nur noch in einem geringen Anteil der Zellpopulation das Merkmal in einer zur Erkennung ausreichenden Stärke exprimiert wird. Anders ist

die Situation in Abb. IV.1d. Es kommt hier nicht zu einer gleichmäßigen Minderung der Merkmalsexpression, sondern nur eine geringe und sehr spezifische Untergruppe präsentiert das Merkmal ausreichend. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn innerhalb eines Tumors eine Subpopulation zellulärem Streß ausgesetzt wird. Die Antwort ist vermehrte Synthese oder Akkumulation von gegenregulativen Substanzen, z.B. des p53 Proteins. In einer immunhistochemischen Analyseverfahren könnte sich dies in einer fleckenförmigen Farbstoffanreicherung widerspiegeln. In einem molekularbiologischen Untersuchungsgang hingegen könnte es sich in einem positiven oder negativen Ergebnis niederschlagen, in Abhängigkeit von der Sensitivität der Methodik. Schließlich gibt es noch die Möglichkeit IV.1e. Hier ist die Detektionsschwelle gesunken, beispielsweise durch eine Vorbehandlung der Proben, welche zu einer Demaskierung des untersuchten Merkmals geführt hat.

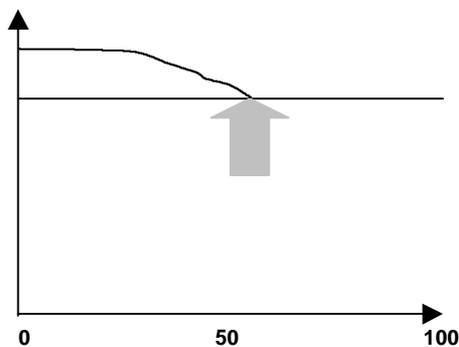
P53 Expression



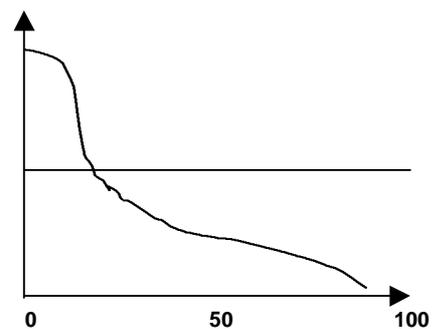
IV.1 a



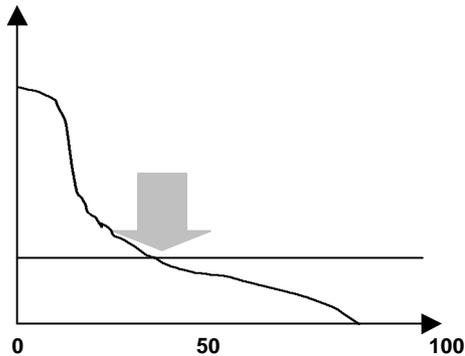
IV.1 b



IV.1 c



IV.1 d



#### IV.1 e

Abb. IV.1a-e Evaluation eines Merkmals in einer Zellpopulation

Überträgt man dieses theoretische Modell auf die Praxis, so müssen folgende Punkte Erwähnung finden :

- Der Einfluß von Fixierungsmethoden

Es gibt eine Reihe verschiedener Lösungen und Anleitungen, nach denen Gewebe fixiert werden kann, bevor es in Paraffin eingebettet wird. Die unterschiedlichen Techniken zeichnen sich jedoch durch große Unterschiede in ihrem Einfluß auf die Integrität der Zellbestandteile aus. Die Wirkung unterschiedlicher Fixierungsprotokolle auf die Intaktheit der DNA und auf ihre Verwendung in der Polymerasekettenreaktion untersuchten Greer et al. 1991 [87]. Dazu behandelten sie Anteile von zwei verschiedenen, frisch gewonnenen Zervixresektaten für jeweils 1, 4 und 24 Stunden mit insgesamt 12 voneinander abweichenden Fixierungslösungen. Anschließend extrahierten sie die DNA aus den unterschiedlich behandelten Gewebeproben, trugen sie auf ein Agarosegel auf und färbten die DNA nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid. Daraufhin verwandten sie 10µl der isolierten DNA zur Amplifikation fünf verschieden langer Abschnitte (110bp, 268bp, 536bp, 989bp und 1.327bp) des  $\beta$ -Globin Gens. Die in der

Zusammensetzung der Lösungen und der Einwirkzeit variierenden Fixierungsbedingungen schlugen sich in stark voneinander abweichendem Erfolg der PCR nieder. So konnte beispielsweise für 10% BNF (10% Formalin, 75 mmol/l NaPhosphat, pH 6,7) gezeigt werden, daß unabhängig von der Einwirkzeit des Fixatives, alle Abschnitte des  $\beta$ -Globin Gens amplifiziert werden konnten. Im Gegensatz dazu konnte nach der Verwendung von Bouin's Lösung (71% ges. Pikrinsäure, 24% Formalin, 5% Azetat, pH 1,39) nur der 110 bp lange  $\beta$ -Globin Genabschnitt amplifiziert werden und auch nur nach einstündiger Einwirkzeit.

Diese Ergebnisse verdeutlichen sehr gut, daß die Wahl der Fixierungstechnik einen entscheidenden Einfluß hat auf die Intaktheit der DNA und damit ihrer Eignung zur molekularbiologischen Analyse. Eine unzureichende Konservierungstechnik kann durch den nicht ausreichend unterbundenen Degradierungsprozeß der DNA diese für eine weitere Untersuchung, v.a. von kurzen Sequenzen, ungeeignet werden lassen.

