

Identifikation von Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 und des Bakteriums
Helicobacter pylori in Magenkarzinomen histopathologischer Präparate aus
verschiedenen medizinhistorischen Sammlungen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades „Doctor rerum naturalium“
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Katharina Licht

geb. Schmücker
aus Magdeburg

Göttingen, 2011

Referent: Prof. Dr. B. Herrmann

Korreferent: Prof. Dr. J. Brockmöller

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2011

Das Leben kann nur in der Schau nach rückwärts verstanden,
aber nur in der Schau nach vorwärts gelebt werden.

Søren Kierkegaard

Die Arbeit wurde im Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie, Abteilung Historische Anthropologie und Humanökologie der Georg-August-Universität angefertigt.

Das Projekt ist Teil des Graduiertenkollegs 1034 „Die Bedeutung genetischer Polymorphismen in der Onkologie: Von den Grundlagen zur individualisierten Therapie“ und wird durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert. Für die Organisation des Graduiertenkollegs, die Finanzierung zwischen 2008 und 2010 und die Unterstützung danke ich dessen Sprecher, Herrn Prof. Dr. Jürgen Brockmüller, herzlich.

Projektleitung: Prof. Dr. Bernd Herrmann und Dr. Susanne Hummel

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Krebserkrankungen | 3 |
| 1.1.1 | Begrifflichkeiten zur Genetik von Krebserkrankungen | 3 |
| 1.1.2 | Ursachen für Krebserkrankungen | 3 |
| 1.1.3 | Krebsstatistik | 4 |
| 1.1.4 | Kriterien für die Auswahl des Karzinomtyps | 6 |
| 1.2 | Magenkarzinom | 6 |
| 1.2.1 | Geographische Unterschiede in der Inzidenz | 6 |
| 1.2.2 | Risikofaktoren für die Entstehung von Magenkarzinomen | 7 |
| 1.2.3 | Entstehung und Erkennung des Magenkarzinoms | 10 |
| 1.2.4 | Klassifikation | 11 |
| 1.2.5 | Genetische Grundlagen des Magenkarzinoms | 11 |
| 1.3 | Hypothesen für die Untersuchung historischer Magenkarzinome | 13 |
| 2 | Grundlagen zum Tumorsuppressorgen p53 und <i>Helicobacter pylori</i> | 15 |
| 2.1 | Tumorsuppressorgen p53 und Krebserkrankungen | 15 |
| 2.1.1 | Funktionsweise von p53 | 15 |
| 2.1.2 | Mutationen in p53 und Krebserkrankungen | 16 |
| 2.1.3 | Mutationen in p53 und Magenkarzinome | 17 |
| 2.1.4 | p53-Datenbanken | 18 |
| 2.1.5 | p53 und <i>Helicobacter pylori</i> | 19 |
| 2.1.6 | Kriterien für die Marker- und Methodenauswahl | 19 |
| 2.2 | <i>Helicobacter pylori</i> und die Entstehung von Magenerkrankungen | 20 |
| 2.2.1 | Anpassung von <i>H. pylori</i> an das Leben im Magen | 20 |
| 2.2.2 | Risikofaktoren für die Infektion mit <i>H. pylori</i> | 20 |
| 2.2.3 | <i>H. pylori</i> und Erkrankungen des Magens | 22 |
| 2.2.4 | Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i> und Magenerkrankungen | 22 |
| 2.2.5 | <i>H. pylori</i> -Eradikation und Resistenzentwicklung gegen Antibiotika | 24 |
| 2.2.6 | Marker- und Methodenauswahl für die Identifikation von <i>H. pylori</i> | 26 |
| 3 | Medizinhistorische Museen und pathologisch-anatomische Sammlungen | 28 |
| 3.1 | Pathologisch-anatomisches Bundesmuseum Wien | 28 |
| 3.2 | Berliner Medizinhistorisches Museum der Charité | 29 |
| 3.3 | Sammlung der Universität Tartu, Estland | 30 |
| 3.4 | Medizinhistorisches Museum Zürich | 30 |
| 4 | Material | 31 |
| 5 | Grundlagen der Analytik | 36 |
| 5.1 | Analyse von degradiertem DNA | 36 |
| 5.2 | Histotechnik | 37 |
| 5.3 | Gaschromatographie und Massenspektrometrie | 39 |
| 6 | Methoden | 41 |
| 6.1 | Herstellung histologischer Präparate | 41 |
| 6.2 | Kontaminationsprävention | 42 |
| 6.3 | Primerdesign | 43 |
| 6.4 | Gewebeentnahme | 44 |
| 6.5 | Probenvorbereitung und DNA-Extraktion | 44 |
| 6.5.1 | Isolierung von DNA aus Paraffinschnitten | 45 |
| 6.5.2 | Isolierung von DNA aus Gewebestücken | 45 |
| 6.5.3 | Isolierung von rezenter Kontroll-DNA | 46 |
| 6.6 | Messung des DNA-Gehalts | 46 |
| 6.7 | Amplifikationssysteme für die Analyse des Tumorsuppressorgens p53 | 47 |
| 6.7.1 | Primer und PCR-Parameter | 47 |
| 6.7.2 | Agarose-Gelelektrophorese | 49 |
| 6.7.3 | Sequenzierung | 50 |
| 6.8 | Autosomale STRs und Amelogenin | 52 |
| 6.8.1 | Primer und PCR-Parameter | 52 |
| 6.8.2 | Fragmentlängenanalyse | 53 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 6.9 | Analysesysteme zum Nachweis von <i>H. pylori</i> | 53 |
| 6.9.1 | Amplifikation mittels quantitativer Real-Time PCR | 53 |
| 6.9.2 | Nachweis von <i>H. pylori</i> mittels Real-Time PCR | 55 |
| 6.9.3 | Identifikation der <i>cag</i> Pathogenitätsinsel von <i>H. pylori</i> durch PCR | 56 |
| 6.9.4 | Nachweis von <i>H. pylori</i> durch SBE | 57 |
| 6.10 | Gaschromatographie und Massenspektrometrie | 61 |
| 7 | Analyseergebnisse | 63 |
| 7.1 | Histologische Begutachtung | 63 |
| 7.2 | Molekulargenetische Untersuchungen | 68 |
| 7.2.1 | DNA-Erhaltung | 68 |
| 7.2.2 | Tumorsuppressorgen p53 | 70 |
| 7.2.3 | Mutationsstatus und histologischer Typ | 76 |
| 7.2.4 | Typisierungsergebnisse der autosomalen Marker und Amelogenin | 76 |
| 7.2.5 | Messung des DNA-Gehalts | 77 |
| 7.3 | Identifikation von <i>H. pylori</i> | 77 |
| 7.3.1 | 16S rRNA Gen, <i>cag</i> Pathogenitätsinsel und 23S rRNA Gen | 77 |
| 7.3.2 | <i>H. pylori</i> -Infektion und histologischer Karzinomtyp | 80 |
| 7.4 | p53-Mutationen und <i>H. pylori</i> -Infektion | 81 |
| 7.5 | Gaschromatographie/Massenspektrometrie | 83 |
| 8 | Auswertung der Analyseergebnisse | 85 |
| 8.1 | Histologische Begutachtung | 85 |
| 8.2 | Molekulargenetische Untersuchungen | 85 |
| 8.2.1 | Tumorsuppressorgen p53 | 85 |
| 8.2.2 | Häufigkeit der identifizierten Mutationen im Vergleich zu rezenten Daten | 89 |
| 8.2.3 | Autosomale STRs und Amelogenin | 90 |
| 8.2.4 | Messung des DNA-Gehalts | 91 |
| 8.2.5 | Lebensalter des Patienten, Mutationsstatus und histologischer Typ | 91 |
| 8.3 | Identifikation von <i>H. pylori</i> | 92 |
| 8.3.1 | <i>H. pylori</i> -Infektion und histologischer Karzinomtyp | 94 |
| 8.4 | Gaschromatographie/Massenspektrometrie | 95 |
| 9 | Diskussion der Methodik | 97 |
| 9.1 | Erhaltungszustand der DNA | 97 |
| 9.2 | Analysemethoden | 98 |
| 9.3 | Basenveränderungen <i>in vitro</i> | 99 |
| 10 | Diskussion der Analyseergebnisse | 101 |
| 10.1 | Veränderte Tumormutationen innerhalb von 60 Jahren | 101 |
| 10.2 | Analyse der Konservierungsflüssigkeiten | 106 |
| 10.3 | Verfügbarkeit historischer Tumorgewebe | 108 |
| 10.4 | Offene Fragestellungen | 109 |
| 10.5 | Weiterführende Fragestellungen | 109 |
| 11 | Zusammenfassung | 111 |
| 12 | Literatur | 113 |
| 13 | Anhang | 130 |
| 13.1 | Abkürzungen und Einheiten | 130 |
| 13.2 | Verwendete Geräte, Einwegmaterialien, Hilfsmittel und Chemikalien | 131 |
| 13.3 | Verwendete Software und Internetseiten | 133 |
| 13.4 | Längenstandards | 133 |
| 13.5 | Einzeltypisierungsergebnisse der autosomalen STRs und Amelogenin | 134 |
| 14 | Glossar | 140 |
| 15 | Lebenslauf | 143 |

1 Einleitung

Krebs entsteht in einem mehrstufigen Prozess, dessen initiales Ereignis in der Veränderung oder Schädigung der genetischen Information einer somatischen Zelle liegt. In einer langwierigen Entwicklung findet eine Umwandlung von normalen Körperzellen in maligne Zellen statt. Ereignisse, die zu einer Mutation führen können, sind u.a. physikalische (ionisierende Strahlung, ultraviolette Licht, Röntgen- und Gammastrahlung) oder chemische Noxen (mutagene Chemikalien) sowie deren Kombinationen (Neumann 2009).

Durch die Kenntnis der molekularen Grundlagen von Krebserkrankungen und deren Entstehungsprozessen konnten Fortschritte in der klinischen Diagnostik und Prognostik gemacht werden, die zur Entwicklung neuer Strategien der Krebsprävention und Tumortherapie geführt haben. Einen Beitrag zu dieser molekularen Grundlagenforschung möchte das Graduiertenkolleg 1034 „Die Bedeutung genetischer Polymorphismen in der Onkologie: Von den Grundlagen zur individualisierten Therapie“ (www.gcpg.de) leisten. Ziel der Forschungsvorhaben ist die Verbesserung der Patientenbehandlung und eine Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen. Für die Optimierung der Behandlung des einzelnen Patienten ist die Kenntnis der individuellen genetischen Besonderheit von gesunden und krebserkrankten Zellen Voraussetzung. Auf diese Weise soll die Grundlagenforschung mit der klinischen Forschung verbunden werden.

Das Graduiertenkolleg setzt sich aus Wissenschaftlern und Studierenden verschiedener Fachbereiche der Medizin und Biologie zusammen, was eine interdisziplinäre Bearbeitung der Einzelprojekte ermöglicht.

Ziele der Historischen Anthropologie sind u.a. die Rekonstruktion von Mensch-Umweltbeziehungen und Co-Evolutionen im historischen Wandel. Ein Teilaspekt ist dabei das Wissen um die genetische Ausstattung der Menschen aus historischen Zeiten, etwa in Bezug auf immunogenetisch und pathologisch relevante Marker. Eng damit verknüpft ist auch der Nachweis von Krankheitserregern, die Einfluss auf die genetische Ausstattung haben können, z.B. durch selektiven Druck auf bestimmte Genvarianten.

Die vorliegende Arbeit liegt an der Schnittstelle der beiden Fachbereiche, wobei versucht wird, mit dem Methodeninventar der Anthropologie weitergehende Fragestellungen der Onkologie zu beantworten. Das Untersuchungsmaterial der Arbeit stellt dabei den verbindenden Faktor dar, da es sich um Tumorgewebe aus medizinhistorischen und pathologischen Sammlungen handelt.

Einer der Marker, dem eine große Bedeutung in der Krebsforschung beigemessen wird und der in dieser Arbeit untersucht wird, ist das Tumorsuppressorgen p53 (Kap. 2.1). Der Mutationssta-

tus von p53 könnte langfristig eine wesentliche Information für eine individualisierte Behandlung und damit das Ansprechen des Tumors auf die Therapie sein. Es wird daher davon ausgegangen, dass das retrospektiv erworbene Wissen über Krebsgenome des letzten Jahrhunderts, einen Beitrag zu aktuellen Forschungsfragen liefern kann.

Grundlegendes Ziel der Untersuchung ist es, Wissen über Krebsgenome historischer Proben zu generieren. Es entwickelte sich die Fragestellung, ob es Unterschiede in der genetischen Ausstattung von historischen Tumorgenomen im Vergleich zu heute gibt. Die Ursachen für Veränderungen könnten veränderte Einflussfaktoren sein, die eine Krebsentstehung begünstigen. Die veränderten Einflussfaktoren könnten insbesondere Auswirkungen auf Krebserkrankungen gehabt haben, bei denen es im letzten Jahrhundert deutliche Veränderungen in der Inzidenz gegeben hat.

Die Analyse der Tumorgenome wird stellvertretend an Magenkarzinomen durchgeführt. Für die Entstehung von Magenkarzinomen werden als einflussreichste Risikofaktoren Ernährung, bakterielle Infektion durch *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) und Umwelt diskutiert.

Der Begriff „Umwelt“ wird in dieser Arbeit als Synonym für verschiedene Einflüsse verwendet. Dazu gehören zum einen im engeren Sinne Wasser und Luft sowie ihre anthropogenen Verschmutzungen, aber auch die soziale Umwelt (z.B. Familienstatus) und die Lebensweise des Einzelnen (etwa Zigaretten- und Alkoholkonsum). Getrennt davon werden die Begriffe Ernährung und bakterielle Infektion durch *H. pylori* geführt (Becker 2001).

Sofern retrospektiv Veränderungen in den Genomen der Magenkarzinome festgestellt werden können und diese sich durch veränderte Risikofaktoren begründen lassen, können ggf. Konsequenzen für Lebens- und Ernährungsweisen gezogen werden.

Dem Beginn der Arbeit wird eine Einführung in die Thematik der Krebserkrankungen im Allgemeinen (Kap. 1.1) und von Magenkarzinomen im Besonderen (Kap. 1.2) vorangestellt. Danach werden die Hypothesen der Arbeit hinsichtlich historischer Magenkarzinome vorgestellt (Kap. 1.3). Anschließend werden Grundlagen zum Tumorsuppressorgen p53 und zum Magenbakterien *H. pylori* vermittelt (Kap. 2).

1.1 Krebserkrankungen

1.1.1 Begrifflichkeiten zur Genetik von Krebserkrankungen

In den meisten Organismen werden die genetischen Informationen durch die DNA (*desoxyribonucleic acid*) gespeichert. Der genetische Code wird durch die Purinbasen Guanin (G) und Adenin (A) und durch die Pyrimidinbasen Cytosin (C) und Thymin (T) gebildet, von denen je drei Basen eine Aminosäure kodieren.

Im menschlichen Genom gibt es ungefähr 25.000 Gene, die meistens aus Introns und Exons aufgebaut sind und seitlich durch einen Promoter und einen Terminator begrenzt werden. Informationen für die Bildung eines Proteins sind in den Exons kodiert (Tariverdian & Buselmaier 2004).

Durch endo- und exogene Ereignisse kann es innerhalb der DNA-Sequenz zu Veränderungen kommen. Als Mutationen werden meist spontane Veränderungen in den somatischen Zellen bezeichnet, die manifestiert und somit auf Tochterzellen vererbt werden können. Die häufigsten Ereignisse sind Punktmutationen.

Ist durch eine Mutation nur eine einzelne Zelle betroffen, hat das normalerweise keine Folgen für den Organismus. Negative Auswirkungen entstehen erst, wenn die Zelle durch die Mutation zur Proliferation befähigt wird. Können Kontrollmechanismen, die z.B. den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen, den Wachstumsprozess nicht stoppen, erhält die Zelle einen Selektionsvorteil.

In die Krebsentstehung sind in den meisten Fällen drei Gruppen von Genen involviert: Onkogene, Mutator- und Tumorsuppressorgene. Onkogene kodieren in der gesunden Zelle für Proteine, die Zellwachstum, -teilung und -differenzierung regulieren. Mutatorgene sind übergeordnet für das Funktionieren des Gesamtgenoms zuständig. Tumorsuppressorgene hemmen in der gesunden Zelle die Proliferation (Tariverdian & Buselmaier 2004). Mutationen in diesen Genen können zu unkontrolliertem Wachstum der Zelle und damit zu Krebs führen.

1.1.2 Ursachen für Krebserkrankungen

Bis ins 19. Jahrhundert nahm man an, dass ein bösartiges Geschwulst -wie alle Krankheiten- eine Folge von Störungen der Körpersäfte war (Humoralpathologie). Als wirksamste Behandlung galt das Abführen der kranken Säfte durch Diät, Aderlass, Blutegel oder Brandgeschwür (Körbler 1972). Eine vollständige Veränderung widerfuhr der Medizin erst durch die „Zellularpathologie“ von Rudolf Virchow (1821-1902). Nach Virchow ist jede abnorme und wuchernde einzelne Krebszelle auf einen normalen Zellentyp des Körpers zurückzuführen.

Zusammenhänge zwischen bestimmten Krankheitsbildern und Berufen sind seit langem bekannt. Dazu zählen u.a. Skrotalkrebs bei Schornsteinfegern, Hautkrebs bei Fischern und Landarbeitern (Young et al. 1926) sowie Magenkrebs bei Matrosen (Braithwaite 1902). Im Zuge dieser Erkenntnis wurde nun nach den Ursachen für die Entartung der Zellen auch außerhalb des Körpers gesucht.

Die größte Bedeutung kommt Ludwig Rehn zu, der 1895 einen Vortrag über „Blasengeschwülste bei Fuchsinarbeitern“ hielt. Als Ursache für das erhöhte Auftreten der Blasengeschwülste bei den Fabrikarbeitern sah er die Vorstufen des Fuchsin, zu denen das Anilin gehört („Anilinkrebs“, Rehn 1895). Damit wurde die erste Krebserkrankung eines inneren Organs entdeckt, die durch chemische Noxen hervorgerufen werden konnte (Bauer 1950).

Den Japanern Yamagiwa und Ichikawa (1916) gelang es durch kontinuierliches Einstreichen von Kaninchenohren mit Steinkohlenteer Karzinome hervorzurufen. Seit diesem Zeitpunkt konnte ein Wandel von der Erkennung und Behandlung bis zur Vorbeugung der Krankheit vollzogen werden.

Die größte Aufregung in der Bevölkerung verursachte der wissenschaftliche Nachweis, dass Rauchen in Verbindung mit Lungenkrebs steht (Levin et al. 1950).

In Bezug auf Ernährung und Karzinome fand man heraus, dass pflanzliche Öle karzinogen werden, wenn sie in Eisengefäßen auf 320°C erwärmt werden. Bei Erwärmung in einem Glasgefäß war die Substanz weniger karzinogen, so dass das Kochgeschirr als Ursache für die Karzinogenbildung identifiziert wurde (Peacock 1956).

Zwei Jahre später wurde karzinogenes Benzo(a)pyren in geräucherten Würsten und geräucherem Fisch nachgewiesen (Gorelova & Dikun 1958). Unabhängig davon konnte in der isländischen Bevölkerung ein Zusammenhang zwischen der Zubereitung von Nahrungsmitteln und Magenkrebs festgestellt werden, da Isländer, deren Hauptnahrungsmittel geräucherter Fisch und Fleisch war, häufiger an Magenkarzinomen erkrankten als andere (Dungal 1959).

1.1.3 Krebsstatistik

Krebserkrankungen sind das Resultat komplexer Vorgänge und Veränderungen. Eine wichtige Variable in der Entstehung ist die Interaktion zwischen Genotyp und Umwelt, die einen erheblichen Einfluss auf die verschiedenen Ausprägungen von Krebs hat.

Als Folge von Krebserkrankungen starben im Jahr 2000 weltweit etwa sieben Millionen Menschen (Parkin et al. 2005). Damit liegt die Mortalität an zweiter Stelle nach den Todesfällen durch kardiovaskuläre Erkrankungen (Shibuya et al. 2002). Aufgrund frühzeitiger Diagnosestel-

lung und besserer Behandlungsmöglichkeiten konnten die Mortalitätsraten bei Krebserkrankungen zwischen 1990 und 2004 von 18,4 % auf 10,5 % gesenkt werden (Jemal et al. 2008).

Global betrachtet ist Lungenkrebs sowohl die häufigste Krebserkrankung als auch die häufigste Todesursache verursacht durch Krebs. Die zweithöchste Inzidenz hat der Brustkrebs, welcher durch die gute Prognose nach frühzeitiger Diagnosestellung in den Todesursachen allerdings nur an der fünften Stelle liegt. Mit abnehmenden Häufigkeiten folgen maligne Erkrankungen von Magen, Leber und Darm.

Typische Krankheiten, die mit dem westlichen Lebensstil des Wohlstandes assoziiert sind, sind Kolorektal-, Brust- und Prostatakrebs, deren Entstehung einer hormonellen Regulierung unterliegt und verhältnismäßig gute Prognosen hat.

Weitere Faktoren, welche die Inzidenz und Mortalität beeinflussen, sind u.a. Kontakt zu Risikofaktoren (z.B. Rauchen), Zugang zur Früherkennungsdiagnostik, frühe Diagnosestellung und Behandlung (Parkin et al. 2005).

Durch die bessere medizinische Versorgung können Unterschiede zwischen Industrie- und Entwicklungsländern (WCRF/AICR 2007), aber auch zwischen Bevölkerungsgruppen verschiedener ethnischer Herkunft erklärt werden (Bach et al. 2002). So haben z.B. afrikanisch-stämmige US-Amerikaner eine um 19% höhere Gesamtinzidenz und eine um 37% höhere Mortalität durch Krebs als europäisch-stämmige Amerikaner. Bei Frauen sind die Differenzen geringer (Parkin et al. 2005).

Neben ethnischen sind auch geographische Unterschiede in der Inzidenz verschiedener Krebserkrankungen bekannt. Kaukasische Frauen aus den Vereinigten Staaten erkranken zwei bis vier Mal häufiger an Brustkrebs als Frauen, die in China, Japan oder den Philippinen leben (Parkin et al. 1992). Migrieren Frauen aus den genannten asiatischen Ländern jedoch nach Nordamerika, nähert sich das Risiko dem der US-Frauen an (Smith 1956, Andreeva et al. 2007). Zu einer Annäherung des Erkrankungsrisikos an die neue Region kann es innerhalb von ein bis zwei Generationen kommen.

Aufgrund dieser Studien gewinnt der Einfluss äußerer Faktoren für die Entstehung von spontanem Krebs an Bedeutung (Becker 2006).

Langzeitstudien, welche die Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen im letzten Jahrhundert auswerteten, deckten auf, dass sich in den Krankheitsbildern und deren Frequenzen ein Wandel vollzogen hatte bzw. immer noch vollzieht. Zwar sind diese Studien aufgrund der unterschiedlichen Altersverteilung und Größe der zugrunde liegenden Bevölkerungen schwer direkt miteinander zu vergleichen (Becker 2006), dennoch sind in allen Studien eindeutige Tendenzen

erkennbar. Beispielsweise zeigte sich, dass die Lungenkrebs-Mortalität zwischen 1930 und 1990 fast exponentiell stieg, es nach 1990 jedoch zu einem Rückgang dieser kam. Ferner war auffällig, dass das Maximum der Todesfälle durch Lungenkrebs bei Frauen etwa 20 Jahre nach dem der Männer lag (Jemal et al. 2008). Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte der spätere Beginn des Rauchens bei Frauen sein.