Auch für immunhistochemische Untersuchungen an archiviertem Material ist die Wahl der Fixierungsmethodik und die Länge der Einwirkzeit von großer Bedeutung. Verdeutlicht wurde dies von Fisher et al. [88]. Sie betrachteten die Effekte von sechs verschiedenen Fixationsverfahren und ihren Einfluß auf die Immunreaktivität mit dem anti-p53 polyklonalen Antikörper CM-1. Ihre bemerkenswerten Resultate waren, daß die Färbung von Gewebeschnitten des gleichen Tumors nach Behandlung mit einem bestimmten Präservationsverfahren (z.B. Phenol-Formol-Saline für 4 Stunden bei Raumtemperatur) zu einer starken nukleären Immunreaktivität führen kann, während sich mit einer anderen Technik (z.B. Formol-Calcium für 1,5 Stunden bei 55°C) ein negatives Ergebnis oder eine rein zytoplasmatische Anfärbung (Formol-Saline für 1,5h bei 55°C) ergab. Variierende Fixierungstechniken scheinen also die Antigenizität des p53 Proteins verschieden gut zu konservieren.

- Andere Faktoren, die die Intaktheit des Gewebes beeinflussen

Die Länge der Lagerung von fixiertem Paraffingewebe hat ebenfalls einen Einfluß auf das Auskommen der Untersuchungen. Wie von Goelz et al. dargestellt, rangiert die Größe der DNA von bis zu fünf Jahre altem Paraffinmaterial zwischen 100 und über 10.000 bp, mit einem Schwerpunkt zwischen 100 bp und 1500bp [89]. Diese Variationsbreite wird durch mindestens zwei Faktoren verursacht. Zum einen spielt die Zeit zwischen der chirurgischen Entfernung von Tumormaterial und dem

Beginn der Fixierung einer Rolle. Je länger das Material in unbehandeltem Zustand verweilt, desto einflußreicher werden einsetzende autolytische Prozesse. Ein anderer Punkt ist die unterschiedliche Aktivität von endogenen Nukleasen bzw. im Falle der Immunhistochemie der intrazellulären Proteasen in verschiedenen Geweben.

Die Länge der Zeit zwischen dem Konservieren des Tumors und dem Beginn der Untersuchungen am Material spielt zudem eine erwähnenswerte Rolle. Wie Goelz et al. berichten, zeigen sich bereits Unterschiede in der Fragmentgröße der DNA zwischen bis zu drei Jahre altem Gewebe und vier bis sechs Jahre altem Material.

- Weitere möglichen Fehlerquellen

Es gibt eine Reihe weiterer Faktoren, welche in Bezug auf die mögliche Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse Erwähnung finden sollten.

Eine Reihe von Gründen ist beschrieben worden, die dazu führen können, daß das p53 Protein in erhöhter intrazellulärer Konzentration vorliegt, ohne daß eine Veränderung in der Genstruktur dafür verantwortlich ist. So reagiert die Zelle beispielsweise mit einer physiologischen Akkumulation des Proteins auf äußere Streßfaktoren, wie beispielsweise UV-Licht. Die dadurch erhöhte Halbwertszeit kann dann der Grund für eine stärkere Immunreaktivität sein. Einer Stabilisierung des p53 Proteins können jedoch auch andere Mechanismen zu Grunde liegen. Der in diesem Sinne am besten bekannte Faktor ist das große T-Antigen des SV 40. Wie bereits angesprochen geht dieses eine Bindung mit p53 ein und verhindert seinen proteolytischen Abbau. Auch das mdm-2 Protein stabilisiert p53. So kann z.B. eine Überexpression von mdm-2 eine Erhöhung der Immunreaktivität mit p53 Antikörpern verursachen. Auch können Veränderungen im Ubiquitin-Abbauweg des Proteins zu einer veränderten Halbwertszeit führen, wie von Ciechanover et al. 1991 beschrieben wurde [90].

Hingewiesen werden sollte auch auf die Möglichkeit, daß Mutationen, die auf Loci außerhalb des untersuchten Bereichs der DNA (Exons 5-8 bei p53) liegen, nicht erfaßt werden können. Veränderungen dieser Art sind sicherlich selten, aber v.a. Mutationen in den Exon 4 und 9 wurden bereits mehrfach beschrieben. Auch müssen genetische Veränderungen nicht notwendigerweise zu einer Stabilisierung des Proteins und damit verlängerten Halbwertszeit führen. So kann beispielsweise die Generation eines Stopkodons durch eine Punktmutation in einem frühen Exon

zur Entstehung einer weder molekularbiologisch noch immunhistochemisch nachweisbaren Veränderung führen.

Des Weiteren sollte die Möglichkeit eines rein methodischen Fehlers evaluiert werden. Es existiert hier eine Vielzahl von Bereichen, in denen diese auftreten können. Erwähnt werden soll nur beispielhaft eine fehlerhafte Verdünnung des Primärantikörpers, der Gebrauch einer nicht mehr funktionsfähigen Lösung oder auch ein technischer Defekt in einem der verwendeten Geräte.

Betrachtet man die Vielfalt der Einflußgrößen auf das Untersuchungsergebnis, so erscheint es schwierig, diese komplett auszuschließen. Jedoch sind hier zwei wichtige Punkte zu nennen. Zum einen wurde jeder durchgeführte Schritt auf mögliche unterlaufene Fehler hin analysiert (s. auch Material und Methoden). Waren diese aufgetreten, so wurde der Untersuchungsgang wiederholt und gegebenenfalls das Protokoll geändert. Zum anderen wurden stets sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen mitgeführt und ausgewertet. Waren Proben für eine Analyse nicht geeignet, so lagen in der Regel weitere Gewebeanteile des gleichen Tumors vor, auf die ausgewichen werden konnte. Insgesamt scheint es also unwahrscheinlich, daß ein methodischer Fehler die Analyse beeinflußt hat. Nicht auszuschließen ist natürlich die Möglichkeit, daß Gewebeveränderungen vorlagen, die den Analyseverfahren nicht zugänglich waren. Jedoch müßten diese sowohl den immunhistochemischen als auch den molekularbiologischen Methodiken entgangen sein. Eine posttransskriptionelle Stabilisierung der p53 Proteins durch eine andere Ursache als eine genetische Veränderung hätte sich beispielsweise zwar in einem negativen Ergebnis der SSCP niedergeschlagen, jedoch wäre die Immunhistochemie positiv ausgefallen. Eine „nonsense“-Mutation, welche einen Abbruch der Transkription bewirken und die Expression des p53 Proteins verhindern kann, wäre immunhistochemisch nicht nachweisbar. Jedoch hätte sie mit der SSCP aufgedeckt werden können.

Die Möglichkeit einer Alteration, die von zwei unterschiedlichen Verfahren nicht zum Vorschein gebracht werden kann, ist also vergleichsweise gering. Dies findet sicherlich darin Bestätigung, daß die von uns erzielten Ergebnisse mit der Mehrzahl der vergleichbaren Publikationen im Einklang stehen.

In diesem Sinne soll abschließend die Karzinogenese neuroendokriner Tumoren besprochen werden.

Zu 3:

In verschiedenen menschlichen Tumoren konnte die Expression aktivierter Onkogene demonstriert oder eine funktionelle Modifikation von Antionkogenen nachgewiesen werden und in einigen Fällen ein Bezug zur Prognose gestellt werden. Jedoch mit Ausnahme von kleinzelligen Bronchialtumoren und einigen intrazerebralen Neoplasien ist die Karzinogenese von neuroendokrinen Tumoren wenig untersucht. Während die auf p53-Veränderungen konzentrierten Publikationen bereits beleuchtet wurden, soll hier nun auf die Ergebnisse einiger, die Onkogenese großflächiger untersuchenden Arbeiten eingegangen werden.

1991 untersuchten Roncalli und Mitarbeiter die Onkogenexpression mit Antikörpern gegen *c-myc*, *L-myc*, *N-myc* und *c-erbB-2* an insgesamt 143 verschiedenen neuroendokrinen Tumoren von Lunge, Schilddrüse und Nebenniere [91]. Deutliche Immunreaktivität konnte für *c-erbB-2* in knapp 50 Prozent der kleinzelligen Lungentumoren und Phäochromozytome und in etwa einem Drittel der atypischen Bronchialkarzinome gefunden werden. Erhöhte Konzentrationen von *c-myc* zeigten 56% der kleinzelligen Lungenkarzinome und 50% der medullären Schilddrüsentumoren. *N-myc* wurde in 57% der medullären Schilddrüsenkarzinome und in 25% der kleinzelligen Bronchialkarzinome erhöht gefunden, während *L-myc* in knapp 50% der untersuchten Phäochromozytome akkumuliert war.

Wang et al. stellten 1997 fest, daß 63% der von ihnen untersuchten neuroendokrinen Tumoren von Lunge und Gastrointestinaltrakt immunreaktiv für *c-myc* waren. 28% der Neoplasien wiesen eine erhöhte Konzentration von *bcl-2* auf. *C-erbB-2* konnte in 31% der Tumoren nachgewiesen werden, *c-erbB-3* in 6% und *c-jun* in 23% der Geschwülste. Jedoch bestand keine erkennbare Übereinstimmung zwischen der Onkogenexpression und dem Malignitätsgrad des Tumors [92].

Evers und Mitarbeiter aus Texas konnten 1994 zeigen, daß Alterationen des *neu*-Onkogens, nicht jedoch von p53 oder dem *ras*-Onkogen, eine häufige Erscheinung in pankreatischen Gastrinomen sind. Eine 2 bis 12 - fache Amplifikation konnte in allen der 12 untersuchten Geweben demonstriert werden [93]. Höfler und Mitarbeiter evaluierten 1988 die Expression der Onkogene *Ha-ras*, *Ki-ras*, *fos*, *c-myc*, *N-myc* und *sis* in endokrinen Pankreastumoren. Sie stellten dabei fest, daß die mRNA von *Ha-ras* und *Ki-ras* in allen Tumoren in erhöhter Konzentration vorlag. In metastasierten Tumoren war die gemessene Menge 2 bis 6 - fach höher als in nicht metastatischen Neoplasien [94].

Einen anderen Ansatz verfolgten H. Ahlmann und Mitarbeiter aus Göteborg. Sie untersuchten die Expression von Wachstumsfaktoren in neuroendokrinen

Tumorgewebe, darunter Darmkarzinoide, Phäochromozytome und Paragangliome, und konnten zeigen, daß eine Vielzahl unterschiedlicher Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren exprimiert wurden. EGF $\alpha$  und sein Ligand TGF $\alpha$  beispielsweise konnten in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden, wohingegen IGF-1 nur in 40% der studierten Mitteldarmkarzinoide entdeckt und der PDGF-Rezeptor ebenfalls vor allem in Karzinoiden des Mitteldarms detektiert werden konnte. Des Weiteren konnten beide Isoformen des TGF- $\beta$  in den intestinalen Karzinoiden gefunden werden, während der Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) auch in den Phäochromozytomen nachweisbar war. In der gleichen Studie war auch eine hohe Expression des Zelladhäsionsmoleküls NCAM in sechs von acht dahingehend untersuchten Karzinoiden zu demonstrieren [95].