Ein deutlicher Rückgang war im letzten Jahrhundert einzig bei der Magenkrebsinzidenz in den Industrieländern zu verzeichnen. Als Haupteinflussfaktor geht man von einem gestiegenen Wohlstand aus, der sich u.a. durch Verbesserungen in der Lebensmittelqualität und den hygienischen Bedingungen widerspiegelt (Schulz 2005).

1.1.4 Kriterien für die Auswahl des Karzinomtyps

Ein Kriterium für die Auswahl eines Tumortyps war eine Veränderung in der Inzidenz der Erkrankung innerhalb des letzten Jahrhunderts. Hinzu kam die Beeinflussung der Tumorentstehung durch äußere Einflüsse wie Lebens- und Ernährungsweisen. Außerdem sollten in der Literatur ausreichend Daten verfügbar sein, damit die generierten Ergebnisse mit aktuellen Daten verglichen werden konnten. Ferner stellte die Verfügbarkeit von Probenmaterial in pathologischen Sammlungen ein Kriterium dar. Eine Tumorart, die diese Kriterien erfüllte, ist das Magenkarzinom. Magenkarzinome werden stellvertretend für Krebserkrankungen, die durch Verhaltensweisen (s.o.) der Menschen induziert werden können, untersucht.

1.2 Magenkarzinom

1.2.1 Geographische Unterschiede in der Inzidenz

Noch 1930 galt Magenkrebs von allen Krebsarten als häufigste Todesursache bei amerikanischen Männern (Haenszel 1958). Bis vor wenigen Jahrzehnten war es die zweithäufigste Krebserkrankung weltweit. Innerhalb von 50 Jahren reduzierte sich die Inzidenz in den USA von 33 auf 10 Fälle je 100.000 Männer und von 30 auf 5 je 100.000 Frauen (National Cancer Institute 1994). Heute machen die Neuerkrankungen mit absteigendem Trend weniger als 10% aus, allerdings bleibt Magenkrebs als Todesursache auf der zweiten Position (Parkin et al. 2005). Gründe dafür sind eine späte Diagnosestellung durch unspezifische Symptome und schlechte Behandlungsmöglichkeiten. Etwa zwei Drittel der Magenkrebsfälle werden in den Entwicklungsländern und davon 42% alleine in China diagnostiziert, so dass deutliche geographische und ethnische Unterschiede festzustellen sind. Regionen mit einem hohen Risiko (>20 pro 100.000) sind Ostasien,

Osteuropa und Teile Zentral- und Südamerikas. Regionen mit besonders niedrigem Risiko (<10 pro 100.000) sind Südasien, Nord- und Ostafrika, Nordamerika, Australien und Neuseeland. Deutschland reiht sich in das Mittelfeld ein.

Für Magenkrebs sind, wie auch für Brustkrebs (Kap. 1.1.3), Risikoveränderungen durch Migration beobachtet worden (McMichael et al. 1980), so dass im Folgenden ein Schwerpunkt auf die umweltbedingten Risikofaktoren für die Entstehung von Magenkarzinomen gelegt wird.

1.2.2 Risikofaktoren für die Entstehung von Magenkarzinomen

Als Risikofaktoren für die Entstehung von Magenkarzinomen gelten Nahrung, sozioökonomischer Status, Infektion mit *H. pylori* und Prädisposition. Mit geringerer Häufigkeit beeinflussen Rauchen, Alkohol und berufliche Exposition gegenüber karzinogen wirkenden Einflüssen das Risiko.

Als Bestandteile der Nahrung wird das Risiko der Magenkrebsentstehung durch Salz (NaCl), Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-) sowie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe erhöht.

Salz wurde traditionell zum Konservieren von Nahrung verwendet (siehe nächster Abschnitt). Als zugrunde liegenden Prozess für die Entstehung von Magenerkrankungen nimmt man die Schädigung der Magenschleimhaut in Abhängigkeit von der Salzkonzentration an (Furhata et al. 1996). Bei stetig hohen Konzentration wird die Magenschleimhaut anfällig für eine schwere Gastritis und die Karzinogenese (Howson et al. 1986).

Eine andere Risikokomponente ist die kontinuierlich hohe Aufnahme von Nitrat, Nitrit und/oder sekundären Aminen. Bei Nitrit handelt es sich um ein Abbauprodukt von Nitrat. Sekundäre Amine wurden in Getreide, Fisch, Tee oder Tabakrauch nachgewiesen (Tricker 1997). Außerdem können aus Nitrit und Aminen Nitrosamine gebildet werden, die Tumoren im Magen hervorrufen können (Schlag et al. 1980, Mirvish 1983).

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sind aus geräucherten Fischen bekannt (Stewart 1967). Außerdem findet man diese Kohlenwasserstoffe auch im Teer der Steinkohle, in Autoabgasen und im Tabakrauch.

Ein weiterer Risikofaktor, der eng mit der Ernährung verknüpft ist, ist der sozioökonomische Status. Eine Studie aus Japan bestätigt die Annahme, dass das Risiko der Magenkrebsentstehung in Gesellschaftsgruppen mit einem geringeren Einkommen höher ist (Hirayama 1984).

In engem Zusammenhang zu veränderten Ernährungsgewohnheiten und dem sozioökonomischen Status steht die Verbreitung von Eisschränken in den Industrieländern seit Beginn des 20. Jahrhunderts (Brewster & Jacobson 1978). Durch Kühlmöglichkeiten in Transport und Aufbewahrung in den privaten Haushalten wurden verschiedene Konservierungsmethoden überflüssig (Sato et al. 1959, Japanese Ministry of Health and Welfare 1983, Kono et al. 1983) und ermöglichten frischere Produkte für den Konsumenten. In der Folge stieg die pro Kopf Aufnahme von Vitaminen, die protektiv gegen die Karzinomentstehung wirken sollen, deutlich an (Haber & Wissel 1962, Hormozdiari et al. 1975, Cook & McNamara 1980). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass Vitamine die Bildung von Nitrosaminen blockieren (s.o., Weisburger 1985b, a). Ein weiteres Vorteil der gekühlten Lagerung ist, dass einer Kontamination der Lebensmittel durch Bakterien und Pilze, die prokarzinogene Wirkungen haben können, vorgebeugt werden kann (Fuchs & Mayer 1995).

Ein akzeptierter Risikofaktor für die Entstehung von Magenläsionen und langfristig betrachtet von Magenkarzinomen ist das Magenbakterium *H. pylori* (Kap. 2.2) (IARC 1994). Ein Nachweis der Bakterien ist mit einer Risikoerhöhung um den Faktor zwei bis 17 assoziiert (Forman et al. 1991, Nomura et al. 1991, Parsonnet et al. 1991). Der Risikoerhöhung liegt eine durch *H. pylori* induzierte chronische Entzündung zugrunde, die eine genetische Instabilität der Magenschleimhaut fördern kann. Durch eine salzreiche Ernährung kann das Risiko weiter erhöht werden (De Koster et al. 1994, Shikata et al. 2006).

Der Einfluss der Prädisposition als Risikofaktor für die Entstehung von Magenkarzinomen wird auf etwa 5% geschätzt (Grady 2001). Durch die genannten Einflussfaktoren aus der Nahrung kann das Risiko gesteigert werden.

Ein weiteres Risiko für die Magenkrebsentstehung geht vom Zigarettenkonsum aus. Laut *International Agency for Cancer Research* (IARC) sind 20 bis 35% der Magenkarzinome durch Bestandteile des Zigarettenrauchs induziert (IARC 1986), was jedoch kontrovers diskutiert wird. Schätzungen zu Folge liegt die Ursache von einem Drittel aller Krebserkrankungen in Ländern mit einem hohen Einkommen im Rauchverhalten (Cancer Research UK 2007). Die Entstehung von Magenkarzinomen soll für Raucher mit einem bis zu dreifachen Risiko einhergehen.

Eine Risikoveränderung durch den regelmäßigen Konsum von Alkohol konnte bisher nicht reproduzierbar nachgewiesen werden (Nomura et al. 1990, Hoshiyama & Sasaba 1992, Kabat et al. 1993).

Kontakt zu krebserregenden Toxinen hat die durchschnittliche Bevölkerung des 21. Jahrhunderts nur noch in geringem Maße, seitdem viele karzinogene Stoffe identifiziert werden konnten und Schutzmaßnahmen griffen. Zusammenhänge zwischen beruflichen Expositionen und Magenkarzinomen werden dennoch weiterhin bei Asbestexposition in der Schiffsbauindustrie (IARC 1987), im Kohlebergbau, der Landwirtschaft und bei der Metallverarbeitung gefunden (Chow et al. 1994). Eine Risikoerhöhung ist allerdings nur in geringem Maße zu verzeichnen.

Trotz des Wissens um viele potentielle Karzinogene und verbesserte Untersuchungsmethoden ist es immer noch problematisch, spezifische Assoziationen zwischen traditionellen und individuellen Ernährungsmustern sowie den genetischen Voraussetzungen des Einzelnen zu belegen. Im Ganzen ist anzunehmen, dass alle genannten Faktoren einen Einfluss auf die Magenkrebsentstehung haben können und jeder dieser Faktoren einen Teil zur Entwicklung beiträgt.

Konservierung von Nahrungsmitteln als Risikofaktor für Magenkarzinome

Als Hauptfaktor für den Rückgang der Magenkrebsmortalität wird, wie erwähnt, der wachsende Wohlstand verantwortlich gemacht. Dazu gehören u.a. die verbesserten Ernährungsbedingungen, die gesündere Konservierungsverfahren beinhalten (Becker 2006). Die gängigsten Verfahren zur Konservierung werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Die ältesten Methoden zum Haltbarmachen von Nahrungsmitteln sind Kühlen und Trocknen, welche saisonalen und regionalen Einflüssen unterliegen (Tannahill 1979).

Das Einsalzen von Fleisch und Fisch zur Aufbewahrung ist schon aus dem frühen Ägypten bekannt. Salz war Teil eines regen Exporthandels (Forbes 1955-1958). Im europäischen Mittelalter wurden Fleisch und Fisch entweder in trockenes Salz oder in eine Salzlake eingelegt. Nachteil des Salzens ist, dass es nur einen Stillstand des Keimwachstums und keine Keimtötung bewirkt. Im alten Germanien hatte Salz zur Konservierung weniger Bedeutung, da es kostbar und nur in geringen Mengen verfügbar war, so dass der Rauch des Herdes einfacher zu nutzen war (Heyne 1901).

Durch Räuchern in Verbindung mit Salzen entstand Schinken, der schon aus der römischen Kaiserzeit als Importware bekannt war (Heyne 1901). In der Herstellung wurde das Fleisch zunächst getrocknet, wodurch es die konservierenden Rauchbestandteile (teerähnliche Stoffe) besser aufnehmen konnte (Heyne 1901). Das Räuchern befreit, wie das Salzen, allerdings nicht von Keimen (Glatzel 1955). Schon 1902 sah Braithwaite ursächlich für die große Krebssterblichkeit in einigen Teilen Englands den regional erhöhten Fleisch- und Salzgenuss. In den Regionen, in

denen Fleisch wenig kostete, erkrankten mehr Menschen an Magenkrebs als z.B. in Wales, wo wenig Fleisch konsumiert wurde (Braithwaite 1902).

Erst durch das luftdichte Erhitzen trat eine Änderung der Konservierungsmethoden ein (Nicolas Appert, 1749-1841). Durch Weiterentwicklung der Methode wurden im 19. Jahrhundert Konservenfabriken gebaut und Nahrungsmittel konnten längere Zeit gelagert werden (Barbier 1994). Durch die Entdeckung von Louis Pasteur (1822-1895), dass Mikroorganismen bei der Fäulnis von Lebensmitteln eine Rolle spielen und Hitze diese bekämpfen kann, wurde das Eindosen zu einer sicheren Konservierungsmethode und eignete sich für die Massenproduktion (Körbler 1972).

1.2.3 Entstehung und Erkennung des Magenkarzinoms

Die initialen und charakteristischen Entzündungsprozesse für Magenkarzinome können u.a. durch Toxine aus konservierter und salzreicher Nahrung (Kap. 1.2.2) und/oder durch eine *H. pylori*-Infektion (Kap. 2.2) hervorgerufen werden, die zu einer chronisch aktiven Gastritis führen. Bei einigen Patienten führt die dauerhafte Entzündung zu einer atrophischen Gastritis, gefolgt von intestinaler Metaplasie, Dysplasie, einem frühen und einem letztendlich fortgeschrittenen Magenkarzinom (Abb. 1 und Kap. 14) (Cover & Blaser 1992). Die Genese des Tumors beginnt in der Regel durch eine Invasion der *Lamina propria mucosae* oder der *Lamina muscularis mucosae*. Anschließend wird die submukosale Schicht durchdrungen (Ushijima & Sasako 2004). Magenkarzinome bleiben in den meisten Fällen eine lokalisierte Krankheit und bilden nur langsam Metastasen, die sich in den meisten Fällen auf die Lymphknoten, die Leber und das Peritoneum beschränken (Ushijima & Sasako 2004).

Maligne Erkrankungen des Magens werden nur in wenigen Fällen vor dem 40. Lebensjahr diagnostiziert, danach steigt die Inzidenz je Lebensdekade, wobei ihr Maximum in der siebten Lebensdekade erreicht wird (Fuchs & Mayer 1995).

Trotz verbesserter Behandlungsmöglichkeiten im 21. Jahrhundert liegt die 5-Jahres-Überlebensrate unterhalb von 50%. Die zugrunde liegenden Probleme für die hohe Mortalität sind vage und unspezifische Symptome der Erkrankung, fehlende Screeningtests und schlechtes Ansprechen auf Bestrahlung und Chemotherapie (Weed et al. 1981). Die seit den 1980er Jahren etablierten Screening- und Früherkennungsprogramme werden hauptsächlich in Regionen mit hohem Magenkrebsrisiko, wie beispielsweise Ostasien, durchgeführt (Hamashima et al. 2008). Präventive Maßnahmen gestalten sich schwierig, da Magenkrebs eine Latenzzeit von etwa 40 Jahren hat.

Folglich beeinflussen auch Faktoren, die das Leben und die Ernährungsgewohnheiten in der Jugend bestimmten, das spätere Krebsrisiko (Becker & Korfmann 1998).

1.2.4 Klassifikation

Über 90% der bösartigen Tumoren des Magens sind Karzinome, die vom Epithel ausgehen. Die verbleibenden Prozente verteilen sich hauptsächlich auf Non-Hodgkin-Lymphome und Leiomyosarkome (Rotterdam 1989), bei denen es sich um bösartige Tumoren des lymphatischen Gewebes bzw. der glatten Muskulatur des Magens handelt.

Den größten Anteil an Magenkarzinomen haben die vom Drüsenepithel ausgehenden Adenokarzinome. Diese werden in der Klassifikation nach Laurén (1965) in den intestinalen und den diffusen Typ unterteilt und unterscheiden sich in epidemiologischen und prognostischen Merkmalen. Der intestinale Typ kommt zwei- bis dreimal häufiger vor als der diffuse und hat in der Regel eine bessere Prognose, da es vorwiegend zu einem expansiven Wachstum und nur selten zur Invasion von Lymphen und Gefäßen kommt. Die intestinale Malignität scheint mit Risikofaktoren aus Umwelt und Ernährung zusammenzuhängen (Kountouras et al. 2005).

Bei der Entstehung des diffusen Typs werden in kleinen Haufen gelegene schleimbildende Zellen beobachtet, die diffus wachsen. Kommt es zur Schleimretention in den Tumorzellen, spricht man von Siegelringzellen, die das Gewebe deutlich aggressiver als andere Tumorzellen infiltrieren (Kountouras et al. 2008). Kennzeichnend für den diffusen Typ ist das stärkere invasive Wachstum. Außerdem kommt es häufig zu Lymph- und Gefäßeinbrüchen. Entsprechend seines Wachstumsverhaltens ist die Prognose bei diesem Karzinomtyp schlechter. Ein Zusammenhang zwischen dem diffusen Typ und Einflüssen aus Ernährung und Umwelt ist fraglich, da bisherige Studien keine Assoziation zeigten (Kountouras et al. 2005).

1.2.5 Genetische Grundlagen des Magenkarzinoms

Wie bei jeder Krebserkrankung muss bei der Entstehung des Magenkarzinoms zwischen Prädisposition durch *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), Keimbahnmutationen und spontanen Mutationen in somatischen Zellen des Patienten unterschieden werden (Schulz 2005). Der Schwerpunkt des folgenden Abschnitts und in dieser Arbeit liegt auf spontanen Mutationen in somatischen Zellen des Magens.

Viele Gene wurden untersucht, um die molekulare Grundlage von Magenkarzinomen zu verstehen, jedoch konnten nur wenige mit reproduzierbaren und häufigen Alterationen identifiziert werden. Beispielsweise können verschiedene Onkogene und Tumorsuppressorgene, wie *K-ras*,

β -Catenin, c-myc, p53, APC und DCC, einen Einfluss auf die Genese und das Voranschreiten von Magenkrebs haben. Diese Einflüsse sind jedoch nicht auf das Magenkarzinom beschränkt, sondern auch bei Kolorektalkarzinomen bekannt (Uchino et al. 1992, Tahara 1993). Die Akkumulation der multiplen genetischen Veränderungen kann zum Verlust der Tumorsuppressorfunktion, fehlerhafter DNA-Reparatur und Überexpression von Onkogenen führen, die langfristig Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts hervorrufen können (Kountouras et al. 2000, Fiocca et al. 2001). Die Häufigkeiten, in denen Veränderungen im Genom beobachtet worden sind, sind zum Teil abhängig vom histologischen Karzinomtyp (Ushijima & Sasako 2004). So sollen Mutationen in *K-ras*, β -Catenin und p53 häufiger bei intestinalen als diffusen Erkrankungen vorkommen (Maesawa et al. 1995, Park et al. 1999, Lee et al. 2002). Überschneidungen sind allerdings die Regel, so dass aus den genetischen Veränderungen nicht auf die Histologie geschlossen werden kann.

Ein Gen, welchem große Bedeutung in der Magenkrebsentstehung beigemessen wird, ist das Tumorsuppressorgen p53 (Kap. 2.1, Tamura et al. 1991). P53-Mutationen in Zellen des Magens sind ein frühes Ereignis in der Tumorgenese (Unger et al. 2003).

Zusätzlich zu Veränderungen in p53 sind Mutationen des in den Epithelien vorkommenden E-Cadherins ein häufiges Ereignis in der Tumorgenese (Becker et al. 1994, Tamura et al. 1996). E-Cadherin gehört zur Familie der Adhäsionsproteine. Bei einem Funktionsverlust wird die normale Gewebearchitektur aufgehoben und die Entdifferenzierung des Krebses schreitet voran (Fiocca et al. 2001). Mutationen im diffusen Typ stellen mit 33 bis 50% ein häufiges Ereignis dar, sind jedoch nur in Ausnahmefällen in intestinalen Tumoren beschrieben (Becker et al. 1994).

Ein weiteres Tumorsuppressorgen, welches im Magenkarzinom mutiert sein kann, jedoch am häufigsten als Veränderung bei Darmkrebs beschrieben ist, ist das APC-Gen (*adenomatous polyposis coli*). Durch Mutationen oder den Verlust des APC-Gens sind Patienten anfälliger für Neoplasien (Kountouras et al. 2000). APC-Mutationen kommen mit einer Häufigkeit von 20% in Magenadenomen vor (Horii et al. 1992, Maesawa et al. 1995), sind allerdings mit 0 bis 5% ein seltenes Ereignis in Magenkarzinomen (Ushijima & Sasako 2004).

Auf die Beschreibung weiterer genetischer Veränderungen bei der Magenkrebsgenese wird an dieser Stelle verzichtet und auf zusammenfassende Darstellungen in der Literatur verwiesen (z.B. Tamura 2006).

1.3 Hypothesen für die Untersuchung historischer Magenkarzinome

Krebserkrankungen können durch Veränderungen in einzelnen Zellen eines Organs eines Patienten hervorgerufen werden, deren auslösende Faktoren vielfältig sein können. Da sich die Art und Intensität der Exposition gegenüber karzinogen wirkenden Einflüssen in den letzten Jahrhunderten stetig verändert haben, stellt sich die Frage, ob diese Veränderungen Unterschiede in den Tumormutationen zwischen historischem und rezemtem Tumorgewebe reflektieren. Aus dieser Fragestellung ergibt sich die erste Hypothese:

- Tumormutationen von historischen Magenkarzinomen unterscheiden sich von denen aus der rezenten Bevölkerung

Als typisches Zielgen für Tumormutationen in Magenkarzinomen wird das Tumorsuppressorgen p53 untersucht. Ausführungen zu p53 finden sich in Kapitel 2.1.

Neben den benannten Risikofaktoren für die Entstehung von Magenkarzinomen (Kap. 1.2.2) erhöht sich das Risiko durch eine Infektion mit dem Magenbakterium *H. pylori*, da diese Bakterien aktiv Prozesse im Magen beeinflussen können (Kap. 2.2). Daraus resultiert die zweite Hypothese:

- Patienten mit *H. pylori*-Infektion weisen vermehrt p53-Mutationen in ihren Magenkarzinomen auf

Um diese Hypothese zu prüfen wird *H. pylori* in den historischen Magenkarzinomproben nachgewiesen. Beispielhaft wird eine konservierte Genregion des 16S RNA kodierenden Gens untersucht.

H. pylori-Stämme zeichnen sich durch ihre genetische Diversität aus. So unterscheiden sich die Stämme u.a. durch die Anwesenheit von Virulenzfaktoren. Einer dieser Virulenzfaktoren ist die Pathogenitätsinsel *cag*, deren Besonderheiten im Kapitel 2.2.3 erläutert werden. Die dritte Hypothese lautet:

- *H. pylori*-Stämme, die Träger der Pathogenitätsinsel *cag* sind, verursachen häufiger Tumormutationen in p53 als *cag*-negative Stämme

Zur Prüfung der Hypothese werden die Karzinomproben auf die Anwesenheit eines Genabschnitts der *cag*-Pathogenitätsinsel untersucht.

Seit der Zusammenhang zwischen *H. pylori*-Infektionen und Magenkarzinomen bekannt ist (Warren & Marshall 1983), gibt es Bemühungen das Pathogen zu eliminieren. Die häufigste Therapie beinhaltet eine Kombination verschiedener Antibiotika. Gegen einige Medikamente dieser Kombination hat *H. pylori* in den letzten Jahren Resistenzen entwickelt. Daraus ergibt sich die folgende Hypothese:

- Historische *H. pylori*-Isolate haben keine resistenztypischen Mutationen gegen Antibiotika, da ein entsprechender Selektionsdruck fehlt

Um diese Hypothese zu prüfen werden einzelne Basen, deren Mutationen Resistenzen gegen das Antibiotikum Clarithromycin bewirken, untersucht. Diese Punktmutationen sind auf dem 23S rRNA kodierenden Gen lokalisiert.