Die aufgezeigten Untersuchungsergebnisse demonstrieren die Beteiligung von Wachstumsfaktoren in der Regulation des neuroendokrinen Tumorwachstums. Da von den Tumoren in der Mehrzahl der Fälle nicht nur einer, sondern eine ganze Reihe von Wachstumsfaktoren gebildet wurden, bleibt die genaue Rolle, die von den „growth factors“ in der Genese der neuroendokrinen Neoplasien eingenommen wird, schwer zu interpretieren.

Die Inzidenz von Onkogenalterationen und Wachstumsfaktoren variiert, wie gesehen, beträchtlich zwischen den verschiedenen Neoplasien mit neuroendokriner Differenzierung. Dies legt den Schluß nahe, daß die Transformation von äußeren Faktoren, denen die verschiedenen Gewebe in unterschiedlichem Maße ausgesetzt sind, beeinflusst wird.

Ansatzweise scheint das von Fearon und Vogelstein (s. Abb. IV.2) publizierte Modell zur Karzinogenese von Kolorektalkarzinomen auf neuroendokrine Tumoren übertragbar zu sein [96].

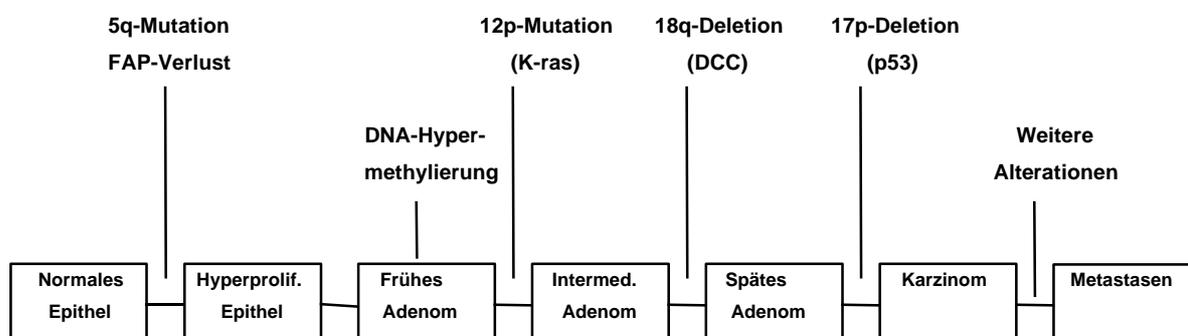


Abb. IV.2 Sequenzmodell zur Entstehung kolorektaler Karzinome (Vogelstein et al.)

So konnte an Insulinomen demonstriert werden, daß benigne Läsionen eine im Vergleich zum normalen Pankreasgewebe erhöhte Konzentration von TGF- $\alpha$  und dem EGF-Rezeptor aufweisen. In malignen Insulinomen treten zusätzlich Punktmutationen im K-*ras* Onkogen und im p53-Gen auf. Pavelic et al. fassen dies mit der folgenden Abbildung zusammen [97].

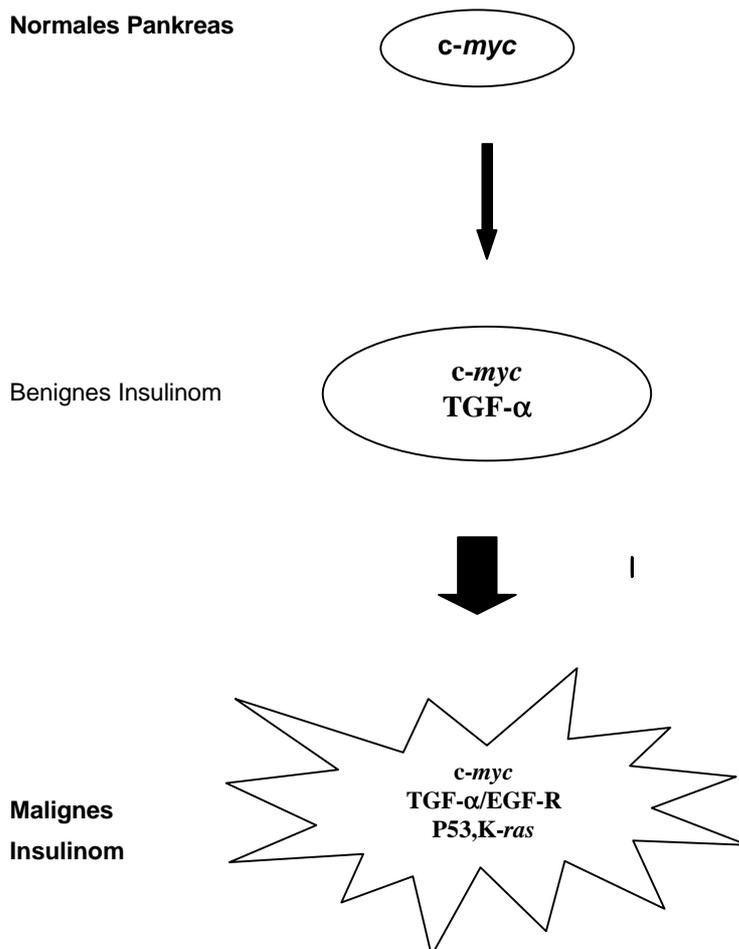


Abb. IV.3 Modell zur Entstehung von Insulinomen (Pavelic et al.)

Auch in neuroendokrinen Tumoren der Lunge lassen sich mit zunehmendem Verlust der Differenzierung vermehrt Onkogen- und Suppressorgenalterationen nachweisen. Zirbes et al. fanden zudem im Vergleich zwischen typischen und atypischen Bronchialkarzinoiden steigende Konzentrationen des Apoptose-inhibierenden Proteins bcl-2 in den atypischen Karzinoiden [85]. Sie schlugen den

Verlust von differenziertem zellbiologischem Verhalten und damit eine erhöhte Aggressivität des Gewebes als zugrundeliegende Ursache vor.

In der Studie von Wang und Mitarbeitern zeigte sich bei Darmkarzinoiden eine Assoziation zwischen erhöhter Expression von *c-myc* und *bcl-2*. Da erst kürzlich demonstriert werden konnte, daß eine verstärkte *c-myc* Expression neben einer Proliferationsinduktion auch eine Apoptose einleiten kann, *bcl-2* jedoch einen Apoptoseschutz der Zelle darstellt, könnte die Transformation auf einer Störung des Apoptoseweges der Zelle beruhen. Anstelle einer Induktion des Zelltodes könnte *c-myc*, da dieser Effekt durch die überhöhte *bcl-2* Expression blockiert ist, eine verstärkte Proliferation bewirken.

Abschließend sei noch eine Arbeit von Buchanan et al. erwähnt [98]. Die Gruppe untersuchte kürzlich die Immunreaktivität des Brustkrebs-assoziierten Proteins pS2 in 236 neuroendokrinen Tumoren. Die Funktion des erst seit kurzer Zeit bekannten Proteins ist noch wenig geklärt. Vermutet wird eine Beteiligung an Reparationsmechanismen der gastrointestinalen Mukosa sowie eine Wachstumsfaktor-ähnliche Aktivität [99]. In Mammakarzinomen ist die Expression des 6.45-kDa pS2 Proteins korreliert mit dem Vorhandensein von Östrogenrezeptoren [100]. Während das Protein in normalem menschlichen Gewebe nicht nachgewiesen werden kann, konnte es bereits in einer Vielzahl humaner Neoplasien entdeckt werden [101]. Buchanan und Mitarbeiter fanden eine pS2 Immunreaktivität in 36% der untersuchten Bronchialkarzinoide, in 31% der pankreatischen neuroendokrinen Tumoren, in 60 % der Magenkarzinoide, in 55% der Ileumkarzinoide, in 23% der Appendixkarzinoide und in 86% der Rektumkarzinoide. Die Ergebnisse lassen eine Beteiligung von pS2-Alterationen an der Genese oder Progression neuroendokriner Neoplasien vermuten und sollten Basis weiterer Untersuchungen sein.

Es ist also zu festzustellen, daß die bisherigen Daten nur einen ersten Schritt im Verständnis der Transformation neuroendokriner Zellen darstellen. Die vielen verschiedenen Untersuchungsergebnisse lassen die Erstellung eines Genesemodells vergleichbar mit der Vogelsteinsequenz der Kolorektalkarzinome noch nicht zu. Die molekularen Grundlagen der neuroendokrinen Tumorentstehung bleiben also weiterhin klärungsbedürftig.

## **V. Literaturverzeichnis**

1. Rous, P: Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *JAMA* 11 (1983) 1445
2. Weinberg, RA: Oncogenes, Antioncogenes, and the Molecular Bases of Multistep Carcinogenesis. *Cancer Research* 49 (1989) 3713
3. Bourne, HR, Varmus, HE et al.: Oncogenes and cell proloferation. *Curr Opin Genet Dev* 2 (1992) 1
4. Ullrich, A, Schlessinger, J et al.: Signal Transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61 (1990) 203
5. Gullick, WJ: The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erb-B2 protein in breast cancer. *Int J Cancer Suppl.* 5 (1990) 55
6. Spector, DH, Varmus, HE, Bishop, JM et al.: Nucleotide seyuences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 75 (1978) 4102
7. Hunter, T: Cooperation between Oncogenes. *Cell* 64 (1991) 249
8. Cantley, LC, Auger, Soltloff, S et al.: Oncogenes and Signal Transduction. *Cell* 64 (1991) 281
9. Rudolph, B, Saffrich, R, Eilers, M et al.: Activation of cyclin-dependent kinases by Myc mediates induction of cyclin A, but not apoptosis. *EMBO* 15 (1996) 3065
10. Knudson, A: Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 1914
11. Goodrich, DW, Wang, NP, Lee, WH et al.: The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 67 (1991) 293
12. Haber, DA, Housman, DE: The genetics of Wilms' tumor. *Adv Cancer Res* 59 (1992) 42
13. Rauscher, FJ: The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB J* 7 (1993) 896
14. Li,Y, Bollag, G, Robertson, M: Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in human tumors. *Cell* 69 (1992) 275
15. Fearon, ER, Nigro, JM, Vogelstein, B: Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancer. *Science* 247 (1990) 49
16. Bodmer, WF, Bailey, CJ, Spurr, NK et al.: Localisation of the gene for familial adnenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328 (1987) 614
17. Hollstein, M, Sidransky, D, Vogelstein, B et al.: p53 Mutations in Human Cancer. *Science* 5 (1991) 49
18. Linzer, D, Levine, AJ: Characterization of a 54K Da Cellular SV 40 Tumor Antigen Present in SV-40-Transformed Cells and Uninfected Embryonal Carcinoma Cells. *Cell* 17 (1979) 43
19. Prives, C: How loops, beta sheets, and alpha helices help us to understand p53. *Cell* 78 (1994) 543
20. Lamb, P, Crawford, L: Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 6 (1986) 1379
21. Bienz-Tadmor, B, Zakut-Houri, L, Oren, M et al.: The 5' Region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. *EMBO J* 4 (1984) 3209
22. Reisman, D, Greenberg, M, Rotter, V et al.: Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (1988) 5146
23. Lozano, G, Levine, AJ: Tissue-specific expression of p53 in transgenic mice is regulated by intron sequences. *Mol Carcinog* 4 (1991) 3
24. Oren, M, Bienz, B, Zakut, R et al.: Analysis of recombinant DNA clones specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *EMBO J* 2 (1983) 1633