In einem Nebenprojekt werden Bestandteile von Konservierungsflüssigkeiten der histopathologischen Präparate. Aus den identifizierten Komponenten und der DNA-Erhaltung der Probe sollen für spätere Untersuchungen Vorhersagen über den Amplifikationserfolg getroffen werden können. Es wird angenommen, dass die Hauptkomponenten formalin- und alkoholbasierte Lösungen sind (Burck 1981, Piechocki 1986, Romeis 1989). Für eine Analyse wird die kombinierte Gaschromatographie und Massenspektrometrie genutzt.

2 Grundlagen zum Tumorsuppressorgen p53 und *Helicobacter pylori*

2.1 Tumorsuppressorgen p53 und Krebserkrankungen

Ein Gen, welches bei etwa einem Drittel der Patienten mit Magenkarzinomen Mutationen in den Tumoren vorweist, ist das Tumorsuppressorgen p53. Es wurde 1979 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander identifiziert (Lane & Crawford 1979, Linzer & Levine 1979) und gilt heute als das am besten untersuchte Protein. Das menschliche p53-Gen ist auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert und besteht aus 19198 Nukleotiden, die sich auf elf Exons verteilen. Der Name leitet sich von seiner Masse ab, da das nukleäre Phosphoprotein 53 Kilodalton wiegt (Levine 1997).

Etwa die Hälfte aller menschlichen Tumoren ist durch eine Inaktivierung von p53 gekennzeichnet. Diese Inaktivierung ist in den meisten Fällen das direkte Ergebnis von Mutationen im p53-Gen von einzelnen Zellen. Eine indirekte Inaktivierung kann z.B. durch Bindung an virale Proteine oder durch Veränderung in Genen, deren Produkte mit p53 interagieren, stattfinden.

P53 arbeitet als Transkriptionsfaktor, der an hunderte verschiedene Promoterelemente im Genom binden kann und die Genexpression beeinflusst (Fields & Jang 1990, Raycroft et al. 1990, Kern et al. 1991). Es hat die Aufgaben das Zellwachstum durch Unterbrechung des Zellzyklus zu stoppen und so eine Reparatur des Schadens zu ermöglichen sowie die Zellen zu Seneszenz oder Apoptose zu veranlassen (Levine et al. 1991, Thor et al. 1992).

2.1.1 Funktionsweise von p53

Unter normalen Bedingungen reguliert p53 nur in geringem Maße seine abhängigen Gene. Eine Aktivierung kann durch verschiedene Stresssignale eingeleitet werden. Dazu gehören u.a. Schäden an der DNA, die durch UV-Licht (Maltzman & Czyzyk 1984), Hypoxie, Spindelgifte (siehe Glossar, Kap. 14), Stickstoffmonoxid, Kälteschock sowie denaturierte oder veränderte Proteine hervorgerufen werden können (Vafa et al. 2002). Durch die Aktivierung von p53 wird die Halbwertszeit verlängert und die Konzentration des Proteins in der Zelle steigt (Bodner et al. 1992, Price & Calderwood 1993, Maki & Howley 1997, Giaccia & Kastan 1998).

P53 vereint in seinen Funktionen zwei Mechanismen: Reparatur von Schäden und Apoptose. Durch verschiedene Prozesse und Wirkketten tritt das modifizierte Protein in die verschiedenen Transkriptionsabläufe der zuständigen Gene ein. Jede der oben genannten Läsionen löst eine

andere Reparaturantwort in der Zelle aus, so dass jeder Schaden spezifisch durch das modifizierte p53-Protein bearbeitet werden kann. Vor der Reparatur muss der Zellzyklus angehalten werden, um die Zelle aus Zellteilungsabläufen auszuschließen, damit jede genetische Manifestation des Fehlers vermieden werden kann. In den Reparaturprozess sind verschiedene Enzyme wie Proteinkinasen, Histonacetylasen und möglicherweise Histonmethy lasen involviert (Wang & El-Deiry 2007).

Um die irrtümliche Initialisierung der Apoptose durch p53 zu vermeiden, haben sich streng regulierende Mechanismen entwickelt. Jedoch ist es ebenso notwendig, dass eine schnelle Reaktion gewährleistet ist, wenn es der Schaden erfordert (Wahl et al. 2007). Nach bisherigem Kenntnisstand wird die Aktivierung der Apoptose von p53 hauptsächlich durch Modifikation auf Proteinebene beeinflusst, etwa durch Regulation der Proteinstabilität, post-translationale Modifikation, Protein-Protein Interaktion und subzelluläre Lokalisation. Eine Zusammenstellung für mögliche Kontrollwege ist bei Wahl und Kollegen (2007) nachzulesen.

2.1.2 Mutationen in p53 und Krebserkrankungen

Einige Tumoren haben Mechanismen entwickelt, um den Transport von p53 in den Nukleus zu stören, es stattdessen im Zytoplasma anzureichern und dort zu inaktivieren (Moll et al. 1992, Sun et al. 1992, Moll et al. 1995). Die normale p53-Funktion kann dabei durch verschiedene Mechanismen verloren gegangen sein. In den meisten Fällen kommt es zunächst zu einem Verlust einer chromosomalen Region oder eines ganzen 17p Chromosoms. Das verbleibende Allel ist dann häufig durch eine Mutation verändert. Bei Darm-, Gehirn-, Lungen-, Leber- und Blasen tumoren kommt es meist zu einer Inaktivierung beider Allele. Um eine teilweise Inaktivität von p53 hervorzurufen, genügt in anderen Fällen bereits eine *missense*-Mutation auf einem der Allele, wenn dadurch die Zielgene nicht mehr transkribiert werden können. Dieser „dominant-negative“ Effekt kann durch die erhöhte Stabilität und damit höhere intrazelluläre Konzentration des mutierten Proteins im Vergleich zum ursprünglichen Protein verstärkt werden (Kubbutat et al. 1997).

Die Mehrheit der p53-Mutationen ist aus der DNA-Bindedomäne von den Exons 5 bis 8 beschrieben, nur 13.6% kommen außerhalb dieser Region vor. Bei den Mutationen aus der Bindedomäne handelt es sich hauptsächlich um *missense*-Ereignisse, im Gegensatz dazu finden sich außerhalb dieser Exons verstärkt *frame-shift*- oder *nonsense*-Mutationen (Hjortsberg et al. 2008).

SNPs im p53-Netzwerk und daraus resultierende genetische Unterschiede zwischen Menschen können zu unterschiedlichen zellulären und molekularen Antworten auf Stresssignale führen. Das kann wiederum einen Einfluss auf das Alter bei Krebsentstehung, die Inzidenz des Krebses und das Ansprechen auf eine Therapie haben (Wang & El-Deiry 2007). Ein Beispiel ist die polymorphe Ausprägung des Codons 72 von p53 (Harris et al. 1986, Matlashewski et al. 1987). Eine prospektive Studie mit über 85jährigen Russen zeigte, dass homozygote Träger des Prolin-Genotyps häufiger Krebs entwickeln als homozygote Träger des Arginin-Genotyps. Die Prolin-Träger zeigen allerdings auch eine höhere Lebenserwartung (Smetannikova et al. 2004). Das Magenkrebsrisiko soll durch den homozygoten Prolin-Genotypen um das Vierfache steigen (Yi & Lee 2006).

Vererbare Keimbahnmutationen in p53 sind nur in wenigen Fällen beschrieben. Die angeborene Mutation führt durch den vollständigen Verlust der p53-Tumorsuppressorgen-Funktion bereits in frühen Jahren zur Tumorentstehung und wird als Li-Fraumeni-Syndrom bezeichnet (Varley et al. 1997).

Die meisten p53-Mutationen finden spontan statt, ohne dass ein Einfluss möglich wäre und Maßnahmen zur Vorbeugung ergriffen werden könnten.

Beispiele aus der molekularen Epidemiologie zeigen allerdings, dass einige Mutationen durch Umwelteinflüsse beeinflussbar und damit zu vermeiden sind. So können photo-induzierte Mutationen, die durch ultraviolette Strahlung hervorgerufen werden, Hautkrebs (Brash et al. 1991, Tornaletti et al. 1993) und Benzo(a)pyren aus Zigarettenrauch Lungenkrebs induzieren (Denissenko et al. 1996, Toyooka et al. 2003).

2.1.3 Mutationen in p53 und Magenkarzinome

Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 sind die häufigsten genetischen Veränderungen im menschlichen Magenkarzinom und in bis zu 77% der Tumoren beschrieben (Yamada et al. 1991, Matozaki et al. 1992, Correa & Shiao 1994, Fenoglio-Preiser et al. 2003). Nachweise der Mutationen sind bereits bei Magenläsionen in potentiellen Frühstadien von Krebs (atrophische Gastritis, intestinale Metaplasie und Dysplasie) bekannt (Shiao et al. 1994, Levi et al. 1996).

Die Überexpression von p53 wurde in 17 bis 91% der invasiven Magenkarzinome beobachtet (Fenoglio-Preiser et al. 2003). Der Grad der Expression korreliert mit der Proliferationsrate der Tumoren, was möglicherweise die höhere Expression von p53 in intestinalen Magenerkrankungen im Vergleich mit diffusen erklärt (Ioachim et al. 1997).

Von Magenkarzinomen ist ein großes p53-Mutationsspektrum bekannt, dennoch häufen sich viele Mutationen an ganz bestimmten Positionen (*Hotspots*). In einer absteigenden Häufigkeit sind bei Magenkrebs besonders die Codons 175, 248, 273, 282, 245 und 213 von Basenaustauschen betroffen, die sich zudem alle bei CpG-Inseln (*CpG sites*) befinden. Die häufigsten Veränderungen sind bei Europäern G:C zu A:T-Transitionen (Hongyo et al. 1995, Fenoglio-Preiser et al. 2003).

In der Genese des Magenkarzinoms kann es auch zu einem Verlust der Heterozygotie (LOH, *loss of heterozygosity*) kommen, wenn ein Allel verloren geht (Kap. 2.1.2). LOH-Ereignisse von p53-Allelen wurden im Zusammenhang mit Magenkrebs in 26 bis 83% der untersuchten Fälle identifiziert (Fenoglio-Preiser et al. 2003). Kombinationen von LOH und p53-Mutationen wurden in bis zu 60% der Tumoren gefunden (Sano et al. 1991), grundsätzlich sind beide Ereignisse jedoch unabhängig voneinander. Kommt es durch eine Punktmutation schon zu einer Konformationsänderung des Wildtypproteins und damit zu einem Funktionsverlust (Milner & Medcalf 1991), ist ein zweites Ereignis, sei es eine weitere Mutation oder LOH, für die Entstehung von Magenkarzinomen oft nicht mehr erforderlich.

Ein Tumor kann auch von mehr als einer Mutation betroffen sein (Flejou et al. 1999). Insbesondere in Frühstadien der Tumorgenese sind Zellen mit unterschiedlichem p53-Mutationsstatus bekannt. Anschließend entwickelt sich eine Mutation stärker weiter, proliferiert und bildet sich in fortgeschrittenen Stadien als die dominante Mutation heraus (Iwamatsu et al. 2001).

2.1.4 p53-Datenbanken

Die Datenbank der *International Agency for Cancer Research* (IARC) (www-p53.iarc.fr) ist ein Projekt der Arbeitsgruppe um Pierre Hainaut aus Lyon, Frankreich. 1994 gegründet, enthält sie inzwischen mehr als 26.000 Einträge für somatische und mehr als 500 für Keimbahnmutationen. 80% dieser Einträge sind *missense*-Mutationen (Petitjean et al. 2007). Zusätzlich zur eigentlichen Datenbank sind Analysen für somatische Mutationen für einzelne Tumortypen online möglich. Für Magenkarzinome wird für p53-Mutationen eine Frequenz von 32.2% angegeben.

Eine weitere, unabhängige Datenbank, *The TP53 Web Site*, ist online unter <http://p53.free.fr/> zu finden. Die Leitung unterliegt Thierry Soussi und dem Krebszentrum Karolinska in Schweden. Fast 85% der 30.500 Einträge der *UMD_TP53 Mutation Database* sind *missense*-Mutationen (Hjortsberg et al. 2008). Über die eigentliche Datenbank hinaus sind auch Informationen zu p53-Mutationen und einzelnen Tumortypen vorhanden. Für Magenkarzinome sind Daten für 2.500 Fälle mit etwa 740 Mutanten verzeichnet. Daraus ergibt sich eine Frequenz von knapp 30%.

Beide Datenbanken werden kontinuierlich aktualisiert und ermöglichen damit einen umfassenden Vergleich der eigenen Forschungsergebnisse mit publizierten Daten.

2.1.5 p53 und *Helicobacter pylori*

Seit Beginn der 1990er Jahre wird ein Zusammenhang zwischen einer Infektion mit dem Bakterium *H. pylori* und der Entwicklung von Magenkarzinomen vermutet (Nomura et al. 1991, Asaka et al. 1995). Die Vermutung konnte bestätigt werden, als bei p53 *knock-out* Mäusen eine *Helicobacter*-Infektion die Entwicklung von Magendysplasie bewirkte, die Infektion bei normalen Mäusen hingegen keine neoplastischen Veränderungen hervorrief (Dunn et al. 1995). Durch den Verlust der p53-Funktion wird vermutlich die genetische Instabilität der Mukosa erhöht, welche die Entstehung von Magenerkrankungen erleichtert.

Ferner wurden erhöhte p53-Mengen in *H. pylori*-infizierter Magenschleimhaut nachgewiesen (Hibi et al. 1997, Jones et al. 1997). Grund für die Expression von p53 könnte der Schaden sein, der durch die *H. pylori*-Infektion in der Magenschleimhaut hervorgerufen wird. Nach erfolgreicher Eradikation von *H. pylori* sank das p53-Level wieder auf das Niveau vor der Infektion (Hibi et al. 1997, Satoh et al. 2001).

Innerhalb der mit *H. pylori* infizierten Magenkrebs-Patienten sind Veränderungen im p53-Gen häufiger bei Patienten beobachtet worden, die Träger des Virulenzfaktors *cag* sind (siehe Kap. 2.2.3) (Deguchi et al. 2001, Kubicka et al. 2002, Shibata et al. 2002).

2.1.6 Kriterien für die Marker- und Methodenauswahl

In der vorliegenden Arbeit werden Tumormutationen von historischen Magenkarzinomen mit rezenten verglichen. Für die Untersuchung von Tumormutationen sollte der Marker verschiedene Kriterien erfüllen. Ein Kriterium war, dass der Marker der Wahl mit einer möglichst hohen Mutationsfrequenz bei Magenkarzinomen vorkommt, um auch bei geringer Probenzahl genetische Veränderungen detektierbar machen zu können. Ferner war eine Voraussetzung, dass Vergleichsmöglichkeiten zu Mutationen von rezenten Patienten zur Verfügung stehen und die Größe der Exons für die Analyse an aDNA geeignet sind. Diese Kriterien erfüllen die Exons 5 bis 8 des Tumorsuppressorgens p53.

Kriterien für eine Analysemethode, um Mutationen in p53 identifizieren zu können, waren Verlässlichkeit und Aussagekraft. Außerdem musste eine Technik Verwendung finden, die für die

Analyse alter DNA geeignet ist und gleichzeitig den Datenvergleich mit aktuellen Publikationen ermöglicht. Diese Kriterien wurden durch die Sequenzierung erfüllt.

2.2 *Helicobacter pylori* und die Entstehung von Magenerkrankungen

Molekulare Methoden ermöglichen den Nachweis von Krankheitserregern durch den Nachweis deren Erbguts. Auf diese Weise können Erreger auch ohne sichtbare Krankheitssymptome an Skelett, Weichteilen oder Organen nachgewiesen sowie Rückschlüsse auf Epidemiologie, Geschichte und Verbreitung gezogen werden. Einer dieser Erreger ist *H. pylori*. Eine Infektion stellt ein anerkanntes Risiko für die Entwicklung von Magenkrebs dar (vgl. Kap. 1.2.2).

2.2.1 Anpassung von *H. pylori* an das Leben im Magen

H. pylori hat seine Lebensnische nicht nur im Magen, sondern auch auf den Schleimhäuten im Duodenum und Ösophagus. Innerhalb des Magens kann es entweder frei in der Schleimschicht oder angehängt an Epithelzellen leben (Petersen et al. 2001, Amieva et al. 2002). *H. pylori* ist im Laufe der Evolution kein azidophiler Organismus geworden, sondern hat eine andere Anpassungsstrategie entwickelt, um im Magen leben zu können. Um die Magensäure zu puffern, sind 15% der gesamten Proteine für die Bildung von Urease verantwortlich. Bei einem externen pH, der kleiner als 6.5 ist, öffnen sich spezielle Kanäle in der Zytoplasmamembran der Bakterien, die Harnstoff in das Periplasma transportieren. Durch die Hydrolyse von Harnstoff entsteht Ammoniak, welches die Magensäure im periplasmatischen Raum durch Bildung von Ammonium und Kohlenstoffdioxid neutralisiert, so dass das Membranpotential des Zytoplasmas beibehalten werden kann (Weeks et al. 2000). Durch die Neutralisierungsreaktion wird außerdem ein Gradient aufgebaut, der zur Orientierung dient (Schreiber et al. 2004).

Kommt Ammoniak in hoher Konzentration vor, schädigt es die Mukosa (Malfertheiner & Nilius 1994). Das Urease-produzierende Gen ist in allen Stämmen konserviert und wird daher in der Diagnostik als *H. pylori*-Nachweis verwendet.

2.2.2 Risikofaktoren für die Infektion mit *H. pylori*

H. pylori ist mit deutlichen Frequenzunterschieden weltweit verbreitet. Die Infektionshäufigkeit liegt zwischen 25% in den Industrieländern und 80% in den Entwicklungsländern (Parsonnet 1995, Pounder & Ng 1995).

Die Infektion mit *H. pylori* erfolgt in den meisten Fällen im Kindesalter auf oralem Wege und dauert das ganze Leben an, sofern keine Eradikation vorgenommen wird (Kap. 2.2.4). In 90% der Fälle erfolgt eine Infektion vor dem zehnten Lebensjahr (Bardhan 1997). Da der genetische Fingerabdruck der bakteriellen Isolate der Kinder in den meisten Fällen vollständig mit dem der Mutter übereinstimmt (Konno et al. 2005), liegt die Vermutung nahe, dass die Transmission von der Mutter auf das Kind z.B. durch das Vorkauen der Nahrung stattfindet (Albenque et al. 1990). Zu einer Ansteckung mit dem Magenbakterien kann es auch zwischen Eheleuten (Georgopoulos et al. 1996, Brenner et al. 1999) und Geschwistern kommen (Kivi et al. 2005).

Weitere Übertragungswege spielen eine untergeordnete Rolle. Ein erhöhtes Risiko durch eine gastro-orale Übertragung in der Nähe von Erbrochenem (Parsonnet et al. 1999, Lizza et al. 2000) oder durch eine fäkal-orale Übertragung von Fäkalien auf Nahrungsmittel durch Fliegen (Hopkins et al. 1993, Parsonnet et al. 1999, Khalifa et al. 2010) wird diskutiert.

Als größter Risikofaktor für eine Ansteckung mit *H. pylori* gilt der sozioökonomische Status der Familie. Dazu gehören Einkommen und Bildung der Eltern, Bewohnerdichte auf dem Wohnraum (McCallion et al. 1996, Torres et al. 1998) sowie die hygienischen Bedingungen während der Kindheit (Klein et al. 1991). 1995 betrug die Infektionsrate bei Kindern in St. Petersburg noch 44%. Zehn Jahre später, mit einer deutlichen Verbesserung der hygienischen Bedingungen in den Haushalten und dem Beginn der Eradikation, waren nur noch 13% *H. pylori*-positiv (Tkachenko et al. 2007).

Eine schnellere Besserung in den Lebensbedingungen der Industrieländer gegenüber den Entwicklungsländern erklärt auch die fallenden Infektionsraten in den westlichen Ländern (The EUROGAST Study Group 1993, Brown 2000).

Trotz einer weltweiten Infektion mit *H. pylori* gibt es Unterschiede in der Prävalenz der Infektion zwischen Subpopulationen eines Landes. In ethnischen Gruppen wie afrikanisch- und asiatisch-stämmigen Amerikanern sind deutlich mehr Menschen *H. pylori*-positiv als bei europäisch-stämmigen. Außerdem sind in den Vereinigten Staaten weniger ökonomisch gut gestellte Menschen *Helicobacter*-Träger als in den sozial benachteiligten Gruppen und bei Immigranten (Malaty et al. 1992). Ursächlich scheint, übereinstimmend mit den genannten Faktoren, ein geringerer sozioökonomischer Status während der Kindheit zu sein (Malaty et al. 1998, Malaty 2007). Darüber hinaus werden Unterschiede in den Bevölkerungsgruppen auf den Einfluss von Umweltkomponenten und genetischen Faktoren des Trägers zurückgeführt (Graham et al. 1994, Malaty et al. 1994).

2.2.3 *H. pylori* und Erkrankungen des Magens

Obwohl etwa die Hälfte der Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert ist (The EUROGAST Study Group 1993), entwickelt nur etwa 1% der Infizierten Geschwüre oder Magenkrebs (Kuipers 1999). Die Besiedlung des Magens durch *H. pylori* kann chronische Magenentzündungen hervorrufen, die eine Vielzahl von Krankheiten zur Folge haben können (Abb. 1). Die Schwere der Krankheit kann von oberflächlicher Gastritis, gastrischer Atrophie, intestinaler Metaplasie und Dysplasie bis zu Magenkarzinomen reichen (vgl. Kap. 1.2.3, Cover & Blaser 1992).

Der häufigste Phänotyp einer durch *H. pylori* induzierten Magenkrankung ist eine einfache oder gutartige Gastritis. Eine Parallele zwischen dem Kolonisationsgrad der Magenschleimhaut mit *H. pylori* und dem Aktivitätsgrad der Gastritis konnte nachgewiesen werden (Stolte et al. 1990, Stolte 1992).

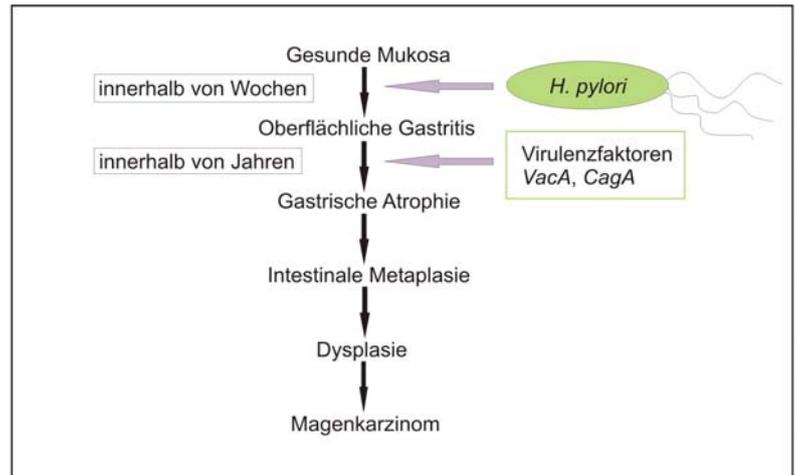


Abb. 1: Mögliche Entwicklungsstufen einer Magenkrebsmanifestation des intestinalen Typs durch das Pathogen *H. pylori* und dessen Virulenzfaktoren.

Ein zweiter Phänotyp ist das Ulcus duodenum, das sich bei 10 bis 15% der infizierten Menschen entwickelt. Diese Form der Gastritis zeichnet sich durch antrale Entzündung und einen hohen Gastringehalt bei normaler Magensäuresekretion aus (El-Omar et al. 1995).