25. Addison, C, Jenkins, JR, Sturzbecher, HW et al.: The p53 nuclear localization signal is structurally linked to p34cdc2 kinase motif. *Oncogene* 5 (1990) 423
26. Sturzbecher, HW, Maimets, T, Chumakov, P et al.: p53 interacts with p43cdc2 in mammalian cells: implication for cell cycle control and oncogenesis. *Oncogene* 5 (1990) 795
27. Soussi, T, Caron de Frommelt, C, May, P et al.: Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5 (1990) 945
28. Fields, S, Jang, SK: Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249 (1990) 1046
29. Foord, OS, Bhattacharya, P, Rotter, V et al.: DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild-type p53 protein. *Nucleic Acid Res* 19 (1991) 5191
30. Maltzmann, W, Czyzyk, L: UV radiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 4 (1984) 1689
31. Livingstone, LR, White, J, Tlsty, TD et al.: Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70 (1992) 923
32. Yonish-Rouach, ED, Oren, M: Wild-type p53 includes apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352 (1991) 345
33. Miyashita, T, Reed, JC: Tumor Suppressor p53 is a direct activator of the human bax gene. *Cell* 80 (1995) 293
34. Hupp, TR, Lane, DP: Regulation of the specific binding function of p53. *Cell* 71 (1992) 875
35. El-Deiry, WS, Tokino, T, Velculescu, VE et al.: WAF-1, a potential mediator for p53 tumor suppression. *Cell* 75 (1993) 817
36. Kastan, MB, Zhan, Q, El-Deiry, WS et al.: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia telangiectasia. *Mol Cell Biol* 10 (1990) 5914
37. Otto, A, Deppert, W: Upregulation of mdm-2 expression in meth A tumor cells tolerating wild-type p53. *Oncogene* 8 (1993) 2591
38. Margulies, L, Sehgal, PB: Modulation of the human interleukin-6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 7605
39. Chin, KV, Gottesmann, MM: Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by ras and p53. *Science* 255 (1992) 459
40. Seto, E, Zambetti, GP: Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 12028
41. Weibker, SN, Deppert, W: Specific and complex interactions of murine p53 with DNA. *Oncogene* 7 (1992) 1921
42. Levine, AJ: The tumor suppressor genes. *Ann Rev Biochem* 62 (1993) 623
43. Kao, CC, Yew, PR, Berk, AJ et al.: Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus E3B 55K proteins. *Virology* 179 (1990) 806
44. Huibregste, JM, Scheffner, M, Howley, PM et al.: A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein on human papillomavirus types 16 of 18. *EMBO J* 13 (1991) 4129
45. Szekely, I, Selivanova, S, Wiman, KG et al.: EBNA-5, and Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the rb and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 5455
46. Yehieley, F, Oren, M: The gene for the rat heat-shock cognate, hsc 70, can suppress oncogene-mediated transformation. *Cell Growth & Differentiation* 3 (1992) 803
47. Oliner, JD, Kinzler, KW, Vogelstein, B et al.: Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358 (1992) 80
48. Seto, E, Zambetti, GP: Wild-type p53 binds to TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 12028

49. Agoff, SN, Wu, B: Regulation of human hsp70 promoter by p53. *Science* 259 (1993) 84
50. Maheswaran, S, Park, S, Bernard, A et al.: Physical and functional interactions between wt1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 5100
51. Hupp, TR, Lane, DP: Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 71 (1992) 875
52. Milne, DM, Palmer, RH, Meek, DW et al.: Mutation of the casein kinase II phosphorylation site abolishes the antiproliferative function of p53. *Nucleic Acid Res* 20 (1992) 5565
53. Anderson, CW, Samad, A, Carroll, RB et al.: Identification and characterization of the sites phosphorylated in the cellular tumor antigen p53 from SV40 transformed 3T3 cells and in the DNA-binding protein from adenovirus 2. *Cancer Cells* 4 (1986) 395
54. Fiscella, M, Ullrich, SJ, Zambrano, M et al.: Mutation of the serine15 phosphorylation site of human p53 reduces the ability of p53 to inhibit cell-cycle progression. *Oncogene* 8 (1993) 1519
55. Zhang, W, Deisseroth, AB: Hyperphosphorylation of p53 induced by okadaic acid attenuates its transcription activation function. *Cancer Res* 54 (1994) 4448
56. Heinaut, P, Milner, J: Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro. *Cancer Res* 53 (1993) 4469
57. Tarunina, M, Jenkins, JR: Human p53 binds DNA as a protein homodimer but monomeric variants retain full transcription and transactivation activity. *Oncogene* 8 (1993) 3165
58. Takahashi, K, Ono, T: Protein-synthesis dependent catoplasmatic translocation of p53 protein after serum stimulation of growth-arrested MCF-7 cells. *Mol Carcinogen* 8 (1993) 58
59. Shaulsky, G, Rotter, V: Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* 5 (1990) 1707
60. Casey, G, Vogelstein, B: Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild type p53 gene. *Oncogene* 6 (1991) 1791
61. Mori, N, Yokota, J, Oshimura, M et al.: Concordant deletions of chromosome 3p and loss of heterozygosity for chromosomes 13 and 17 in small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 49 (1989) 5130
62. Reihnsaus, E, Oren, M: Regulation of the level of the oncoprotein p53 in non-transformed and transformed cells. *Oncogene* 5 (1990) 137
63. Milner, J, Watson, JV: Addition of fresh medium induces cell cycle and conformation changes in p53, a tumor suppressor protein. *Oncogene* 5 (1990) 1683
64. Vogelstein, B: Cancer: A deadly inheritance. *Nature* 348 (1990) 681
65. Hsu, IC, Harris, CC: Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Nature* 350 (1991) 427
66. DeLellis, RA, Tischler, AS: The Dispersed Neuroendocrine System in: Kovacs, K, Asa, S (eds.): *Functional Endocrine Pathology*, chapter 18, Vol. 1, Blackwell, Boston, (1988)
67. Kameya, T, Yamaguchi, K: The Endocrine Lung in: Kovacs, K, Asa, S (eds.): *Functional Endocrine Pathology*, chapter 18, Vol. 1, Blackwell, Boston, (1988)
68. Lechago, J, Shah, IA: The Endocrine Digestive System in: : Kovacs, K, Asa, S (eds.): *Functional Endocrine Pathology*, chapter 18, Vol. 1, Blackwell, Boston, (1988)
69. Modlin, IM, Sandor, A: An Analysis of 8305 Cases of Carcinoid Tumors. *Cancer* 79 (1997) 813
70. Oberndorfer, S: Karzinoide Tumoren des Dünndarms. *Frankf Z Path* 1 (1907) 426
71. Williams, ED, Sandler, M: The Classification of Carcinoid Tumors. *Lancet* 1 (1963) 238
72. Capella, C, Heitz, PU, Klöppel, G et al.: Revised Classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. *Virchows Archiv* 425 (1995) 547
73. Mack, DH, Laimins, LA: A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with API to activate the expression of human papillomavirus 18 in squamous epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:9102-9106.

74. Lohmann, DR, Häupel, S, Höfler, H et al.: Identification of p53 gene mutations and pancreatic carcinoids by nonradioisotopic SSCA. *Virchows Archiv* 64 (1993) 293
75. Wang, DG, Johnston, CF, Buchanan, KD et al.: Overexpression of the tumour suppressor gene p53 is not implicated in neuroendocrine tumour carcinogenesis. *J Pathol* 175 (1995) 397
76. Bourne, JA: *Handbuch der Immunperoxidase Färbemethoden*. Immunohistochemistry Laboratory, DAKO Corporation
77. Resnick, JM, Cherwitz, D, Niehans, GA et al.: A microwave method that enhances detection of aberrant p53 expression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Arch Pathol Lab Med* 119 (1995) 360
78. Saiki, JR, Mullis, KB, Arnheim, N et al.: Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230 (1985) 1350
79. O'Dowd, G, Gosney, JR: Absence of overexpression of p53 protein by intestinal carcinoid tumours. *J Pathol* 175 (1995) 403
80. Pellegata, NS, Sassa, F, Ranzani, GN et al.: K-ras and p53 Gene Mutations in Pancreatic Cancer: Ductal and Nonductal Tumors through different Genetic Lesions. *Cancer Research* 54 (1994) 1556
81. Bartz, C, Wiedenmann, B, Moelling, K et al.: p53 Tumour suppressor gene expression in pancreatic neuroendocrine tumour cells. *Gut* 38 (1996) 403
82. Barbareschi, M, Girlando, S, Doglioni, C et al.: Tumour suppressor gene products, proliferation, and differentiation markers in lung neuroendocrine neoplasms. *J Pathol* 166 (1992) 343
83. Roncalli, M, Viale, G, Coggi, G et al.: Abnormal p53 Expression in Lung Neuroendocrine Tumors. *Diagn Mol Pathol* 1 (1992) 129
84. Przygodzki, RM, Finkelstein, SD, Travis, WD et al.: Analysis of p53, K-ras-2, and C-raf-1 in Pulmonary Neuroendocrine Tumors. *Am J Pathol* 148 (1996) 1531
85. Zirbes, TK, Lorenzen, J, Dienes, HP et al.: Apoptosis and expression of bcl-2 protein are inverse factors influencing tumour cell turnover in primary carcinoid tumours of the lung. *Histopathol* 33 (1998) 123
86. Lane, DP, Hall, PA: p53 in Tumour Pathology: Can We Trust Immunohistochemistry? - Revisited! *J Pathol* 172 (1994) 1
87. Greer, CE, Peterson, SL, Manos, MM et al.: PCR Amplification from Paraffin-Embedded Tissues. Effects of Fixative and Fixation Time. *AJCP* 95 (1991) 117
88. Fisher, CJ, Gillett, CE, Millis, RR et al.: Problems with p53 immunohistochemical staining: the effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br J Cancer* 69 (1994) 26
89. Goelz, SE, Hamilton, SR, Vogelstein, B et al.: Purification of DNA from Formaldehyde Fixed and Paraffin-Embedded Human Tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 130 (1985) 118
90. Ciechanover, A, DiGiuseppe, JA, Brodeur, GM et al.: Degradation of a nuclear oncoprotein by the ubiquitin system in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 138
91. Roncalli, M, Springall, DR, Coggi, G et al.: Oncoprotein Immunoreactivity in Human Endocrine Tumours. *J Pathol* 163 (1991) 118
92. Wang, DG, Johnston, CF, Buchanan, KD et al.: Oncogene Expression in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. Implications for Pathogenesis. *Cancer* 80 (1997) 670
93. Evers, BM, Thomson, JC: Gastrinomas demonstrate amplification of the HER-2/neu Proto-oncogene. *Ann Surg* 219 (1994) 596
94. Höfler, H, Ruhri, C, Hauser, H et al.: Oncogene expression in endocrine pancreatic tumors. *Virchows Archiv* 55 (1988) 355
95. Ahlmann, H, Wängberg, MD, Nilsson, O et al.: Growth Regulation in Carcinoid Tumors. *Endocrinol Metab Clin North America* 22 (1993) 889
96. Vogelstein, B, Fearon, ER: A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61 (1990) 759