Der dritte Phänotyp ist das Magenkarzinom, welches deutlich seltener ist und eine Gastritis im gesamten Korpus des Magens beinhaltet. Zusätzlich können Virulenzfaktoren von *H. pylori* (*VacA*, *CagA*, Kap. 2.2.4) das Erkrankungsrisiko weiter erhöhen (Talley 2008). Interessanterweise zeigen Untersuchungen, dass Menschen mit Zwölffingerdarmgeschwür vor der Magenkrebsentstehung geschützt sind (Hunt 1996).

2.2.4 Virulenzfaktoren von *H. pylori* und Magenkrankungen

Die weltweite Verbreitung von *H. pylori* und die doch vergleichsweise geringe Inzidenz der Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre waren zunächst schlecht erklärbar, bis man die Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktoren entdeckte. Man fand heraus, dass einige *Helicobacter*-Gene durch horizontalen Gentransfer von anderen Bakterienspezies erworben oder durch natürliche Transformation von anderen *H. pylori*-Stämmen übertragen worden sind. Studien zeigten große Ab-

weichungen zwischen den einzelnen Isolaten und dass etwa 7% der Gene für jeden Stamm spezifisch sind (Tomb et al. 1997, Alm et al. 1999). Diese Diversität der Stämme erklärt einen Teil der unterschiedlichen Auswirkung auf infizierte Menschen.

Ein Beispiel für einen Virulenzfaktor ist die *cag* Pathogenitätsinsel (*cag* PAI), ein 40 Kilobasen großer DNA-Abschnitt, der aus mehr als 30 Genen besteht, die wiederum für das Antigen *CagA* (*cytotoxin-associated gene A*) kodieren (Xiang et al. 1995, Akopyants et al. 1998).

Patienten, die mit *cag*-positiven *H. pylori*-Stämmen infiziert sind, zeigen eine höhere Proliferation im Magenepithel als solche ohne *cag* PAI. Zusätzlich sind die Apoptoseraten bei *cag*-positiven Stämmen geringer als bei negativen. Eine erhöhte Proliferation der infizierten Zellen ohne erhöhte Apoptose könnte daher das größere Magenkrebsrisiko bei Patienten mit *cag*-positiven Stämmen erklären (Peek Jr et al. 1997). Hier liegt zum Teil die Tatsache begründet, dass es in Ostasien, wo nahezu alle Stämme *cag*-positiv sind, eine höhere Magenkarzinomfrequenz gibt als in den westlichen Industrieländern, wo die *cag* PAI nur bei etwa 20-60% der Stämme identifiziert werden konnte (Konturek et al. 2009, Yamaoka 2009).

Zwei Varianten der *cag* PAI sind bekannt, die sich durch Polymorphismen der Genabschnitte unterscheiden lassen. Das ostasiatische *CagA* wurde bisher nur in *H. pylori*-Isolaten von Menschen gefunden, die dort geboren und ihre ersten Lebensjahre dort verbracht haben (van Doorn et al. 1999). Das westliche *CagA* ist hingegen in der restlichen Welt gleich verteilt (Yamaoka et al. 2002). Bei der Frage, ob und welche Erkrankungen auftreten, kann es entscheidend sein, welcher Typ des polymorphen *CagA* vorliegt, da dies bei verschiedenen Typen unterschiedliche Effekte bei zellulären Signalwegen und verschiedene Krankheitsrisiken zur Folge hat (Yamaoka et al. 1999, Higashi et al. 2002, Argent et al. 2004, Argent et al. 2008, Basso et al. 2008).

Zunächst konnte nicht geklärt werden, wie das *CagA*-Protein für seine schädigende Wirkung in die Epithelzellen des Magens gelangt. Inzwischen ist bekannt, dass einige Gene nahe *CagA* homolog zu Bestandteilen eines Typ 4-Sekretionssystems sind, die für makromolekulare Strukturen kodieren und wie kleine Nadeln einen Kontakt zwischen Wirt und Pathogen herstellen (Odenbreit et al. 2000). Durch diesen Kontakt können die bakteriellen Produkte in die Wirtszellen injiziert werden (Censini et al. 1996). Folgen der Injektion sind starke Veränderungen im Zytoskelett des Wirts, die letztendlich zu einer Auflösung des Zellverbandes und der Zell-Matrix-Interaktion führen können (Konturek et al. 2009).

Eine weitere Besonderheit ist, dass die Epithelzellen des Wirts durch die Anwesenheit von *CagA* zu einer Überexpression und Freisetzung von großen Mengen von Interleukin-8 angeregt werden

(Crabtree et al. 1995). Das proinflammatorische Zytokin induziert eine Immunantwort, die durch eine erhöhte Expression von weiteren Zytokinen wie Interleukin-1 β und TNF α (*tumor necrosis factor α*) begleitet wird. Das führt zu einer verstärkten Entzündung und zu einer geringeren Salzsäureproduktion durch die Parietalzellen des Magens. Auf diese Weise erhöht sich der pH-Wert des Magens und schafft ein optimales Milieu für die Bakterien.

Bislang konnte jedoch nicht geklärt werden, unter welchem konkreten Einfluss *CagA* für den Träger pathogen wird und welche Charakteristika Menschen besitzen, die keine Krankheitsbilder entwickeln (Amieva & El-Omar 2008).

Ein weiterer Virulenzfaktor von *H. pylori* ist das *vacuolating cytotoxin gene (VacA)* (Cover 1996, Atherton 1998), welches für das gleichnamige Protein kodiert und im Gegensatz zur *cag* PAI in allen bekannten Stämmen vorkommt (Kuck et al. 2001). Bakterielle Toxine wie *VacA* haben in den meisten Fällen die Funktion, die Bakterien bei der Kolonisierung des Wirts zu unterstützen (Schmitt & Haas 1994).

Das *VacA*-Protein hat vielfältige Auswirkungen auf die Epithelzellen, beispielsweise durch Bildung von Vakuolen in der Zellmembran des Magenepithels, durch Zerstörung von Zellen, durch eine Erhöhung der intrazellulären Permeabilität und die Veränderung der Apoptose (Ilver et al. 2004, Yuan et al. 2004). Außerdem werden *VacA* entzündungsfördernde Effekte zugeschrieben, da eine lokal begrenzte Immunsuppression durch die Hemmung der Aktivität und Proliferation von T-Lymphozyten hervorgerufen wird (Boncristiano et al. 2003, Gebert et al. 2003). Möglich ist auch, dass *VacA* durch Schädigung der Epithelbarriere Nährstoffe freisetzt, die für das Wachstum in der Magenschleimhaut nötig sind (Cover & Blanke 2005).

Innerhalb der *VacA*-Sequenz sind viele Polymorphismen beschrieben, die eine unterschiedliche Toxizität und in Folge dessen unterschiedliche Krankheitsbilder und Schweregrade der Erkrankung nach sich ziehen (Cover & Blanke 2005). Man nimmt an, dass die Mosaikstruktur von *VacA* das Ergebnis häufiger Rekombination ist (Owen et al. 2002, Blaser & Atherton 2004).

2.2.5 *H. pylori*-Eradikation und Resistenzentwicklung gegen Antibiotika

Elf Jahre nach der ersten Kultivierung von *H. pylori* (Warren & Marshall 1983) empfahl das National Institute of Health (USA) Patienten mit andauernden Magenbeschwerden und nachgewiesener *Helicobacter*-Infektion eine dreifach Therapie mit Protonenpumpenhemmern in Kombination mit Clarithromycin und Amoxicillin oder Metronidazol (National Institute of Health 1994). Es zeigt sich, dass es seit dem Therapiebeginn immer häufiger Berichte über die steigende Resistenz von *H. pylori*-Stämmen gegen diese Antibiotika gibt (Kalach et al. 2001a). Die größte

Resistenz der *H. pylori*-Stämme richtet sich gegen Metronidazol, gefolgt von Clarithromycin (Glupczynski et al. 1992, Kalach et al. 2001b).

Eine japanische Studie macht die Schnelligkeit der Resistenzentwicklung deutlich. Der molekulare Fingerabdruck der Stämme der Eltern und der Kinder war anfangs identisch, nach Behandlung mit Clarithromycin, z.B. gegen Atemwegserkrankungen, wurden viele der aus Kindern isolierten Stämme resistent (Glupczynski et al. 2001).

Die der Metronidazol-Resistenz zugrunde liegenden Mechanismen bei *H. pylori* sind bisher nicht eindeutig geklärt (Mendz & Mégraud 2002, Chisholm & Owen 2003). Lediglich für Clarithromycin gibt es reproduzierbare Daten. Die hervorgerufene Resistenz richtet sich gegen die Makrolid-Bestandteile des Medikaments, welche gegen endozytisch lebende intrazelluläre Bakterien wirken (Hulten et al. 1996). Das Medikament bindet an die 50S-ribosomale Untereinheit und blockiert die Translation (Schlünzen et al. 2001). Die Grundlage für die Resistenz gegen Clarithromycin sind Punktmutationen im 23S rRNA kodierenden Gen, welches die Hauptkomponente der 50S-Untereinheit bildet. Die Mutationen treten in der Peptidyltransferase-Region der V Domäne auf und verhindern, dass das Medikament binden kann (Taylor et al. 1997). Die Punktmutationen, die am häufigsten auftreten, sind A2143G mit 45,2% und A2142G mit 33,3%. A2142C kommt mit 1,6% deutlich seltener vor (van Doorn et al. 2001). Noch seltener wurden die Mutationen A2115G, G2141A und T2717C beschrieben (Hultén et al. 1997, Fontana et al. 2002).

In der Literatur gibt es kontroverse Ergebnisse zur Frage, ob die Resistenz der Bakterien ohne selektiven Druck stabil (Mégraud et al. 1996, Hultén et al. 1997) oder reversibel (Xia et al. 1996) ist. Allgemein gilt, dass die Zahl der resistenten Stämme nach der Behandlung auf bis zu 80% ansteigen kann (Maggi-Solcà et al. 2000, Soltermann et al. 2005).

Da die Einflüsse von *H. pylori* auf den Magen des Wirts frühe Ereignisse in der Entwicklung von Karzinomen darstellen, garantiert eine erfolgreiche Behandlung keinesfalls ein Leben ohne spätere Magenerkrankungen. Tatsächlich wird durch eine Eradikation die Anzahl der Patienten, die nach fünf Jahren Krebs entwickeln, nur wenig reduziert, wenn die Schädigung des Magens schon fortgeschritten ist (Wong et al. 2004). Eine frühzeitige und damit präventive Behandlung wird daher empfohlen (Malfertheiner et al. 2010).

2.2.6 Marker- und Methodenauswahl für die Identifikation von *H. pylori*

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist, den Risikofaktor *H. pylori* für die Entstehung von Magenkarzinomen (National Institute of Health 1994) in den Gewebeproben zu identifizieren. Da das vorliegende Material konservierte Feuchtpräparate ganzer Mägen sind, können nur PCR-basierte Methoden Anwendung finden. Aufgrund der hohen Sensibilität und Spezifität des molekularen Nachweises (Tankovic et al. 2007) kann *H. pylori* nicht nur identifiziert werden, sondern ein erfolgreicher Nachweis kann auch Informationen zu Virulenzfaktoren und dem damit verbundenen Risiko für Magenkrankheiten des Patienten oder zu Behandlungseinschränkungen durch Antibiotikaresistenz liefern. Im Folgenden wird beschrieben welche Marker für die jeweiligen Fragestellungen zu *H. pylori* ausgesucht wurden.

16S rRNA Gen

Der grundsätzliche Nachweis von *H. pylori* erfolgt durch die Anwesenheit des 16S rRNA Gens. Dieses ribosomale Gen ermöglicht sowohl einen generellen Nachweis von Bakterien als auch eine konkrete Identifizierung der Bakterienspezies (Kolbert & Persing 1999). Da *H. pylori* eine hoch diverse Art darstellt, muss eine Region gewählt werden, die in allen Stämmen konserviert vorliegt und eine Trennung von anderen Bakteriengattungen ermöglicht.

Es ist anzunehmen, dass auch die bakterielle DNA durch chemische Prozesse aus den Bestandteilen der Konservierungsflüssigkeiten degradiert wurde. Des Weiteren ist anzunehmen, dass die bakterielle DNA im Vergleich zur humanen in einer geringen Kopienzahl vorliegt. Aufgrund dieser Voraussetzungen wurde die sensible Real-Time PCR für den *H. pylori*-Nachweis ausgewählt (Kap. 6.9).

***cag* Pathogenitätsinsel**

Stellvertretend für die ganze Pathogenitätsinsel wird in epidemiologischen Studien das *CagA*-Zytotoxin bzw. dessen Gen untersucht (Konturek et al. 2009, Yamaoka 2009). Daher wurde sich auch in der vorliegenden Arbeit darauf beschränkt. Der Nachweis findet an konservierten DNA-Abschnitten des *CagA*-Gens durch die konventionelle PCR mit Überprüfung des Amplifikationserfolges durch die Agarose-Gelelektrophorese statt (Kap. 6.9.3).

23S rRNA Gen

Ziel dieses thematischen Teilbereichs sind Hinweise zur Beantwortung der Frage, ob resistenzverursachende Mutationen gegen das Antibiotikum Clarithromycin erst durch den selektiven Druck der Behandlung entstanden sind oder ob sich die Punktmutationen bereits vor mehr als 60

Jahren ohne entsprechenden selektiven Druck in den Bakterien etabliert hatten. Dazu wird ein Abschnitt des 23S rRNA Gens von *H. pylori* in den historischen Proben untersucht.

Die potentiellen Mutationsloci werden durch eine SBE-basierte Analyse untersucht (*single base extension*, Kap. 6.9.4).

Des Weiteren ermöglicht die Identifikation weiterer *H. pylori*-Gene in Form der *cag* Pathogenitätsinsel und des 23S rRNA Gens eine Kontrolle und Verifikation der durch die Real-Time PCR ermittelten Ergebnisse des 16S rRNA Gens.

3 Medizinhistorische Museen und pathologisch-anatomische Sammlungen

Das Sammeln von anatomischen und pathologischen Präparaten gewann im 17. Jahrhundert an Bedeutung, als die Herstellungstechniken für Dauerpräparate deutlich verbessert worden waren. Der Gebrauch von Alkohol zur Konservierung seit 1663 und die Verwendung von geschmolzenem und gefärbtem Wachs anstelle von Wasser seit 1666 waren Teile des Fortschritts in der Sammlungsentstehung. In allen Städten entstanden Sammlungen, so dass Mitte des 18. Jahrhunderts in Berlin „drei anatomisch-pathologische Privatsammlungen in freundschaftlichem Wettbewerb miteinander standen“ (Artelt 1936).

Im ausgehenden 20. und beginnenden 21. Jahrhundert reduzierte sich die Bedeutung der Sammlungen. In Fällen, in denen keine ausreichende Verbindung zwischen Fachdisziplin und Quellen-sicherung stattgefunden hatte, bestand das Risiko der Verwahrlosung, Plünderung und des damit verbundenen Wissensverlustes (Habrich 1991). In einigen Fällen sind die Präparate trotz allem noch vorhanden, jedoch fehlen sämtliche Informationen zu diesen Präparaten sowie zu deren Herkunft und Herstellungstechniken. Dieses Schicksal eint alle im Folgenden vorgestellten Sammlungen, weshalb die Präparate als solche die einzige Zugangsquelle für Informationen darstellen. Ausnahmen hierfür sind lediglich Proben aus dem Berliner Medizinhistorischen Museum, da für viele Feuchtpräparate Kurzbeschreibungen zu Geschlecht, Alter und Diagnose der Patienten vorhanden sind.

3.1 Pathologisch-anatomisches Bundesmuseum Wien

Das Sammeln und Präparieren menschlicher Körperteile hat in Wien eine lange Tradition. Die Geschichte des Pathologisch-anatomischen Bundesmuseum begann im Jahr 1795, als der Sanitätsreferenten Josef Pasqual Ferro den Ärzten im Krankenhaus anordnete, „merkwürdige Stücke in Weingeist aufzubewahren“ (Patzak 2009).

Die erste systematische Sammlungsarbeit wurde von Aloys Rudolf Vetter vollzogen, durch den die Präparatanzahl schnell von 4 auf 400 stieg. Leider ist aus dieser Zeit kein Museumskatalog überliefert worden. Die ältesten Eintragungen gehen auf einen Katalog von 1828 zurück (Patzak 2009).

Das Bundesmuseum hat seine Ausstellungs- und Lagerflächen heute im Wiener Narrenturm, der 1784 als „Irrenthurm“ erbaut wurde (Abb. 2). Es umfasst eine Sammlung von 50.000 Objekten, die in 200 Jahren zusammengetragen worden sind. Nahezu jede Konservierungsart ist vorhanden, den größten Anteil nehmen Feucht- und Trockenpräparaten (Abb. 3) ein, die meist aus Lei-

chenteilen präpariert wurden. Außerdem gibt es viele Keroplastiken wie Moulagen und Bossierungen. Die Sammlung zeichnet sich durch eine Vielzahl von gesunden Organen und Körperteilen, vielfältigen Krankheitsbildern, Organveränderungen und genetisch verursachten Missbildungen aus (Patzak 2009).



Abb. 2: Der Wiener Narrenturm, in dem heute das Bundesmuseum untergebracht ist.



Abb. 3: Das Bild zeigt die Lagerung der Feuchtpräparate im Wiener Bundesmuseum.

3.2 Berliner Medizinhistorisches Museum der Charité

Das Berliner Medizinhistorische Museum der Charité beherbergt einen großen Bestand an Feucht- und Trockenpräparaten, dessen Kern durch den Berliner Pathologen Rudolf Virchow (1821-1902) zusammengetragen worden ist. Bestand die Sammlung vor Virchow aus etwa 1.500 Objekten, so wuchs sie unter seiner Führung bis 1890 auf 19.000 Sammlungsstücke an. Ziel dieser Sammlung war ein Vergleich gesunder und kranker Körperteile, um den charakteristischen Verlauf von Krankheiten zu dokumentieren. Die Sammlung diente ursprünglich ausschließlich Lehr- und Studienzwecken, war später aber auch der Öffentlichkeit zugänglich, um Kenntnisse zu Gesundheit und Krankheit in der Bevölkerung zu verbreiten (Krietsch & Dietel 1996).

Vor dem zweiten Weltkrieg umfasste die Sammlung etwa 26.000 Präparate, von denen die Mehrheit durch Bomben zerstört wurde, so dass nach dem Krieg nur noch 2.500 Objekte vorhanden waren. Durch einen Brand des Dachstuhls in den 1950er Jahren kam es zu weiteren Verlusten. Seit den ausgehenden 1940er Jahren wird die Sammlung wieder aufgebaut und umfasst inzwischen wieder etwa 10.000 Objekte (Krietsch & Dietel 1996).

3.3 Sammlung der Universität Tartu, Estland

Die anatomische Sammlung an der Universität Tartu, damals Dorpat, begann mit Heinrich Friedrich Isenflamm (1771-1825), der aus Deutschland emigrierte und viele anatomische und pathoanatomische Präparate für seine Lehrveranstaltungen mitbrachte (Aunapuu et al. 2005). Viele bekannte Anatomen wie z.B. Jakob Ernst Arthur Böttcher (1831-1889) brachten ihr Wissen und neue Musealpräparate in die Sammlung ein. Ein offizielles Museum der Anatomie wurde 1890 unter August Antonius Rauber (1841-1917) eröffnet. Heute sind allerdings nur noch wenige Ausstellungsobjekte erhalten, da viele Präparate in verschiedenen Kriegen zerstört wurden (Aunapuu et al. 2005). So ist beispielsweise nicht bekannt welcher Herkunft die in dieser Arbeit verwendeten Proben sind (pers. Mitteilung A. Arend).

3.4 Medizinhistorisches Museum Zürich

Die Geschichte des Medizinhistorischen Museums in Zürich begann mit Gustav Adolf Wehrli (1888-1949), der von verschiedenen Reisen Naturalien mitbrachte und konservierte. Durch Nachlässe verstorbener Ärzte und Ankäufe medizinischer Geräte wuchs die Sammlung stetig, so dass ab 1921 eigene Räume zur Unterbringung notwendig waren. Nach Wehrlis Tod begann die wissenschaftliche Erschließung und thematische Sortierung der Sammlung, die mit dem Museumsdidaktiker Erwin H. Ackerknecht ab 1957 ihren Höhepunkt fand. Ab 1961 wurde das neugestaltete Museum öffentlich zugänglich gemacht. Weitere Umstrukturierungen folgten, bis 1990 das neugestaltete Museum eröffnet wurde (Mörgeli 1990).

In welchem Zusammenhang die derzeitige Feuchtgewebesammlung das medizinhistorische Institut erreichte, ist nicht bekannt. Denkbar ist, dass es durch Auflösung einer Abteilung oder eines Instituts vor der Entsorgung gerettet wurde und auf diese Weise in dessen Besitz gelangte (pers. Mitteilung Ch. Mörgeli). Eine Nutzung für Lehr- oder Ausstellungszwecke gab es bis Januar 2010 nicht.

4 Material

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit standen Gewebeproben von 51 Individuen mit der historischen Diagnose Magenkarzinom zur Verfügung. Die Proben stammen aus dem Pathologisch-anatomischen Bundesmuseum Wien, den Medizinhistorischen Museen Berlin und Zürich und aus der Anatomischen Sammlung der Universität Tartu.

Das Hauptkriterium für die Probenauswahl war das Alter der Proben, welches an dem Jahr, in dem die jeweilige Probe in den Sammlungen aufgenommen wurde, ableitbar ist. Die Proben sind etwa 50 bis 180 Jahre alt. Ein zweites Kriterium richtete sich nach der pathologischen Diagnose, nämlich Karzinomerkrankungen des Magens. Von allen Proben -insbesondere in uneindeutigen Fällen bzw. bei Proben ohne Spezifizierung der Krankheit- wurden Gewebeproben entnommen und histologisch begutachtet. Proben ohne nachweisbares Karzinomgewebe wurden aus der Analyse entfernt. Ein drittes Kriterium war das Alter der Patienten. Bei Proben mit ähnlicher Diagnose wurden bevorzugt Proben mit mittlerem bis höherem Individualalter ausgesucht, da Magenkarzinome bei jüngeren Menschen ein seltenes Ereignis darstellen und in diesen Fällen häufig vererbt sind.

Im Folgenden werden die Proben der einzelnen Sammlungen näher beschrieben.

Die Bezeichnung der Berliner Präparate ergibt sich aus der Probe und dem Jahr, in dem die Probe in die Sammlung aufgenommen wurde. Begleitende Informationen zu der Probenbenennung aus Tartu existieren nicht, die Probennummern geben aber Grund zur Annahme, dass abhängig von der Diagnose, in diesem Fall Magenkrankheiten, eine durchgängige Nummerierung erfolgte. Bei Proben aus Wien verhält sich die Durchnummerierung vermutlich ähnlich wie in Berlin, allerdings ist die Jahresangabe kein Teil der Probenbezeichnung. Bundesmuseumintern wird jeder Probe zusätzlich die Bezeichnung „MN“ für „Museumsnummer“ vorangestellt.

Die Züricher Proben folgen dem beschriebenen Schema. Die Proben mit den Nummern „1“ und „2“ besaßen keine Kennzeichnung, diese Nummern wurden neu vergeben. Entsprechend existieren auch keine Beschreibungen zur Pathologie.

Die gelbe Substanz am oberen Rand von 1294/1964 (Abb. 4) und 11768 (Abb. 5) ist Fettgewebe. Unterhalb des Fetts ist Blut eingelagert, welches durch die Fixierung braun gefärbt wurde. Zu beiden Seiten des Präparates befindet sich Muskelwand, die von einem differenzierten Karzinom durchzogen ist. 11769 ist durch die Fixierung sehr dunkel geworden. Laut histologischer Begutachtung ist das Gewebe stark autolytisch verändert.



Abb. 4: Probe 1294 von 1964 aus Berlin.



Abb. 5: Probe 11768 aus Wien.

11794 zeigt eine deutliche Stratifizierung der einzelnen Gewebeschichten (Abb. 6). In der rechten Gewebeprobe sind von rechts nach links die folgenden Schichten zu erkennen: Fett mit Anhängseln, in grau die Magenwand und dann ein blutreiches Gewebe, bei dem es sich möglicherweise um gut durchblutetes Tumorgewebe oder Einblutungen in die Magenwand handelt. 15809 (Abb. 7) ist ein homogener Tumorblock, der aus festem Gewebe besteht.



Abb. 6: Probe 11794 aus Wien.



Abb. 7: Probe 15809 aus Wien.

Die beiden folgenden Abbildungen mit Proben aus Zürich zeigen ebenfalls Tumorgewebe, welche durch eine sehr feste Struktur gekennzeichnet ist. Die makroskopische Beschreibung für 8454 bezeichnet die Probe als „Polyp“ (Abb. 8). Für Probe 1 fehlen Informationen (Abb. 9).



Abb. 8: Probe 8454/1951 aus Zürich.



Abb. 9: Probe 1 aus Zürich.

Die folgenden Tabellen (1-4) geben den Probenamen, das Geschlecht und Alter des Patienten und deren originale pathologische Diagnose wieder.

Die Berliner Proben sind durch eine relativ ausführliche pathologische Beschreibung gekennzeichnet (Tab. 1). Als erstes ist die allgemeine Einteilung der Präparate in „maligner Tumor“, „schlüsselförmiges Karzinom“, „bösartiges Geschwür“ und „szirrhöses Karzinom“ dargestellt, im Anschluss folgen eine genauere Beschreibung der Pathologie und die Lokalisation. Als Beispiel sei hier Probe 722/1960 mit einem „schlüsselförmigen Cardiacarcinom“ genannt, wobei „Cardia“ die Lokalisierung des Karzinoms am Mageneingang bezeichnet. Das „Pyloruscarcinom“ von Probe 113/1955 war hingegen am Ausgang Richtung Dünndarm angesiedelt („Pylorus“).

Die beprobten Patienten aus der Berliner Sammlung waren zwischen 45 und 86 Jahre alt. Acht der fünfzehn Patienten waren männlich, sieben weiblich.

Tab. 1: Proben aus Berlin nach Jahren aufgeführt und Beschreibung der Pathologie des Magens

| Probenname | Geschlecht | Alter | Originalbeschreibung |
|------------|------------|-------|--|
| 33/1947 | männlich | 68 | maligner Tumor: kleines schlüsselförmiges Carcinom, mehrere Polypen und chron. Katarrh des Magens |
| 746/1951 | männlich | 56 | schlüsselförmiges Karzinom: handflächengroßer, schlüsselförmig zerfallender Krebs der Cardia des Magens im Bereich der kleinen Kurvatur mit Übergreifen auf den unteren Oesophagus |
| 176/1952 | männlich | 76 | maligner Tumor: Cardiacarcinom bei bleistiftdicker Stenose des Mageneingangs |
| 415/1953 | männlich | 45 | maligner Tumor, bösartiges Gewächs: stenosierendes Carcinom des Pylorus |
| 461/1953 | weiblich | 68 | maligner Tumor, Geschwulst: auf den Oesophagus übergreifendes Cardiacarcinom |
| 29/1955 | weiblich | 73 | bösartiges Geschwür: kleines ulceriertes Carcinom der Hinterwand |
| 734/1955 | männlich | 73 | szirrhöses Karzinom: polypöses Magenkarzinom |
| 1113/1955 | weiblich | 79 | maligner Tumor, bösartiges Gewächs: stenosierendes Pyloruscarcinom |
| 1160/1955 | weiblich | 86 | maligner Tumor, bösartiges Geschwür: flachpapilläres, exulceriertes Cardiacarcinom |
| 949/1956 | weiblich | 47 | maligner Tumor, bösartiges Gewächs: Magencarcinom: Tumoreinwachsung in die Milz, gedeckte Magenperforation |
| 777/1959 | weiblich | 68 | maligner Tumor: Cardiacarcinom |
| 722/1960 | männlich | 53 | bösartiges Geschwür: schlüsselförmiges Cardiacarcinom |
| 741/1963 | männlich | 52 | maligner Tumor, bösartiges Gewächs: ulzeröses Kardiakarzinom des Magens |
| 1234/1964 | weiblich | 75 | maligner Tumor, bösartiges Geschwulst: Cardiacarcinom des Magens |
| 1294/1964 | männlich | 70 | schlüsselförmiges Karzinom: schlüsselförmiges Magencarcinom |

Die pathologischen Diagnosen der Proben aus Tartu sind durch eine makroskopische Beschreibung gekennzeichnet (Tab. 2). Hier wird ebenso der Befund „Carcinoma“ mit der Struktur und der grundsätzlichen Einordnung des Organs („ventriculi“) verknüpft.

Das Alter der Proben, bzw. das Jahr der Präparation und Informationen über die Patienten sind nicht bekannt.

Tab. 2: Proben aus Tartu mit Bezeichnung der Pathologie des Magens laut Gefäßbeschriftung

| Probenname | Originalbeschreibung |
|------------|---|
| 430 | Sarcoma ventriculi |
| 432 | Carcinoma gelatinosum ventriculi |
| 434 | Carcinoma partis cardiaca ventriculi |
| 443 | Carcinoma exulcerans ventriculi |
| 444 | Polypositas ventriculi |
| 448 | Polypus ventriculi cum carcinomate cylindrocellulare |
| 449 | Carcinoma cylindrocellulare papillomatosum ventriculi |
| 455 | Papilloma ventriculi |
| 456 | Carcinoma pylori ventriculi |
| 593 | Carcinoma papillomatosum cylindrocellulare ventriculi |

Die Wiener Proben sind ebenso wie die Proben aus Tartu mit lateinischen Beschreibungen der makroskopischen Struktur bezeichnet (Tab. 3). Eine Ausnahme bildet lediglich die Probe 18616 aus dem Jahr 1928, die als „mehrfach krebsig entarteter Magenpolyp“ beschrieben wird. Die Patienten waren bei ihrem Tod zwischen 26 und 68 Jahre alt. Acht der 18 Gewebeproben stammen von Männern, sechs von Frauen und bei vier Proben ist das Geschlecht nicht überliefert.

Tab. 3: Proben aus Wien nach Datum der Präparation aufgelistet und Bezeichnung der Pathologie des Magens laut Gefäßbeschriftung.

| Probenname | Datum | Geschlecht | Alter | Originalbeschreibung |
|------------|------------|------------|-------|---|
| 476 | vor 1827 | - | - | Carcinoma simplex capitis pancreatis |
| 11773 | 08.07.1827 | männlich | 65 | Carcinoma ventriculi in ulcere peptica |
| 1003 | 06.04.1828 | männlich | 47 | Carcinoma ventriculi |
| 4674 | 01.09.1886 | weiblich | 68 | Carcinoma scirrhosum infiltrans ventriculi |
| 12675 | 07.10.1886 | männlich | 26 | Carcinoma scirrhosum ventriculi |
| 33003 | 1888 | - | - | Carcinoma pylori |
| 5474 | 19.04.1910 | männlich | 56 | Carcinoma fungosum exulceratum partis pyloricae |
| 14446 | 1917 | männlich | 47 | Carcinoma infiltrans ventriculi |
| 11807 | 31.01.1926 | weiblich | 46 | Carcinoma scirrhosum ventriculi fere totius |
| 11808 | 31.01.1926 | weiblich | 47 | Carcinoma scirrhosum ventriculi |
| 18616 | 11.02.1928 | weiblich | 48 | mehrfach krebsig entartete Magenpolypen |
| 8753 | 18.05.1928 | weiblich | 45 | Carcinoma in ulcere peptico ventriculi |
| 11794 | 08.10.1928 | männlich | 66 | Carcinoma scirrhosum infiltrans ventriculi |
| 11768 | 21.10.1928 | weiblich | 53 | Carcinoma simplex exulceratum curvaturae majoris ventriculi |
| 8043 | 28.12.1935 | männlich | 50 | Carcinoma papillae vateri |
| 14983 | 11.02.1949 | männlich | 50 | Carcinoma granulomatosum ventriculi |
| 8695 | - | - | - | Carcinoma ventriculi |
| 15809 | - | - | - | Carcinoma ventriculi |

Die Beschreibung der Züricher Proben -soweit vorhanden- ist eine Kombination aus medizinischem Latein und deutschen Begriffen (Tab. 4). Auch hier findet eine lokale Zuordnung des Tumors im Magen, beispielsweise durch „regionis pyloricae“ bei Probe 322 von 1906, statt. Die Patienten, zwei männliche und drei weibliche, waren bei ihrem Tod zwischen 57 und 71 Jahre alt.

Tab. 4: Proben aus Zürich. Soweit bekannt nach Jahren aufgeführt und Bezeichnung der Pathologie des Magens laut Gefäßbeschriftung.

| Probenname | Geschlecht | Alter | Originalbeschreibung |
|------------|------------|-------|---|
| 322/1906 | männlich | 57 | Ulcus rotund. ventriculi regionis pyloricae; Diagnosis clinica: Carcinoma ventriculi |
| 774/1930 | männlich | 64 | Colloid-Carcinom der Cardia ventriculi auf den Oesophagus übergreifend |
| 1356/1935 | weiblich | 67 | Carcinoma solidum simplex des Magens mit Tumorthromben in den Venen der Magenwand und Einwachsen in die Vena portae |
| 8454/1951 | weiblich | 63 | Carcinoma, entartete Magenschleimhaut, Polypen |
| 13901/1958 | weiblich | 71 | Giant-rugae Gastritis, sek. polypöses Carcinom |
| 1094/Z | - | - | Carcinoma pylori |
| 1/Z | - | - | - |
| 2/Z | - | - | - |

Die Mehrheit der verwendeten Begriffe für die makroskopische Beschreibung wird in der heutigen pathologischen Routine nicht mehr verwendet.

5 Grundlagen der Analytik

5.1 Analyse von degradiertem DNA

Evolutionäre Prozesse konnten lange nur auf morphologischer Ebene nachvollzogen werden. Durch die Entwicklung molekular-genetischer Methoden, wie z.B. der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al. 1985, Mullis & Faloona 1987), war es möglich, die Ergebnisse zusätzlich auf genetischer Ebene abzusichern bzw. zu revidieren. Die PCR ermöglicht, ausgehend von kleinen DNA-Mengen, eine schnelle enzymatische Vermehrung spezifischer Sequenzen. Daran anschließend können verschiedene Folgeanalysen je nach Fragestellung durchgeführt werden, etwa Fragmentlängenanalyse, direkte Sequenzierung oder SNP-Analysen (Kap. 6). Durch die PCR-Technik wurde es ebenso möglich biologisches Probenmaterial vergangener Zeiten zu untersuchen. Die Untersuchung von *ancient DNA* (aDNA) gestattet die Beantwortung von Fragestellungen aus verschiedenen Bereichen wie Anthropologie, Archäologie, Geobiologie etc.

In der Historischen und Prähistorischen Anthropologie werden aDNA-Analysen an historischen menschlichen Skelettelementen durchgeführt. Diese Untersuchungen unterscheiden sich in vielen Aspekten von der Arbeit mit rezentem Material, da für aDNA das Vorkommen im Spurenbereich und Degradierung kennzeichnend ist, welche meist unabhängig vom Alter des Materials ist (Burger et al. 1999). Die Degradierungsprozesse durch Autolyse oder die äußeren Bedingungen des Liegemilieus wirken sich auf die Qualität und Quantität der DNA aus und können zu Strangbrüchen in der DNA-Doppelhelix führen. In aDNA-Extrakten ist daher mit ein bis zehn Kopien intakter autosomaler Moleküle (Westenthanner 2007) und kurzen Fragmentlängen zu rechnen (vgl. Hummel & Schultes 2000).

Trotz der ungünstigen Ausgangslage für die Analysen können durch die Verwendung der hochsensiblen PCR-Technik Informationen aus dem Probenmaterial gewonnen werden. Die Sensibilität der PCR ist jedoch gleichzeitig ihr limitierender Faktor, denn schon kleinste Mengen rezenten Materials können die authentische Proben-DNA während der Amplifikation überlagern. Um den Eintrag kontaminierender DNA in das Probenmaterial zu vermeiden, wurden verschiedene Strategien und Richtlinien entwickelt. Eine Zusammenstellung der Empfehlungen findet sich in der Literatur (z.B. Willerslev & Cooper 2005). Eines der wichtigsten Kriterien stellt die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dar, die in dieser Arbeit durch die Analyse verschiedener unabhängiger Extrakte gewährleistet wurde. Weitere Strategien zur Vermeidung von Kontaminationen werden in Kapitel 6.2 erläutert.

Abweichend zu dem in der Anthropologie üblichen Untersuchungsmaterial Hartgewebe, wie Knochen und Zähne, werden in dieser Arbeit Weichgewebeproben untersucht, die in einem künstlichen Milieu konserviert worden sind. Die Proben waren im Rahmen einer Sektion den Leichnamen entnommen und dann in Fixier- bzw. Konservierungsflüssigkeiten (Kap. 5.2) überführt worden. Der Zeitraum zwischen dem Tod des Individuums und der Probennahme ist nicht bekannt. In jedem Fall ist jedoch davon auszugehen, dass vor der Probennahme autolytische Prozesse im Körper des Toten bereits begonnen hatten und die DNA in degradiertem Zustand vorliegt.

Bei der Auswertung der genetischen Typisierungen durch *short tandem repeats* (STR, Edwards et al. 1991) müssen einige Schwierigkeiten während der Analyse berücksichtigt werden, die eine Auswertung erschweren können.

Hierbei sind zunächst die sogenannten *slippage*-Phänomene zu erwähnen. Es kann während der Elongation der DNA-Stränge zu Analyseartefakten kommen, so dass *in vitro* weniger oder mehr Wiederholungseinheiten entstehen, als in der authentischen Probe vorhanden sind. Im Elektropherogramm wirkt sich das als „Stotterbanden“ (*stutter bands*, Kimpton et al. 1993) aus, die beispielsweise durch die Verwendung von schneller arbeitenden Polymerasen oder längeren STR-Wiederholungseinheiten reduziert werden können (Butler 2005). Des Weiteren sollte mit einem Verlust der Heterozygotie (*allelic dropout*) am STR-Locus gerechnet werden (Schmerer et al. 2000). Ursache ist eine zu geringe Anzahl an Zielsequenzen, so dass die Nachweisgrenze für eines der Allele nicht erreicht wird und ein scheinbar falsch-homozygotes Ergebnis entsteht (Kimpton et al. 1994). Außerdem kann die Auswertung durch „Nullallele“ beeinträchtigt werden (Butler 2005), die jedoch nicht nur bei der Analyse von aDNA beobachtet worden sind. Kann ein Primer durch Polymorphismen in der Sequenz nicht binden und wird daher auch nicht verlängert, zeigt die Amplifikation ein falsch-negatives Ergebnis, obwohl in der ursprünglichen DNA das STR-Allel vorhanden war. Nullallele sollen in dieser Arbeit vermieden werden, indem zwei verschiedene Amplifikationssysteme zur Authentifizierung der Proben benutzt werden.

5.2 Histotechnik

Leben und Tod jedes Organismus und seiner Gewebe sind mit dem Ablauf von biologischen und chemischen Prozessen verbunden. Nach dem Tod werden Gewebe zunächst autolytisch-fermentativ und später zusätzlich bakteriell zersetzt. Um Proben dauerhaft aufbewahren zu können, ist es wichtig diese postmortalen Veränderungen zu unterbinden, beispielsweise durch Einlegen in

chemische Fixiermittel (Romeis 1989). Zu den gebräuchlichsten Konservierungsflüssigkeiten zählen Formalin und Alkohol (Ethanol), welche schon lange Zeit in der Zoologie und Medizin Verwendung finden und auf welche in den folgenden Abschnitten eingegangen wird.

Formalin als Fixiermittel

Formalin wurde durch Blum 1893 in die mikroskopische Technik und als Konservierungsflüssigkeit für zoologische und anatomische Objekte eingeführt (Blum 1893) und ist seitdem das am häufigsten verwendete Fixierungsmittel (Piechocki 1986). Schon in schwacher Konzentration unterbricht Formalin durch seine antiseptischen Eigenschaften die Tätigkeit von Fäulnisbakterien. Dabei gilt, je konzentrierter das Formalin, desto schneller dringt es in das Gewebe ein.

Die Fixierungs- und Konservierungsfähigkeit von Formalin beruht auf Vernetzung der Eiweiße. Während des Vernetzungsvorgangs wird ein Formalinmolekül an ein Eiweißmolekül angelagert. Durch Verbindung zu einem weiteren Proteinmolekül entsteht eine Methylenbrücke, die das Netz stabilisiert. Kohlenhydrate selbst werden nicht direkt fixiert, behalten jedoch durch das umgebene Eiweißgerüst ihren Standort. Nach langer Fixierung soll die DNA in saurer Lösung herausgelöst werden (Burck 1981). Während der Fixierung wird Formalin verbraucht und so der Fixierungsprozess verlangsamt.

Nach längerer Lagerung nehmen in Formalin gelagerte Proben eine graue Färbung an. Durch die Zugabe von Kohlenmonoxid während des Fixierens kann durch die Bildung von Kohlenmonoxidhämoglobin die einheitliche Färbung verhindert werden.

Seit den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts wird neutral gepuffertes Formol zur Fixierung verwendet, welches insbesondere mit Hinblick auf die DNA-Erhaltung zu bevorzugen ist. Eine Pufferung wird erreicht, indem Phosphatpuffer mit Formalin in einer etwa 3,5%igen Lösung verdünnt wird (Lillie 1954).

Alkohol als Fixiermittel

Die Verwendungsmöglichkeit von Alkohol zur Konservierung von Präparaten wurde 1663 von Boyle in die Sammlungstechnik eingeführt (Artelt 1936). Alkohol (Ethanol) ist ein chemisch inaktives Fixativ, welches im Gegensatz zu Formalin die Zusammensetzung der Eiweiße nicht beeinflusst. Während des Fixiervorgangs werden Lipide und Hämoglobin gelöst, wasserlösliche Substanzen werden hingegen immobilisiert.

Die Fixierung durch Ethanol erfolgt schnell und führt zu einem abrupten Wasserentzug in der Probe, daher wird das Gewebe spröde, brüchig und schrumpft. Die Härtung des Gewebes hat zur Folge, dass weiteres Fixiermittel schlecht eindringen kann. Als Empfehlung gilt, dass nur kleinere Objekte mit diesem Verfahren fixiert werden oder eine aufsteigende Alkoholreihe verwendet wird (Piechocki 1986).

Im Vergleich zu Ethanol hat Formalin den Vorteil, dass den Objekten kein Wasser entzogen wird (Piechocki 1986).

Konservierung in farberhaltenden Flüssigkeiten

Anatomische Präparate in ihrer natürlichen Farbgebung zu konservieren, wurde bereits ab Ende des 19. Jahrhunderts mit systematischen Untersuchungen erforscht. Zeitgleich und unabhängig voneinander arbeiteten Melnikow-Raswedenkow, Jores und Kaiserling nach der Einführung des Formalins an Verfahren für farberhaltende Konservierungsflüssigkeiten (Jores 1896, Kaiserling 1896, Melnikow-Raswedenkow 1896). Die Methoden von Jores und Kaiserling werden noch heute verwendet. So verwendet das Berliner Medizinhistorischen Museum der Charité das Fixier- und Konservierungsverfahren nach Jores in modifizierter Form (Jores 1913). Dabei wird dem Formalin für die Fixierung Karlsbader Salz und Chloralhydrat zugesetzt. Das Karlsbader Salz fördert die Fixierung und Chloralhydrat erhält Oxyhämoglobin (s.o.). Die Konservierungsflüssigkeit zur Aufbewahrung enthält zusätzlich Kaliumacetat, Glycerol und Natriumdithionit, welche eine Besiedlung durch Bakterien verhindern sollen.

Neben Formalin und Alkohol bzw. Gemischen dieser Stoffe, sind in der Literatur weitere Fixier- und Konservierungsflüssigkeiten und diverse Zusätze beschrieben, die negative Eigenschaften (wie etwa Schrumpfen) ausgleichen sollen. Als Zusätze werden u.a. Sublimat, Chromsalze, Essigsäure, Quecksilber und Pikrinsäure beschrieben, deren Wirkung jedoch nicht hinreichend belegt ist und die heute kaum noch Verwendung finden (Romeis 1989).

5.3 Gaschromatographie und Massenspektrometrie

In keiner Sammlung, aus der Proben zur Verfügung stehen, existieren Aufzeichnungen zu den verwendeten Chemikalien und Methoden der Fixierungs- und Konservierungsflüssigkeiten. Lediglich vom Medizinhistorischen Museum in Berlin ist bekannt, dass seit Entwicklung der Konservierungsmethode durch Kaiserling (Kaiserling 1896) diese auch bis zum Zweiten Weltkrieg verwendet wurde (Krietsch & Dietel 1996).

Da Tests hinsichtlich der Amplifizierbarkeit der Proben gezeigt hatten, dass Unterschiede in der DNA-Erhaltung der Proben im Zusammenhang mit den einzelnen Sammlungen stehen, sollten in einem Nebenprojekt die Bestandteile der Konservierungsflüssigkeiten untersucht werden.

Für diese Analyse ist die Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC/MS) das Verfahren der Wahl. Bei der Analyse durch die GC/MS dient der Gaschromatograph zur Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches und das Massenspektrometer zur Identifizierung. Die Voraussetzung für die Gaschromatographie ist, dass die Komponenten des Gemisches unzersetzt in die Gasphase überführt werden können.

Eine Quantifizierung ist in dieser Arbeit nicht nötig, da eine reine Identifizierung der Bestandteile oberste Priorität hat. Ferner wird die Analyse auf organische Komponenten beschränkt.

6 Methoden

6.1 Herstellung histologischer Präparate

Ziel jeglicher histologischen Technik ist es, die Zellen und Gewebe in ihrem natürlichen Zusammenhang zu erhalten. Aus diesem Grund durchläuft eine Gewebeprobe in der medizinischen Routine Fixierung, Einbettung, Schneiden und Färben. Für die Fixierung werden die Gewebeproben direkt nach der Entnahme in Formalin überführt (Lüllmann-Rauch 2006). Um anschließende histochemische Untersuchungen nicht auszuschließen, gab es in den letzten Jahrzehnten die Bemühung, die Gewebeproben bei möglichst neutralem pH zu fixieren.