97. Pavelic, K, Hrascan, R, Cabrijan, T et al.: Multiple Genetic Alterations in Malignant Metastatic Insulinomas. *J Pathol* 177 (1995) 395
98. Buchanan, KD, Wang, DG, Sloan, JM et al.: Expression of a Breast-Cancer-Associated Protein (pS2) in Human Neuro-Endocrine Tumours. *Int J Cancer Pred Oncol* 74 (1997) 270
99. Rio, MC, Chenard, MP, Wolf, C et al.: Specific expression of the pS2 gene in sub-classes of breast-cancer in comparison with expression with the estrogen and progesterone receptors and the oncogene ERB B2. *Proc Nat Acad Sci USA* 84 (1987) 9243-9247
100. Rio, MC, Chenard, MP, Wolf, C et al.: Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosa ulceration of the digestive tract. *Gastroenterology* 100 (1991) 375-379
101. Lefebvre, O, Chenard, MP, Masson, R et al.: Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* 274 (1996) 259-262

## **DANKSAGUNGEN**

**Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. C. E. Broelsch für die großzügige Bereitstellung der Forschungseinrichtungen der Chirurgischen Klinik der Universität Hamburg.**

**Frau Prof. Dr. med. A. Frilling für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit, ihre Hilfe in technischen und wissenschaftlichen Fragen und ihre konstruktive Kritik.**

**Frau Dr. med. A. Stenger für ihre ständige Gesprächsbereitschaft und ihre wertvolle Unterstützung in wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen.**

**Herrn Prof. Dr. rer. nat. V. Kalinin für seine Beratung in molekularbiologischen Fragen.**

**Herrn Prof. Dr. med. R.P. Henke für die Durchsicht der immunhistochemischen Präparate.**

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Tumorsuppressorgen p53 kodiert für ein nukleäres Protein, das auf vielfältige Weise an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist. Veränderungen dieses Gens stellen eine der häufigsten Alterationen in menschlichen Malignomen dar. Ungefähr 55% aller Krebsarten beinhalten Mutationen in beiden Allelen des p53 Gens. Auf Grund der weiten Verbreitung der p53 Veränderungen stellte sich die Frage, ob diese auch an der Genese neuroendokriner Tumore beteiligt sind. Unter dieser Fragestellung wurden 30 Tumore des Diffusen Neuroendokrinen Systems mit immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden retrospektiv untersucht.

I. 4µm dicke Schnitte von in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe wurden unter Anwendung der Avidin-Biotin-Peroxidase Methode mit den Primärantikörpern DO7, PAb 1801 und einem 1:1 Gemisch aus beiden immunhistochemisch angefärbt. In keinem der 30 Tumore konnte eine selektive nukleäre Anfärbung als Ausdruck einer Mehranreicherung von alteriertem p53 nachgewiesen werden.

II. Die DNA von in Paraffin oder Stickstoff eingebettetem Tumorgewebe wurde extrahiert, mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion die Exons 5-8 des p53 Gens amplifiziert und anschließend diese unter Anwendung der SSCP-Methodik auf genetische Alterationen hin untersucht. In keinem der 30 Gewebeproben konnte eine veränderte Basenabfolge festgestellt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen, daß p53 in der Entstehung der neuroendokrinen Tumore keine zentrale Rolle einnimmt. Sie stimmen dabei überein mit den Resultaten der wenigen zu diesem Thema durchgeführten Untersuchungen anderer Forschungsgruppen. Die Genese der neuroendokrinen Tumore ist demnach weiterhin klärungsbedürftig.

## LEBENS LAUF

<b>Geboren</b>	<b>am 15.01.1970 in Bonn</b>
<b>Schulbesuch</b>	<b>1976 bis 1980 Grundschule in Bergheim b. Köln</b> <b>1980 bis 1987 Gutenberg Gymnasium in Bergheim</b> <b>1987 bis 1988 Fife High School, USA</b> <b>1990 Abitur</b>
<b>Wehrdienst</b>	<b>1990/91 Marine</b>
<b>Studium</b>	<b>April 1992 Aufnahme des Medizinstudiums in Hamburg</b> <b>April 1994 Physikum</b> <b>April 1995 1.Staatsexamen</b> <b>Oktober 1997 2.Staatsexamen</b>
<b>Dissertation</b>	<b>Beginn April 1995 unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. A. Frilling in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. med. C. E. Broelsch</b>