Um nach der Fixierung Präparate für die Lichtmikroskopie herstellen zu können, werden die Gewebsblöcke mit verflüssigtem Paraffin durchtränkt. Nach der Aushärtung entsteht ein Block fester Konsistenz (Abb. 10). Da Paraffin nicht mit Wasser mischbar ist, müssen die Proben in einem ersten Zwischenschritt durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert werden. In einem zweiten Schritt werden die Proben mit alkoholentziehenden paraffinlösenden Flüssigkeiten („Intermedien“) behandelt. Paraffin hat als Einbettungsmittel viele Vorteile, zu denen chemische Inaktivität und damit unbegrenzte Haltbarkeit, Lagerung bei Raumtemperatur und gute Schneidbarkeit zählen (Adam & Czihak 1964).



Abb. 10: 1003 eingebettet in Paraffin.

Das Schneiden des Paraffinblocks erfolgt mit einem Mikrotom. Üblicherweise liegt die Schnittstärke zwischen 5 und 15 μm . Bevor die Paraffinschnitte auf einen Glasobjektträger aufgebracht und verschlossen werden können, müssen sie vor dem Färben z.B. mittels Xylol von Paraffin befreit werden („Entparaffinieren“).

Die Färbemethode ist abhängig von der Fragestellung. Die Standardfärbung erfolgt in der Pathologie mittels Hämatoxylin-Eosin (H.E.), welches sich besonders für die Darstellung von Kernen und Zytoplasma eignet. Diese Übersichtsfärbung fand auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung und ermöglichte den Pathologen (PD. Dr. Hemmerlein, Krefeld und Dr. Perske, Göttingen) eine Entscheidung über den realisierten Gewebetyp (Tumor oder gesundes Gewebe).

Die Herstellung der mikroskopischen Dünnschnitte erfolgte in der Göttinger Pathologie. Die H.E.-Färbung fand in einem Färbeautomaten statt.

6.2 Kontaminationsprävention

Die Empfindlichkeit der PCR (Kap. 5.1), die einerseits ihren disziplinenübergreifenden Einsatz ermöglicht, ist gleichzeitig der limitierende Faktor. Kleinste Mengen an Fremd-DNA, die in die Reaktion gelangen, können die Amplifikation der eigentlichen Probe überdecken und falsche Ergebnisse erzeugen. Daher gilt es, jeglichen Eintrag von kontaminierender DNA zu vermeiden. Im Folgenden werden Kontaminationsquellen und Vermeidungsstrategien aufgeführt.

Kontamination des Probenmaterials durch den Bearbeiter (Kitchin et al. 1990) in Form von Haaren, Hautschuppen, Tränen- und Speichelflüssigkeit soll durch das Tragen von Schutzkleidung (Einmalhandschuhe, Haarhaube, Mundschutz, Kittel und Schutzbrille) vorgebeugt werden. Diese Schutzkleidung wurde während der Probenentnahme in den Museen und während der Laborarbeit getragen. Um eine Kontamination durch die Bearbeiterin oder andere Nutzer der Laborräume ggf. zu identifizieren, wurden die Typisierungsergebnisse der genetischen Fingerabdrücke der einzelnen Proben mit den in einer Datenbank gespeicherten Typisierungsergebnissen der Mitarbeiter abgeglichen.

Das Verschleppen von PCR-Produkten wird als *carry-over* bezeichnet. Eine Voraussetzung für die Vermeidung des *carry-over* sind strikt getrennte Prä- und Post-PCR-Arbeitsbereiche (Kwok 1990) und die Einhaltung der „Einbahnstraßenregelung“ (Hummel 2003). Zusätzlich zur räumlichen wird auf diese Weise auch eine zeitliche Trennung zwischen Sequenzier- und erneuten Extraktionsarbeiten eingehalten.

Weitere Kontaminationsquellen sind andere Proben, die simultan bearbeitet werden. Kreuzkontaminationen sollen durch den Gebrauch von Einwegmaterialien und das gründliche Reinigen der Arbeitsflächen und Geräte vermieden werden. Zum Reinigen werden Alconox[®] (Alconox[®] Detergent, Alconox Inc.) und bidestilliertes Wasser verwendet.

Auf Kontaminationen durch das verwendete Material wie Einweggefäße und Laborchemikalien (Cooper 1992, Schmidt et al. 1995, Tamariz et al. 2006, Schmücker 2007) hat der Bearbeiter der Proben den geringsten Einfluss. Zur Vorbeugung dieser Verunreinigungen wurden die Materialien aus kurzer Distanz für 15min mit UV-Licht ($\lambda=254\text{nm}$) bestrahlt. Eine Verstärkung des Bestrahlungserfolges wurde durch umgebende Aluminiumfolie erreicht, da UV-Licht zu Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren führen kann, die die Replikation der DNA durch die DNA-Polymerase behindern (Tamariz et al. 2006).

Um den Eintrag von exogener kontaminierender DNA zu überprüfen, wurden regelmäßig Leerkontrollen in den PCR-Reaktionen mitgeführt.

6.3 Primerdesign

Die Effizienz einer PCR wird u.a. durch die Gestaltung der Primer bestimmt. Das wichtigste Kriterium bei der Primerherstellung ist die Spezifität der Primer für den zu untersuchenden Genomabschnitt. Die Spezifität der Reaktion wird sichergestellt, wenn die Zielsequenz nur einmal im Genom vorhanden ist und die Primer vollständig an den Genomabschnitt binden. Das erste Kriterium für die Herstellung der Primer ist deren Länge. Statistisch ist eine Primerlänge von mindestens 18 Nukleotiden notwendig, um nur eine Bindemöglichkeit im Genom zu erreichen (Linz & Degenhardt 1990). Durch jedes weitere Nukleotid wird die Spezifität weiter erhöht, jedoch sollte eine Länge von 30bp nicht überschritten werden (Butler 2005).

Um die Spezifität der Reaktion, insbesondere bei der Anwendung an aDNA, weiter zu steigern, wird eine hohe Bindungsenergie am 5'-Ende des Primers und eine niedrige Bindungsenergie am 3'-Ende des Primers empfohlen. Eine hohe Bindungsenergie wird durch eine Basenpaarung, die reich an Guanin und Cytosin ist, erreicht. Zunächst bindet das 5'-Ende an die Zielsequenz. Das 3'-Ende bindet erst, wenn die Bindungsenergie durch vollständige Übereinstimmung der Sequenzen ausreichend hoch ist (Hummel 2003). Erst wenn die Primer gänzlich an die Zielsequenz binden, kann die Elongation beginnen. Die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Reaktion kann somit reduziert werden.

Bei der Herstellung der Primer sollte weiterhin beachtet werden, dass diese ausschließlich für die Generierung des Produkts zur Verfügung stehen und nicht mit sich selbst und untereinander Dimere und Haarnadelstrukturen bilden, da die Konkurrenzsituation zwischen Zielfragment und Dimeren die Kapazität der Reaktion verringert. Mögliche Bindungen der Primer untereinander würden insbesondere bei der in dieser Arbeit genutzten Multiplexanwendung eine Limitierung darstellen. Daher wurden alle acht Primer eines Primersets auf ihre Bindungen untereinander untersucht und bei allen Primerpaaren auf ähnliche Schmelz- und Anlagerungstemperaturen geachtet (Hess 2003).

Alle aufgeführten Primer wurden mit der Software PrimerSelect™ (DNASTAR Lasergene 8) gestaltet und über die Funktion „Primer-BLAST“ der frei zugänglichen Internetsequenzdatenbank National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) getestet. Der Vorteil dieses Programms ist der Vergleich der Primersequenzen mit einer Vielzahl verschiedener Organismen.

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Primer in HPLC-Aufreinigung von der Firma TIB MOLBIOL hergestellt.

6.4 Gewebeentnahme

Die Beprobung erfolgte nur in Berlin und Zürich durch die Autorin selbst. In Wien und Tartu ist dies vom dortigen Personal übernommen worden. Die entnommene Menge lag bei mindestens 0.5cm^3 . Sofern möglich sollte die Entnahme nicht sichtbar sein, um eine spätere Aufbereitung zu Schaulzwecken nicht auszuschließen. Die Gewebeprouben wurden zur Aufbewahrung in formalingefüllte Biopsieprobenröhrchen (Kabe, Labortechnik) überführt. Material aus Tartu wurde in 1.5ml Cups (Sarstedt) in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) und Material aus Wien in Formalin versandt. Stichprobenartig sind zusätzlich zum Gewebe Flüssigkeitsproben der Konservierungsmittel entnommen und in 2ml Cups (Eppendorf) zur späteren Analyse aufbewahrt worden (Kap. 6.10).

Um Kontaminationen der authentischen Proben-DNA mit DNA der Bearbeiter vorzubeugen, wurden die beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen eingehalten (Kap. 6.2). Außerdem wurden Skalpell und Pinzette nach jeder Probe mit Alconox[®] (Alconox[®] Detergent, Alconox Inc.), Wasser und 70% Ethanol (Roth) behandelt. Je Probe wurde gesundes und Tumorgewebe entnommen.

6.5 Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

In einzelnen Fällen war vor der eigentlichen Bearbeitung des Materials im Labor eine Trennung zwischen gesundem und Tumorgewebe nötig. Diese Unterscheidung erfolgte freundlicherweise mit der Unterstützung der Pathologin Dr. Perske des Universitätsklinikums Göttingen. Dabei wurden die bereits beschriebenen Kontaminationspräventionsmaßnahmen eingehalten.

Eine erfolgreiche DNA-Extraktion ist grundlegende Voraussetzung für die aDNA-Analytik. Aufgrund der zu erwartenden geringen Anzahl an intakten Zielsequenzen durch Alter und Konservierung des Probenmaterials hat eine zuverlässige und materialsparende Extraktionsmethode Priorität. Ebenso ist es wichtig, dass durch die Extraktion potentiell vorhandene Inhibitoren aus dem Gewebe entfernt werden, um im Weiteren erfolgreiche molekulargenetische Untersuchungen durchführen zu können.

Im Laufe der Arbeit wurden verschiedene manuelle und automatisierte Extraktionsprotokolle und -methoden mit unterschiedlicher DNA-Ausbeute getestet. Die kontinuierlich besten Amplifikationsergebnisse konnten mit dem BioRobot[®]EZ1 von Qiagen erzielt werden, so dass dieser Extraktionsroboter für den Hauptteil der Extraktionen genutzt wurde. Der BioRobot[®]EZ1 ermöglicht eine identische Behandlung jeder einzelnen Probe bei geringem Kontaminationsrisiko. Darüber hinaus haben die Extrakte des Extraktionsroboters einen hohen Reinheitsgrad nahezu

ohne PCR-Inhibitoren (Westenthanner 2007). Für die Bearbeitung der Proben wurde das *forensic* Protokoll für *trace samples* verwendet.

6.5.1 Isolierung von DNA aus Paraffinschnitten

Einige Proben wurden von den Museen als Paraffinblöcke zur Verfügung gestellt. Bevor diese Proben verwendet werden konnten, wurde das Paraffin entfernt. Das Paraffin aus 15 bis 20 Schnitten á 10µm wurde durch 1ml Xylol (100%) und Schmelzen bei 50°C entfernt. Anschließend wurden die Schnitte zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Mittels zweimaligem Waschen in 1ml Ethanol wurde das Xylol entfernt. Zuletzt wurden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur für 45 bis 60min getrocknet. Das ausführliche Protokoll ist im Handbuch des RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Applied Biosystems) nachzulesen.

Im Anschluss wurden die Proben wie im Weiteren beschrieben behandelt und die DNA mit dem BioRobot® EZ1 extrahiert.

6.5.2 Isolierung von DNA aus Gewebestücken

Die Gewebeprobe wurde nach ihrer Entnahme bis zu ihrer Verarbeitung in 4% Formalin bzw. PBS (Tartu) gelagert. Je nach DNA-Erhalt wurden für die Extraktion 20 bis 50mg Tumor- bzw. Kontrollgewebe (Abb. 11) mit einem Skalpell abgeschnitten, zerkleinert und in ein 2ml Gefäß (SafeLock, Eppendorf) überführt. Um die Zellen zu lysieren, wurde jede Probe mit 200µl ATL Buffer und 30µl Proteinase K (Qiagen) versetzt und bei 56°C in einem Thermomixer (Eppendorf) für mindestens 16 Stunden inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (Minispin, Eppendorf) wurden 200µl des flüssigen Überstandes zusammen mit 1µl Carrier-RNA (Qiagen) in die automatisierte DNA-Extraktion eingesetzt. Die Carrier-RNA verbessert die Extraktionseffizienz der Extraktion (Kishore et al. 2006).



Abb. 11: Gewebeprobe mit 20mg. Die Markierung entspricht 1cm.

Als Alternative zur alleinigen Zerkleinerung mit dem Skalpell, wurde der TissueLyser LT von Qiagen verwendet. Das Gewebe wurde dazu in einem Einweggefäß zusammen mit einer Stahlkugel von 5mm Durchmesser und 200µl ATL Buffer (Qiagen) durch starkes Rütteln zer-

mahlen. Nach 40sec bei 30Hz war die Probe maximal zerkleinert und der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Anschließend fand wie oben beschrieben die Zellyse statt. Simultane Bearbeitung gleicher Proben mit beiden Zerkleinerungsmethoden zeigte, dass durch vollständige mechanische Zerstörung des Gewebes und dadurch erleichtertem enzymatischen Verdau die Extrakte einen höheren DNA-Gehalt aufweisen.

Im BioRobot[®] EZ1 wird die DNA mit dem Human Tissue Kit (Qiagen) aus dem vorbereiteten Lysat an die Silikatoberfläche von Magnetpartikeln gebunden. Dies findet unter Anwesenheit chaotropher Salze statt. Durch einen Magneten werden die Partikel vom Lysat getrennt. Anschließend wird die DNA gewaschen und in Puffer auf ein Volumen von 50 bzw. 100µl eluiert. Der Extrakt kann direkt in die verschiedenen PCR-Anwendungen eingesetzt werden oder wird bei -20°C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

6.5.3 Isolierung von rezenter Kontroll-DNA

Um potentielle Kontaminationen durch den Bearbeiter und anderer Nutzer der Laborräume zu erkennen, wurde DNA aus deren Mundschleimhautabstrichen gewonnen. Die DNA wurde mithilfe der Chelex[®] 100-Methode (Biorad) extrahiert (Walsh et al. 1991) und dient in den folgenden Analysen als Kontrolle.

6.6 Messung des DNA-Gehalts

Von einer Auswahl an Proben aus Berlin und Wien, die vollständige Ergebnisse bzw. einen völligen Amplifikationsausfall zeigten, wurde der DNA-Gehalt in den Extrakten quantifiziert. Dazu wurde ein Standardverfahren mit PicoGreen[®] (Invitrogen) gewählt. Diese Methode ermöglicht eine auf Fluoreszenz basierende Berechnung der DNA-Konzentration. Das PicoGreen[®] besitzt die Fähigkeit zu fluoreszieren, nachdem es zwischen die beiden Stränge der doppelsträngigen DNA interkaliert ist. Grundlage für die Berechnung der Konzentration ist eine Eichkurve aus doppelsträngiger Standard-DNA (0ng, 30ng, 50ng, 70ng und 100ng).

Je 5µl Probe wurde 0.5µl PicoGreen[®]-Stammlösung mit 199.5µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0; 1mM EDTA) versetzt. Nach 30min Inkubation in einer lichtundurchlässigen Platte und Raumtemperatur erfolgte die Fluoreszenzmessung in einem Tecan Ultra[®] Microplate Reader mit Anregungswellen von 485nm und einer Emission bei 535nm. Anhand der ermittelten Werte für die Standardkurve wurde die DNA quantifiziert und durch die XFluor4 Software verrechnet.

6.7 Amplifikationssysteme für die Analyse des Tumorsuppressorgens p53

6.7.1 Primer und PCR-Parameter

Die Primer zur Generierung von Sequenzabschnitten in den Exons 5 bis 8 des Tumorsuppressorgens p53 wurden anhand der Kriterien für Primerdesign bei der Analyse von aDNA hergestellt (vgl. Kap. 6.3 und Hummel 2003). Die Referenzsequenz, anhand derer die Primer erstellt wurden, ist unter www.ncbi.nlm.nih.gov/gene mit dem Kürzel X54156 veröffentlicht. Die Exons haben Längen zwischen 110 und 184bp. Da jedoch bei der Sequenzierung geräteabhängig mit einem Datenverlust bis zu 30bp am Beginn der Sequenz gerechnet werden muss, wurden je Exon zwei Fragmente generiert (Tab. 5 und Abb. 12). So wurde gewährleistet, dass auch Proben mit mittelmäßiger bis schlechter DNA-Erhaltung Produkte erzeugen konnten. Die resultierenden Produktlängen lagen zwischen 125 und 171bp. Beide Fragmente überlappen einander, so dass bei erfolgreicher Amplifizierung eine vollständige Sequenz des Exons entsteht. Eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung 12.

Tab. 5: Verwendete Primer für die Analyse des Tumorsuppressorgens p53

| Primernamen | Primersequenz 5'-3' | Länge | Produktlängen |
|---------------|----------------------------|-------|---------------|
| p53Ex 5 upp | CCTGACTTTCAACTCTGTCTCCTTC | 25bp | 171bp |
| p53Ex 5/1 low | GTCATGTGCTGTGACTGCTTGTAG | 24bp | |
| p53Ex 5/2 upp | CTGTGCAGCTGTGGGTTGATT | 21bp | |
| p53Ex 5 low | CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG | 20bp | 169bp |
| p53Ex 6 upp | CCAGGCCTCTGATTCCTCACT | 21bp | 137bp |
| p53Ex 6/1 low | CTCATAGGGCACCACCACACTA | 22bp | |
| p53Ex 6/2 upp | GCGTGTGGAGTATTTGGATGAC | 22bp | |
| p53Ex 6 low | CCACTGACAACCACCCTTAACC | 22bp | 125bp |
| p53Ex 7/1 upp | CCTGCTTGCCACAGGTCTC | 19bp | 120bp |
| p53Ex 7/1 low | CATGCAGGAAGTGTACACATGTAGT | 26bp | |
| p53Ex 7/2 upp | CTAGGTTGGCTCTGACTGTACCA | 23bp | |
| p53Ex 7 low | CACAGCAGGCCAGTGTGCA | 19bp | 154bp |
| p53Ex 8 upp | CTTACTGCCTCTTGCTTCTCTTTTC | 25bp | 154bp |
| p53Ex 8/1 low | GCAGCTCGTGGTGAGGCTC | 19bp | |
| p53Ex 8/2 upp | GGCGCACAGAGGAAGAGAATCT | 22bp | |
| p53Ex 8 low | CAAGGAAAGGTGATAAAAGTGAATCT | 26bp | 155bp |

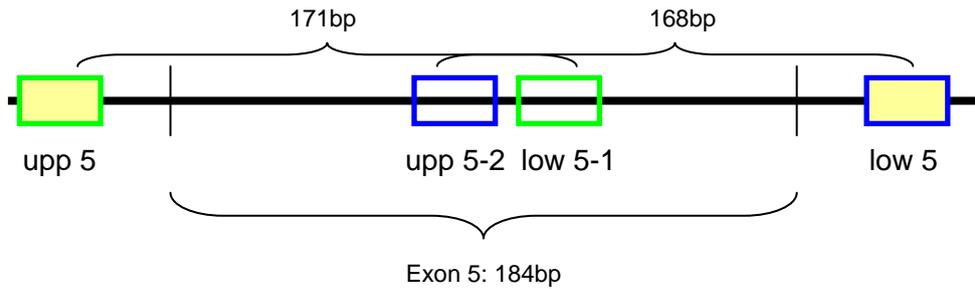


Abb. 12: Darstellung des überlappenden Primerdesigns am Beispiel des Exon 5. Grün umrandet PCR-Produkt eins mit 171bp, blau umrandet Produkt zwei mit 168bp. Gelb gefüllte Kästchen geben das größtmögliche Produkt von 255bp an. Die senkrechten Striche markieren die Exongrenzen.

Um DNA-Extrakte und Zeit zu sparen, wurden je vier Primerpaare in eine Multiplex-PCR eingesetzt (Tab. 6). Bei guter Auftrennung auf dem Agarose-Gel (Kap. 6.7.2) ist eine Unterscheidung der Produkte bezüglich des Amplifikationserfolges dennoch möglich (Abb. 24). Alle Primer des Primersets wurden in einer Arbeitskonzentration von 20pmol/ μ l und 0.24 μ M verwendet. Die Zusammenstellung der Primerpaare in den Primersets „a“ und „b“ war wie folgt:

Tab. 6: Zusammensetzung der Primersets „a“ und „b“

| Primerset „a“ | Primerset „b“ |
|---------------|---------------|
| p53 Ex5 upp | p53 Ex5-2 upp |
| p53 Ex5-1 low | p53 Ex5 low |
| p53 Ex6-2 upp | p53 Ex6 upp |
| p53 Ex6 low | p53 Ex6-1 low |
| p53 Ex7-2 upp | p53 Ex7-1 upp |
| p53 Ex7 low | p53 Ex7-1 low |
| p53 Ex8 upp | p53 Ex8-2 upp |
| p53 Ex8-1 low | p53 Ex8 low |

Die Amplifikation erfolgte mit dem Qiagen[®] Multiplex PCR Kit. Die Einsatzmenge der DNA richtete sich nach den Erfahrungen bezüglich des DNA-Erhalts und lag zwischen 2 und 9 μ l bei einer Zyklenzahl zwischen 40 und 50. Um ein Gesamtvolumen von 25 μ l zu erreichen, wurde eine entsprechende Menge an RNase freiem Wasser (Qiagen) hinzugegeben (Tab. 7). Die Reaktionsparameter waren wie folgt: Initial: 95°C für 15min; Cycling: 94°C für 1min, 65°C für 1min, 72°C für 1min; Delay 60°C für 30min; Soak 10°C für 10min. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler Mastercycler[®] (Eppendorf).

Tab. 7: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches mit dem Qiagen[®] Multiplex PCR Kit

| | μ l je Probe |
|-------------------------|------------------|
| Qiagen [®] Mix | 12.50 |
| Primerset p53 a / b | 2.4 |
| RNase freies Wasser | 8.1-1.1 |
| DNA | 2-9 |
| Σ | 25 |

Da aufgrund der schlechten DNA-Erhaltung einiger Proben ein DNA-Volumen von 9µl und 50 Zyklen für eine erfolgreiche Amplifikation nicht ausreichte, wurde zusätzlich ein Ansatz bestehend aus Einzelkomponenten der Firma Applied Biosystems genutzt (Tab. 8). In das Gesamtreaktionsvolumen von 50µl können theoretisch bis 36µl DNA eingesetzt werden. Im Laufe dieser Arbeit wurde jedoch maximal ein Volumen von 15µl DNA-Extrakt eingesetzt.

Tab. 8: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches mit Einzelkomponenten von Applied Biosystems

| | µl je Probe |
|-------------------------|-------------|
| 10x Buffer II | 5 |
| MgCl ₂ (2mM) | 4 |
| dNTP-Mix (Roche) | 1 |
| AmpliTaqGold™ (2.5U) | 0.5 |
| BSA (20mg/ml, Roche) | 1 |
| Primerset p53 a / b | 2.4 |
| HPLC-Wasser (Merck) | 21.1 |
| DNA | 15 |
| Σ | 50 |

Die Parameter der Reaktion lauteten: Initial: 94°C für 11min; Cycling: 94°C für 1min, 65°C für 1min, 72°C für 1min für 50 Zyklen; Delay 60°C für 30min; Soak 10°C für 10min.

6.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung des Amplifikationserfolges einer PCR erfolgte mittels einer horizontalen Agarose-Gelelektrophorese. Je Probe wurden 8µl PCR-Produkt mit 2µl Ladepuffer (0.025g Bromphenol blau, 4g Saccharose, auf 10ml mit bidestilliertem Wasser auffüllen) versetzt und auf ein 2.5% (2g Agarose, 80ml 1xTBE, 3µl Ethidiumbromid) bzw. 3.75% (3g Agarose, 80ml 1xTBE, 3µl Ethidiumbromid) Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 90 bis 110V für 30-45min. Bei geringeren Unterschieden in den erwarteten Fragmentlängen (z.B. p53-Multiplex) wurden ein höher prozentiges Gel und eine geringere Voltzahl aufgrund der besseren Auftrennung bevorzugt.

Zusätzlich zu den Proben wurde ein Standard bekannter Länge (1kb-Leiter, Invitrogen) mitgeführt, der zur Überprüfung der amplifizierten Fragmentlängen diente.

Während der elektrophoretischen Auftrennung interkaliert das Ethidiumbromid mit der DNA-Doppelhelix, so dass die DNA-Fragmente unter UV-Licht ($\lambda=254\text{nm}$) sichtbar gemacht werden können. Mit dem digitalen Geldokumentationssystem GelJet-Imager (Intas) wurden die Gele photographiert.

Nach der Überprüfung des Amplifikationserfolges unterschied sich das weitere Vorgehen durch den in der PCR festgelegten Analysetyp. Für die Analyse von Sequenzabschnitten folgte eine

Sequenzierung mit vorherigen Aufreinigungsschritten (Kap. 6.7.3). Wurden STRs zur Authentifizierung untersucht, folgte eine Fragmentlängenanalyse (Kap. 6.9.2).

6.7.3 Sequenzierung

Die Untersuchung der Teilabschnitte des Tumorsuppressorgens p53 erfolgte durch direkte Sequenzierung mittels *Cycle Sequencing Reaction* (Sanger et al. 1977). Um Veränderungen in der p53-Sequenz im Tumorgewebe feststellen zu können, musste die Basenabfolge in den Exons bestimmt werden. Alle acht Fragmente wurden in einem ersten Schritt mit dem *upper* Primer sequenziert. Um Veränderungen durch Sequenzierartefakte ausschließen zu können, wurden einige Fragmente erneut durch Verwendung des *lower* Primer sequenziert, so dass am Ende jede Probe durch vier vollständige Exon-Sequenzen repräsentiert war.

Bevor die eigentliche Sequenzierreaktion stattfinden konnte, mussten PCR-Reaktionsbestandteile wie ungebundene Primer, Primerdimere, dNTPs, Polymerase und Puffersalze aus dem PCR-Produkt entfernt werden. Diese Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des MinElute[®] PCR Purification Kits von Qiagen nach Herstellerangabe. Da die Grund-PCR in einem 25µl-Ansatz erfolgte, wurden die Puffermengen darauf abgestimmt. Das Elutionsvolumen richtete sich nach der Intensität der PCR-Produkte auf dem Agarose-Gelbild und lag zwischen 20 und 30µl.

Das Agarose-Gelbild diente auch zur Abschätzung der Einsatzmenge für die Sequenzierreaktion. Es wurde zwischen 0.5 und 2µl des gereinigten PCR-Produkts eingesetzt. Die reaktionsspezifischen Komponenten wie BigDye[®] Terminator v1.1 Ready Reaction Mix und der Sequenzierpuffer wurden von der Firma Applied Biosystems und das HPLC-Wasser von der Firma Merck hergestellt (Tab. 9).

Tab. 9: Reaktionskomponenten für die Sequenzierreaktion

| | µl je Probe |
|---|-------------|
| BigDye [®] Terminator Ready Reaction Mix | 2 |
| 5x Sequencing Buffer | 3 |
| Primer (5pmol) | 0.5 |
| PCR-Produkt | 0.5-2 |
| HPLC-Wasser | 14-12.5 |
| Σ | 20µl |

Die Sequenzierreaktion mit 25 Zyklen wurde in einem Thermal Cycler Typ Mastercycler[®] (Eppendorf) mit den folgenden Parametern durchgeführt: Initial: 96°C für 8min; Cycling: 96°C für 10sec, 55°C für 5sec, 60°C für 4min; Soak 10°C für 10min.

Während der Sequenzier-PCR werden an zufällig ausgewählten Positionen fluoreszenzmarkierte ddNTPs in den DNA-Strang eingebaut. Dieser Einbau führt aufgrund der fehlenden 3'-OH-

Gruppen zu einem Abbruch der Kettenverlängerung. Die Fluoreszenzmarkierung am jeweiligen Ende dieser Stränge ermöglicht eine Detektion durch den Laser bei der Kapillarelektrophorese.

Im Anschluss an die Sequenzierreaktion mussten wiederum alle Reaktionsbestandteile entfernt werden, welche die eigentliche Sequenzanalyse stören würden. Für diese zweite Aufreinigung wurde das NucleoSEQ Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers verwendet. Durch eine Filtration in der Gelsäule mit anschließender Zentrifugation werden überschüssige ddNTPs, Nukleotide, Primer und Polymerasen zurückgehalten. Das nun zweimal aufgereinigte PCR-Produkt kann anschließend in die Reaktionsgefäße überführt werden und die eigentliche Sequenzanalyse gestartet werden.

Die Sequenzanalyse erfolgte auf einem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) unter der Verwendung des Polymers POP-6™ (Applied Biosystems). Während der Sequenzierung werden die Kettenabbruchprodukte aus der Sequenzier-PCR mittels einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte werden durch einen Laser angeregt und nach Wellenlängen getrennt gesammelt. Die detektierten Farbsignale werden durch die Analysesoftware ABI Prism® Sequencing Analysis (Applied Biosystems) ausgewertet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt wie bei der Fragmentlängenanalyse in einem Elektropherogramm. Hier werden die einzelnen Basen allerdings in festgelegter Farbgebung als aneinandergereihte Peaks abgebildet (Adenin in grün, Cytosin in blau, Guanin in schwarz und Thymin in rot). Diese spezifische Basenabfolge kann durch die SeqMan Software (DNASTAR Lasergene 8) von Laufartefakten und Lesefehlern bereinigt werden. Bei Realisierung von zwei Basen wird für die entsprechende Nukleotidposition der *IUB-Code* verwendet. Zuletzt werden die Sequenzdaten mit einer p53-Referenzsequenz (NC_000017.10, Quelle: ncbi.nlm.nih.gov) in der MegAlign Software (DNASTAR Lasergene 8) verglichen.

Ein Teil der Analysen fand auf einem Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer unter Verwendung des Polymers POP-7™ bzw. POP-6™ (Applied Biosystems) statt. Die Produkte der zweiten Aufreinigung wurden in eine 96-Well-Platte überführt und anschließend in das Gerät eingesetzt. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte unter Zuhilfenahme der Foundation Data Collection Software (Version 3.0) und der Sequencing Analysis Software 5.2 (Applied Biosystems). Die vorbereitenden Schritte und die zugrunde liegende Methode sind identisch, die Kapillarelektrophorese findet lediglich in einem Ausgangsvolumen von 40µl und durch 16 Kapillaren parallel statt.

6.8 Autosomale STRs und Amelogenin

Als STRs werden kurze DNA-Sequenzen bezeichnet, die sich durch Wiederholungseinheiten (*repeat units*) zwischen zwei bis sechs Basenpaaren auszeichnen (Litt & Luty 1989). Durch eine Kombination verschiedener autosomaler STRs ist es möglich, ein Individuum mit hoher Wahrscheinlichkeit zu authentifizieren.

6.8.1 Primer und PCR-Parameter

Die Analyse der autosomalen STRs und eines Abschnitts des Amelogenin-Gens für Individualisierung und Authentifizierung der einzelnen Proben erfolgte zu Beginn der Arbeit mittels einer Oktaplex-PCR, welche speziell für die Anwendung an alter DNA entwickelt worden ist (Schilz 2006). Informationen zu Primersequenzen, zu eingesetzten Konzentrationen, möglichen Allelausprägungen und Produktlängen sind bei Schilz (2006) nachzulesen. Im weiteren Verlauf wurden die Proben durch die Heptaplex-PCR analysiert, welche sich aus den Oktaplex-Systemen D13S317, D5S818 und Amelogenin, ergänzt durch die Systeme TH01, D18S51 und FGA zusammensetzt (Pfister 2008, Hollerbuhl 2009). Der Vorteil der Heptaplex-PCR ist die Verkürzung einiger Fragmente, so dass die Wahrscheinlichkeit größer ist Proben mit schlechterer DNA-Erhaltung zu erfassen. Die PCR-Reaktion erfolgte mit dem Qiagen[®] Multiplex PCR Kit bei 40 bis 50 Zyklen in einem 25µl Ansatz (Tab. 10). Die Einsatzmenge der DNA richtete sich ebenfalls nach dem Probenerhalt und lag zwischen 2 und 9µl:

Tab. 10: Reaktionskomponenten für die Oktaplex-Analyse

| | µl je Probe |
|-------------------------|-------------|
| Qiagen [®] Mix | 12.5 |
| Primerset Oktaplex | 3.2 |
| RNAse freies Wasser | 7.3-0.3 |
| DNA | 2-9 |
| | Σ 25 |

Die Reaktion wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt: Initial: 95°C für 15min; Cycling: 94°C für 1min, 58°C für 1min, 72°C für 1,5min; Delay 60°C 30min; Soak 10°C für 10min.

Die Heptaplex-PCR (Tab. 11) wurde als Two-Step-PCR mit einem kombinierten Hybridisierungs- und Elongationsschritt durchgeführt: Initial: 95°C für 15min; Cycling: 94°C 1min, 59°C 2,5min; Delay 60°C 30min; Soak 10°C 10min. Im Anschluss erfolgte eine Agarose-Gel-elektrophorese wie in Abschnitt 6.7.2 beschrieben.

Tab. 11: Reaktionskomponenten für die Heptaplex-Analyse

| | µl je Probe |
|-------------------------|-------------|
| Qiagen [®] Mix | 12.5 |
| Primerset Heptaplex | 3.35 |
| RNase freies Wasser | 7.15-0.15 |
| DNA | 2-9 |
| | Σ 25 |

6.8.2 Fragmentlängenanalyse

Abhängig von der Intensität der Proben auf dem Agarose-Gel wurden 0.1 bis 2µl PCR-Produkt für die nachfolgende STR-Analyse mit 12µl Hi-Di[™] Formamid (Fluka) und 0.25µl des Längensstandards GENE SCAN ROX 500[™] für 5min bei 95°C denaturiert. Anschließend erfolgte eine Kühlung der Proben auf Eis und eine vollständige Überführung in die Amplifikationsgefäße.

Die Kapillarelektrophorese erfolgte auf einem ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) unter Verwendung des Polymers POP-4[™] (Applied Biosystems). Während der Analyse werden die Daten von der ABI Prism[™] Data Collection Analysis Software auf den Hauptrechner übertragen und durch die GeneScan[™] Analysis Software verarbeitet. Durch den spurinternen Längensstandard in jeder Probe können die Fragmentlängen ermittelt werden. Für das *size calling* wurde die *Local Southern* Methode genutzt.

Zusätzlich zu den Proben wurde je Lauf eine laborinterne Allelleiter mitgeführt. Bei der Auswertung der Peaks in einem Elektropherogramm diente diese als Vergleich für die Bestimmung der jeweiligen Allele.

Eine ausführliche Beschreibung für den Umgang mit Analyseproblemen und Laufartefakten findet sich z.B. bei Hummel (2003).

6.9 Analysesysteme zum Nachweis von *H. pylori*

6.9.1 Amplifikation mittels quantitativer Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ermöglicht im Gegensatz zur konventionellen PCR die Verfolgung der Produktanreicherung in Echtzeit mit anschließender Quantifizierung der Produktmenge. Die Messung der Produktzunahme erfolgt durch das emittierte Fluoreszenzlicht, welches in Abhängigkeit zur Produktmenge generiert wird (Higuchi et al. 1993, Heid et al. 1996). Um produktabhängige Fluoreszenzen zu messen, sind Fluoreszenzfarbstoffe nötig, die mit der doppelsträngigen (ds)DNA interkalieren. Einer dieser Farbstoffe ist u.a. Ethidiumbromid, das von UV-Licht zwischen 254-366nm angeregt wird und sein Emissionsmaximum bei 590nm hat (Kapitel 6.7.2) (Le-Pecq & Paoletti 1966, Wittwer et al. 1997, Morrison et al. 1998). Für die qRT-PCR werden üblicherweise SYBR[®] Green I oder fluoreszenzgekoppelte Oligonukleotide

(Sonden) eingesetzt. SYBR[®] Green I interkaliert jedoch nicht mit der DNA, sondern bindet sequenzunspezifisch an eine kleine Furche der dsDNA. In Gegenwart von dsDNA kann durch Anregung mit Blaulicht (480nm) eine Fluoreszenz erzeugt werden, so dass die Anreicherung der dsPCR-Produkte in der qRT-PCR sichtbar gemacht werden kann (Wittwer et al. 1997, Morrison et al. 1998).

Eine andere Variante sind Sonden, die zeitgleich mit den PCR-Primern auf dem Sequenzabschnitt binden und so die PCR-Produkte detektierbar machen (Cardullo et al. 1988, Wu & Brand 1994, Clegg 1995). Die Sonden sind am 5'-Ende an einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff (z.B. FAM) und am 3'-Ende an ein Quencher-Molekül (engl. *to quench*: löschen, z.B. TAM) gebunden. Das Emissionsspektrum des Reporters entspricht dem Absorptionsspektrum des Quenchers. Ist die an die Sequenz gebundene Sonde intakt, wird die Emission des Reporters durch den Quencher absorbiert. Erreicht jedoch die Taq-Polymerase mit ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die Sonde, wird diese in ihre einzelnen Nukleotide zerlegt. Der nun frei werdende Reporterfarbstoff emittiert durch seine Entfernung vom Quencher detektierbare Fluoreszenzsignale, die von der Software aufgenommen und in Amplifikationskurven umgewandelt werden (Wittwer et al. 1997). Die Freisetzung des Reporterfarbstoffs und die damit verbundene Freisetzung der Fluoreszenz sind proportional zu der gebildeten PCR-Produktmenge. Nach Beendigung der Amplifikation kann die Ausgangskopienzahl der Probe mit Hilfe der mitgelaufenen Standardreihe quantifiziert werden.

Als *threshold cycle* (C_t) bezeichnet man den PCR-Zyklus, bei dem in der exponentiellen Phase der PCR das Fluoreszenzsignal der Probe die Hintergrundfluoreszenz überschreitet und einen Schwellenwert erreicht. Der C_t ist eine relative Messung der Targetkonzentration in der PCR-Reaktion. Je früher der Schwellenwert erreicht wird, desto mehr Ziel-Sequenzen befinden sich in der Probe.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip der Sonden genutzt, um festzustellen, ob in den DNA-Extrakten der Magenkrebspatienten eine Infektion mit *H. pylori* nachweisbar ist. Der Vorteil der qRT-PCR gegenüber der konventionellen PCR mit anschließenden Arbeitsschritten ist, dass die qRT-PCR in einem geschlossenen System stattfindet. Entsprechend sind nach dem Ansetzen der Reaktion keine weiteren Schritte notwendig (Heid et al. 1996). Ferner liegen die Ergebnisse bereits nach 2 ½ Stunden vor.

6.9.2 Nachweis von *H. pylori* mittels Real-Time PCR

Die Identifikation des Magenbakteriums *H. pylori* in den historischen Magenkrebsproben erfolgte indirekt über den Nachweis eines Teilschnitts des 16S rRNA Gens. Primer und Sonde für die Analyse (Abb. 13, Tab. 12) stammen aus der Literatur (Liu et al. 2008). Die Überprüfung mittels Primer-BLAST ergab, dass die Primer in allen verfügbaren *H. pylori*-Stämmen zu 100% homolog mit einer Fragmentlänge von 76bp binden. Abbildung 13 zeigt einen eigenen Sequenzvergleich mit sechs verschiedenen *H. pylori*-Stämmen. Einzig eine Fehlpaarung mit Stamm P12 im Bereich der Sonde ist zu erkennen. Die Autoren testeten ihr Amplifikationssystem mit verschiedenen Organismen wie *Escherichia coli*, *Salmonella bareilly*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella flexneri* und *Helicobacter heilmannii*. Außerhalb von *H. pylori*-Extrakten entstanden keine Produkte, was die Spezifität der Methode belegt.

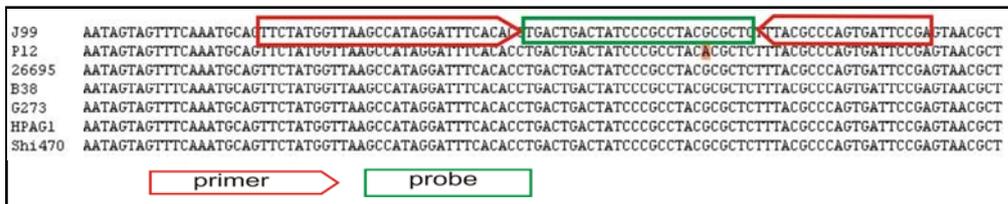


Abb. 13: Die Darstellung zeigt einen Ausschnitt aus einem Alignment des für die 16S rRNA kodierenden Gens von sechs verschiedenen *H. pylori*-Stämmen. Die Primer sind in rot, die Sonde ist in grün markiert.

Tab. 12: Die Primer sind HPSF- und die Sonde ist HPLC-aufgereinigt (Eurofins). Die Sonde ist am 5'-Reporter mit der fluoreszierenden Farbe FAM und am 3'-Quencher mit TAMRA markiert

| Primernamen | Sequenz 5'-3' | Länge | Fragmentlänge |
|---------------|-----------------------------------|-------|---------------|
| 16S Hpylori f | TCGGAATCACTGGGCGTAA | 19 | 76bp |
| 16S Hpylori r | TTCTATGGTTAAGCCATAGGATTCACAC | 27 | |
| 16S Hpylori P | FAM-TGACTGACTATCCCGCCTACGCGCT-TAM | 25 | |

Für die Analyse wurde das qPCR Core kit (Eurogentec) verwendet. Der Mastermix wurde nach Herstellerangaben wie folgt angesetzt (Tab. 13) und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Tab. 13: Reaktionsgemisch für die Real-Time PCR

| 2x Mastermix (Eurogentec) | µl je Probe |
|---------------------------|-------------|
| 10x Puffer | 1.8 |
| MgCl ₂ (50mM) | 1.26 |
| dNTP (5mM) | 0.72 |
| HotGoldStar (5U/µl) | 0.09 |
| ddH ₂ O | 11.13 |
| Σ | 15 |

Der Reaktionsansatz für die eigentliche Analyse enthielt zusätzlich zu den genannten Komponenten Primer und Sonde (Eurofins MWG Operon) wie in nachfolgender Übersicht zusammen-

gestellt (Tab. 14). Zunächst wurden je 10µl des Reaktionsgemisches in die Vertiefungen einer 384-Well-Platte (Thermo Fast Plate 384 PCR, ABgene) vorgelegt. Das Volumen für die Proben und die Negativkontrollen betrug 8µl. Genomische DNA für die Standardreihe stammte von den Stämmen J99 (ATCC[®] 700824TM) und 26696 (ATCC[®] 700392D-5TM). Die Kontrollproben für die Standardreihe waren hoch konzentriert, so dass ein Volumen von 3µl ausreichte. Die Platte wurde mit transparenter Folie (Adhäsiv PCR-Folie, ABgene) verschlossen. Nach kurzer Zentrifugation wurde die Platte in das ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) zur Analyse eingesetzt.

Tab. 14: Reaktionsansatz für den Nachweis des 16S rRNA Gens von *H. pylori*

| SYBR Green Assay | µl je Probe |
|---------------------------|-------------|
| 2x Mastermix | 9 |
| 16S Hpylori f (10pmol) | 0.21 |
| 16S Hpylori r (10pmol) | 0.21 |
| HPLC-Wasser | 0.22 |
| 16S Hpylori Probe (5pmol) | 0.36 |
| DNA | 8 |
| | Σ 18 |

Die Analyse begann mit einem einmaligen Schritt für 10min bei 95°C zur Aktivierung der Hot-GoldStar (Eurogentec). Für alle 60 Zyklen folgten Denaturierung für 15sec bei 95°C und Annealing/Extension bei 60°C für 1min. Alle Proben, Kontroll- und Negativproben, wurden duplex amplifiziert.

Die Auswertung erfolgte mit der SDS 2.1 Software (Applied Biosystems). Alle Proben, deren C_t-Wert den Schwellenwert überschritt, wurden als *H. pylori*-positiv gewertet.

6.9.3 Identifikation der *cag* Pathogenitätsinsel von *H. pylori* durch PCR

Für den Nachweis der *cag* Pathogenitätsinsel (*cag* PAI) wurden Primer an konservierten DNA-Sequenzen hergestellt, die ein 91bp langes Fragment amplifizieren (Tab. 15). Mit Hilfe von PrimerBlast ließ sich zeigen, dass eine vollständige Übereinstimmung mit den *H. pylori*-Stämmen P12, G27, J99 und HPAG1 gewährleistet werden konnte. Die Stämme Shi470 und 26695 wiesen lediglich eine Abweichung in einer Basenposition auf. Da letzterer jedoch zusätzlich zu J99 als Positivkontrolle diente und kontinuierliche Ergebnisse lieferte, konnte bestätigt werden, dass trotz einer Fehlpaarung eine erfolgreiche Amplifikation möglich ist.

Tab. 15: Primer für die Identifikation der *cag* PAI bei *H. pylori*

| Primernamen | Primersequenz 5'-3' | Länge | Produktlänge |
|--------------------------|------------------------------|-------|--------------|
| H.pylori <i>cagA</i> upp | AAGGGGTAATTTTTCTAAATTCACCTC | 26bp | 91bp |
| H.pylori <i>cagA</i> low | GTTGAACCTTGTAATTAGGATCAATGTC | 27bp | |

Die PCR-Reaktion erfolgte mit dem Qiagen[®] Multiplex PCR Kit bei 45 bis 50 Zyklen in einem 25µl Ansatz (Tab. 16). In die Reaktion wurden 9µl DNA-Extrakt eingesetzt. Die PCR-Parameter waren: Initial: 95°C für 15min; Cycling: 94°C 1min, 60°C 2,5min; Delay 60°C 30min; Soak 10°C 10min.

Tab. 16: Reaktionsansatz für den Nachweis der *cag* PAI von *H. pylori*

| | µl je Probe |
|---------------------------------|-------------|
| Qiagen [®] Mix | 12.5 |
| Primer <i>cagA</i> upp (20pmol) | 0.3 |
| Primer <i>cagA</i> low (20pmol) | 0.3 |
| RNAse freies Wasser | 2.9 |
| DNA | 9 |
| | Σ 25 |

Die Überprüfung des Amplifikationserfolges erfolgte auf einem Agarose-Gel (Kap. 6.7.2). Durch die Generierung einer spezifischen 91bp-Bande auf dem Agarose-Gel wurde auf die Anwesenheit der *cag* PAI in der jeweiligen Probe geschlossen. Ausgewählte PCR-Produkte wurden im Anschluss wie oben beschrieben sequenziert (Kap. 6.7.3), um sicherzustellen, dass das erwartete Fragment entstanden war.

6.9.4 Nachweis von *H. pylori* durch SBE

Amplifikation der SBE-Basisfragmente

Mit der im Folgenden beschriebenen Strategie wurde in den *H. pylori*-positiven Proben aus den vorherigen Untersuchungsabschnitten ein Abschnitt des 23S rRNA Gens amplifiziert und im Anschluss auf die häufigsten Mutationen A2143G, A2142G und A2142C (van Doorn et al. 2001) mittels einer SBE-Reaktion getestet. Vorteil dieser Methode ist, dass das PCR-Produkt der Ausgangsreaktion kleiner als 100bp sein kann, so dass auch degradierte Proben mit höherer Wahrscheinlichkeit ein positives Ergebnis zeigen. Erst in einer folgenden Reaktion werden die einzelnen Mutationen bzw. SNPs durch spezifische Primer detektiert.

Für das kodierende Gen der 23S rRNA von *H. pylori* finden sich auf ncbi.nlm.nih.gov nur wenige Einträge (Kolbert & Persing 1999). Als Grundlage für die Primergestaltung diente eine Arbeit von Lascols et al. (2003). Da jedoch nur der *upper* Primer mit seinem Energieprofil den Kriterien für aDNA entsprach, wurde der *lower* Primer selbst entwickelt. Die Überprüfung der Primer mittels BLAST ergab eine vollständige Bindung an *H. pylori*-Sequenzen.

Das resultierende Produkt der Basis-PCR hat eine Länge von 115bp (Tab. 17).

Tab. 17: Primer für die Generierung des 23S rRNA Gens von *H. pylori* und für die Identifikation der resistenzbedingten Basenveränderungen an den Positionen 2142 und 2143

| Primername | Primersequenz 5'-3' | Länge | Produktlänge |
|-------------------|--------------------------------|-------|--------------|
| HP23S1_uppLascols | GGAGCTGTCTCAACCAGAGATTC | 23 | 115bp |
| HP23S_low | CCATTAGCAGTGCTAAGTTGTAGTAAA | 27 | |
| HP23S_SBE_upp | ACCCGCGGCAAGACGG | 16 | |
| HP23S_SBE_low | AAAAAAATTGTAGTAAAGGTCACGGGGTCT | 31 | |

Die Reaktion der Basis-PCR erfolgte wiederum mit dem Qiagen[®] Multiplex PCR Kit (Tab. 18). Je Ansatz wurden 8µl DNA-Extrakt bei 50 Zyklen eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einer PCR aus zwei Schritten: Initial: 95°C für 15min; Cycling: 94°C 1min, 60°C 2.5min; Delay 60°C 30min; Soak 10°C 10min.

Tab. 18: Reaktionsansatz für den Nachweis des 23S rRNA Gens von *H. pylori*

| | µl je Probe |
|---------------------------|-------------|
| Qiagen [®] Mix | 12.5 |
| Primer HP23S_upp (20pmol) | 0.3 |
| Primer HP23S_low (20pmol) | 0.3 |
| RNase freies Wasser | 2.7 |
| DNA | 8 |
| | Σ 25 |

Als Positivkontrollen dienten wieder die Stämme J99 und 26695. Negativkontrollen in Form von HPLC-Wasser (Merck), Mitarbeiter-DNA und genomischer DNA von K562 (Promega) zeigten auch nach 50 Zyklen keine positiven Ergebnisse, so dass von einer *H. pylori*-spezifischen Reaktion ausgegangen werden kann.

Im Anschluss an die Überprüfung des Amplifikationserfolges mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die Proben für die SNaPshot-Reaktion vorbereitet (siehe unten).

Die SBE-basierte Analyse, welche auch als *minisequencing* oder SNaPshot[™] (Applied Biosystems) bezeichnet wird, ist durch eine Identifikation einer determinierten Basenposition gekennzeichnet (Jalanko et al. 1992, Syvänen et al. 1992). Das zugrunde liegende Prinzip ähnelt einer Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al. 1977) allerdings unter Zugabe von unterschiedlich farbmarkierten ddNTPs anstelle von dNTPs und ddNTPs. Im Anschluss an die Basis-PCR folgen enzymatische Reaktionen, bei denen überschüssige Primer und dNTPs zerstört werden. In die folgende eigentliche SBE-Reaktion werden spezifische Primer, die am 3'-Ende genau vor der potentiellen Mutation enden, eingesetzt. Es kommt zu einer Verlängerung um eine farbmarkierte Base, die komplementär eingebaut wird (Abb. 14). Die spezifische Fluoreszenzmarkierung der Base kann mit einer Kapillarelektrophorese detektiert und determiniert werden. Homozygote Allele werden im Elektropherogramm als ein Peak und heterozygote Allele als zwei Peaks dar-

gestellt. Da die jeweilige Farbmarkierung ein unterschiedliches Laufverhalten bewirkt, sind heterozygote Ergebnisse voneinander zu trennen.

Verschiedene Primerlängen in der SBE-Reaktion rufen zusätzlich unterschiedliches Laufverhalten hervor, so dass mehrere Loci durch spezifische Primer simultan untersucht werden können (Tully et al. 1996). Eine eindeutige Unterscheidung beider Primer ohne Veränderung der Reaktionsbedingungen wird durch die Verlängerung der Primersequenz am 5'-Ende erreicht. In dieser Arbeit wird eine poly-A Kette genutzt, welche die Bindung des Primers an die Sequenz nicht stört (Tab. 9). Da die Mutationen im vorliegenden Fall an zwei verschiedenen Basenpositionen liegen, ist eine Duplex-Reaktion das Verfahren der Wahl.

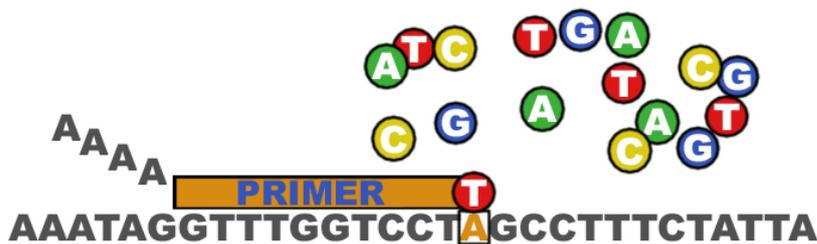


Abb. 14: Das Prinzip der Einzelbasenverlängerung (*single base extension*) in schematischer Darstellung. Das eingekreimte A in der unteren Basenfolge stellt die relevante Nukleotidposition dar, an die der Primer angrenzt und um ein ddNTP (rund) verlängert wird (Abbildung: O. Warnberg).

Aufreinigung der SBE-Basisfragmente

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proben für die SNaPshot-Reaktion vorbereitet, indem alle überschüssigen Produkte entfernt wurden. Um eine Verbesserung der Ergebnisse durch Reduzierung von unspezifischen Nebenprodukten zu erzielen, wurden die Proben nach der PCR mit dem Aufreinigungskit MinElute[®] PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangabe behandelt. Im Anschluss erfolgte ein enzymatischer Verdau durch Exonuclease (Exo I, New England BioLabs), durch den ungebundene Primer entfernt wurden. Für die Entfernung von überschüssigen dNTPs wurde alkaline Phosphatase verwendet. Die Entfernung ist notwendig, damit keine Interaktion mit den mutationsspezifischen Primern stattfindet. Für 2.5 µl PCR-Produkt wurden 0.025 µl Exonuclease I (20U/µl) und 0.05 µl 10xPuffer mit 1 µl alkaliner Phosphatase (rAPid, Roche) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Eine Inaktivierung der Enzyme erfolgte für 15min bei 75°C, so dass die bereinigten Produkte unmittelbar in der SNaPshot-Reaktion genutzt werden konnten. Dazu wurde das SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix von Applied Biosystems verwendet, in welchem sich die fluoreszenzmarkierten ddNTPs, Puffer und Polymerase befinden (Tab. 19). Je Primer wurden 0.1 µl einer 0.4 µM-Lösung verwendet. Die Reaktion mit 25 Zyklen fand bei 96°C für 10sec, 50°C für 5sec und 60°C für 30sec statt.

Tab. 19: Reaktionsansatz für die Aufreinigung der SBE-Basisfragmente

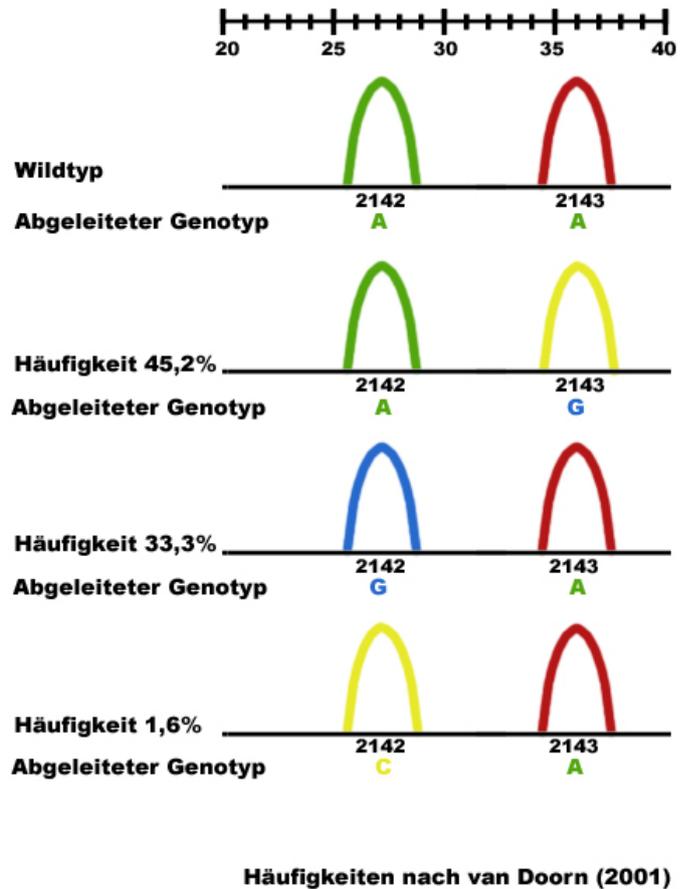
| | µl je Probe |
|--|-------------|
| SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix | 2.5 |
| HP23S SBE upp (10pmol) | 0.1 |
| HP23S SBE low (10pmol) | 0.1 |
| HPLC Wasser | 1.3 |
| DNA | 1 |
| Σ | 5 |

Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei 4°C gelagert. Im Anschluss wurden erneut überschüssige ddNTPs durch 1µl alkaline Phosphatase entfernt, indem die Proben bei 37°C für eine Stunde inkubiert wurden. Anschließend wurde das Enzym für 15min bei 75°C deaktiviert (SNaPshot™ Multiplex Kit Protocol 2000). Das nun vollständig gereinigte Produkt wurde mit 12µl Hi-Di™ Formamid (Fluka) und 0.25µl des Längenstandards GeneScan™-LIZ 120™ für 5min bei 95°C denaturiert, anschließend gekühlt und in die Probengefäße für die Kapillarelektrophorese überführt.

SNaPshot-Analyse

Die Analyse der Mutationen wurde auf einem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer mit dem Polymer POP-4™ (Applied Biosystems) durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung fand nach bereits beschriebenen Parametern für die Fragmentlängenanalyse statt, jedoch unter Verwendung der Fünffarbanwendung (SNaPshot™ Multiplex Kit Protocol 2000). Die durch die eingesetzten Primer definierten Nukleotidpositionen werden abhängig von der Farbmarkierung der Base als Peak im Elektropherogramm dargestellt (Abb. 15). Die untersuchten Mutationen liegen an den nebeneinander liegenden Positionen 2142 und 2143, so dass ein Primer an den *upper* und einer an den *lower* Strang der Doppelhelix bindet. Um die Ergebnisse des *lower strands* mit Literaturdaten vergleichen zu können, müssen die komplementären Basen beachtet werden. Daher entspricht ein „T“ an zweiter Position des Systems der Realisierung der Base „A“ in der Probensequenz.

Abb. 15: Die Darstellung zeigt die möglichen Allelausprägungen von *H. pylori* an den Sequenzpositionen 2142 und 2143 für das 23S rRNA kodierende Gen und deren beobachtete Häufigkeiten (van Doorn et al. 2001). Als Peak dargestellt die Ergebnisse des Elektropherogramms, der abgeleitete Genotyp entspricht der tatsächlichen Ausprägung auf Sequenzebene (Abbildung: O. Warnberg).



6.10 Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die Konservierungsflüssigkeiten der historischen Gewebeproben wurden durch Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC/MS) analysiert. Die Analysen wurden durch die Abteilung für Zentrale Analytik des Instituts für Organische und Biomolekulare Chemie unter Leitung von Dr. Frauendorf durchgeführt.

Das grundsätzliche Prinzip der GC/MS beinhaltet ein Durchlaufen von Chromatographiesäulen mit unterschiedlichen, substanzspezifischen Retentionszeiten, wonach die getrennten Stoffe ionisiert werden. Der Transport der Substanzen in die Ionenquelle erfolgt durch das Trägergas Helium bei einer Flussrate von 1ml/min. Die Ionisierung erfolgt durch Elektronenstoß (*electron impact*, EI) mit einer Ionisierungsenergie von 70eV (Budzikiewicz 1992), wodurch Radikalkationen ($[M]^+$) entstehen. Die übertragene Energie bewirkt eine Fragmentierung der Ionen in charakteristische Fragmentionen. Die so erzeugten Ionen werden mittels eines Massenanalysators (hier ein Quadrupol) entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) getrennt und am Detektor registriert. Durch Computer können die Signale visualisiert und in Form eines Totalionenstrom-Chromatogrammes mit den zugehörigen Massenspektren dargestellt wer-

den. Der Peak im Chromatogramm stellt ein ungefähres Maß für die Konzentration der Komponenten (y-Achse) in Abhängigkeit von der Zeit (x-Achse) dar. Über den Abgleich mit einer Massenspektrenbibliothek (NIST, Wiley) können die aufgenommenen Massenspektren der getrennten Komponenten aus dem Stoffgemisch mit Referenzsubstanzen verglichen und dadurch identifiziert werden.

Die Messungen erfolgten an einem GC/MS DSQ (EI, CI, mit Trace GC-Ultra) der Firma Thermo Finnigan. Das Gerät eignet sich zur Untersuchung komplexer flüchtiger Substanzen. Die Daten wurden aus 250µl Probe bei einer Absorption für 10min gewonnen. Das Programm lief für 8min bei 40°C, 10°C/min auf 250°C und abschließend 1min bei 250°C. Der Scan-Bereich betrug 29 bis 300m/z. Als SPME-Faser wurde Carboxen/Polydimethylsiloxan (75µm) der Firma Supelco verwendet.

In einer zusätzlichen Analyse sollte Pikrinsäure in den Konservierungsmitteln nachgewiesen werden, da dies ein häufiger Bestandteil von Fixierungsmitteln ist. Die direkte Messung erfolgte mit der Ionisierungstechnik ESI-TOF an einem MicroTOF der Firma Bruker Daltonik. Der Nachweis von Pikrinsäure erfolgte durch direkte massenspektrometrische Bestimmung aus der Lösung durch *Electrospray Ionization* (ESI). Die drei wichtigsten Abläufe der ESI sind Bildung eines Sprays feiner, ladungstragender Tröpfchen durch Anlegen einer Hochspannung, Verkleinerung der Tropfen und Übergang von Ionen in die Gasphase (Desolvatisierung) (Kearle & Tang 1993). Bei dem Electrospray-Verfahren wird die Probe bei Atmosphärendruck in ein stark elektrisches Feld, ggf. mit Unterstützung durch ein Inertgas (Stickstoff), versprüht. Durch eine anliegende Spannung (kV) werden die Bestandteile der Probe zerstäubt und können ionisiert werden. Die so erzeugten Ionen werden durch einen Massenanalysator (hier ein *Time-of-Flight*-Massenspektrometer) hinsichtlich ihres m/z-Verhältnisses getrennt und am Detektor registriert (Gaskell 1997). Im Falle der Analyse von Pikrinsäure wurden die Messungen im negativen Ionen-Modus durchgeführt, da sie bevorzugt negative Ionen durch Deprotonierung bildet ($[M-H]^-$).

Insgesamt lagen zwei Proben von Konservierungsflüssigkeiten aus Wien, neun aus Zürich, drei aus Berlin und eine aus Tartu vor.

7 Analyseergebnisse

7.1 Histologische Begutachtung

Die histologische Begutachtung der historischen Proben wurde durchgeführt, um die initialen Diagnosen, die bis zu 180 Jahre alt sind, zu überprüfen und um eine Klassifizierung nach aktuellen pathologischen Richtlinien vorzunehmen. Dies war nötig, damit ein Vergleich mit rezentem Material gewährleistet werden konnte. Ferner ermöglichte der histologische Befund eine Abgrenzung zwischen nicht-karzinogenem Kontroll- und Tumorgewebe.

Voraussetzung für die Identifikation von tumorspezifischen Mutationen war, dass von allen Proben Kontrollgewebe ohne Einstreuung von Tumorzellen und Tumorgewebe vorhanden war, um einen Vergleich zwischen den Gewebetypen zu ermöglichen.

Die histologischen Befunde ergaben, dass es sich nicht bei allen Gewebeproben tatsächlich um Karzinome der heutigen Klassifizierung handelt. Proben, die die zusätzliche Bemerkung „kein Karzinom“ enthalten, wurden von der Gesamtauswertung der Untersuchung des Tumorsuppressorgens p53 und der Identifikation von *H. pylori* ausgeschlossen. Daher standen für die Folgeuntersuchungen 47 von 51 Proben zur Verfügung.

Die folgenden Tabellen (20-23) zeigen die originale makroskopische Beschreibung der Pathologie im Vergleich zur histologischen Begutachtung der Gewebeproben durch PD Dr. Hemmerlein bzw. Dr. Perske. Aufgrund der zum Teil starken autolytischen Veränderungen waren nicht bei allen Proben eindeutige Aussagen möglich. Die histologische Typisierung erfolgte nach der aktuellen WHO-Klassifikation (2010), die zusätzliche Klassifizierung der Karzinome nach intestinal oder diffus richtete sich nach Laurén (1965).

Tab. 20: Pathologie der Proben aus Berlin. Legende gilt für alle folgenden Tabellen: ADK: Adenokarzinom; diff.: differenziert

| Probenname | Originalbeschreibung | Histologie | |
|------------|--|--|-----------------------|
| 33/1947 | maligner Tumor: kleines schlüsselförmiges Carcinom, mehrere Polypen und chron. Katarrh des Magens | ADK mit Lymphgefäß- | intestinal |
| 746/1951 | schlüsselförmiges Karzinom: handflächengroßer, schlüsselförmig zerfallender Krebs der Cardia des Magens im Bereich der kleinen Krümmung mit Übergreifen auf den unteren Oesophagus | ADK | intestinal/ diffus |
| 176/1952 | maligner Tumor: Cardiacarcinom bei bleistift-dicker Stenose des Mageneingangs | Muskel mit Entzündung und Tumorinfiltraten | diffus |
| 415/1953 | maligner Tumor, bösartiges Gewächs: stenosierendes Carcinom des Pylorus | muzinöses ADK | intestinal |
| 461/1953 | maligner Tumor, Geschwulst: auf den Oesophagus übergreifendes Cardiacarcinom | Plattenepithelkarzinom | |

| Probenname | Originalbeschreibung | Histologie | |
|------------|--|------------------------------------|------------|
| 29/1955 | bösartiges Geschwür: kleines ulceriertes Carcinom der Hinterwand | ulzeriertes und nekrotisiertes ADK | intestinal |
| 734/1955 | szirrhöses Karzinom: polypöses Magenkarzinom | ADK | diffus |
| 1113/1955 | maligner Tumor, bösartiges Gewächs: stenosierendes Pyloruscarcinom | Autolyse; einzelne Tumorderivate | |
| 1160/1955 | maligner Tumor, bösartiges Geschwür: flachpapilläres, exulceriertes Cardiacarcinom | wenig diff. ADK | diffus |
| 949/1956 | maligner Tumor, bösartiges Gewächs: Magenkarzinom: Tumoreinwachsung in die Milz, gedeckte Magenperforation | ADK | diffus |
| 777/1959 | maligner Tumor: Cardiacarcinom | ADK | intestinal |
| 722/1960 | bösartiges Geschwür: schlüsselförmiges Cardiacarcinom | ADK, wandinfiltrativ | intestinal |
| 741/1963 | maligner Tumor, bösartiges Gewächs: ulzeröses Kardiakarzinom des Magens | oberflächliches ADK | intestinal |
| 1234/1964 | maligner Tumor, bösartiges Geschwulst: Cardiacarcinom des Magens | muzinöses ADK | intestinal |
| 1294/1964 | schlüsselförmiges Karzinom: schlüsselförmiges Magencarcinom | ADK | intestinal |

Tab. 21: Pathologie der Proben aus Tartu

| Probenname | Originalbeschreibung | Histologie | |
|------------|---|--|-----------------------|
| 430 | Sarcoma ventriculi | submuköse Infiltrate, ADK | intestinal |
| 432 | Carcinoma gelatinosum ventriculi | Infiltrate, siegelringzellhaltiges ADK | diffus |
| 434 | Carcinoma partis cardiaca ventriculi | Magenschleimhaut mit Entzündung und einem intestinalen ADK | intestinal |
| 443 | Carcinoma exulcerans ventriculi | Autolyse, Entzündung und fragliches ADK | intestinal/ diffus |
| 444 | Polypositas ventriculi | Anteile eines drüsigen Tumors, ADK | intestinal |
| 448 | Polypus ventriculi cum carcinomate cylindrocellulare | regelhafte Duodenalwandung (kein Karzinom) | |
| 449 | Carcinoma cylindrocellulare papillomatosum ventriculi | ausgedehnte drüsige Tumorinfiltrate, ADK | intestinal |
| 455 | Papilloma ventriculi | autolytische Magenwand mit drüsigen Tumoranteilen, ADK | intestinal |
| 456 | Carcinoma pylori ventriculi | intestinale Metaplasie und Lymphangiomas carcinomatosa | Lymph. |
| 593 | Carcinoma papillomatosum cylindrocellulare ventriculi | drüsige Tumoranteile, ADK | intestinal |

Die Proben aus Wien sind durch eine starke autolytische Veränderung des Gewebes gekennzeichnet, die weitere Untersuchungen z.T. unmöglich machte. Ausgeprägte Autolyse konnte bei den Proben 476, 11773, 1003, 4674, 33003, 5474, 8753 und 11768 beobachtet werden.

Tab. 22: Pathologie der Proben aus Wien

| Probenname | Originalbeschreibung | Histologie | |
|------------|---|---|-----------------------|
| 476 | Carcinoma simplex capitis pancreatis | ADK, G2-3 | intestinal |
| 11773 | Carcinoma ventriculi in ulcere peptica | Musculus mit wenigen Karzinomzellen, G3 | diffus |
| 1003 | Carcinoma ventriculi | teils muzinös intestinal, teils siegelringzellhaltig | intestinal |
| 4674 | Carcinoma scirrhosum infiltrans ventriculi | ADK, G3 | diffus |
| 12675 | Carcinoma scirrhosum ventriculi | ADK mit Siegelringzellen, G3 | diffus |
| 33003 | Carcinoma pylori | ADK mit Siegelringzellen, G3 | diffus |
| 5474 | Carcinoma fungosum exulceratum partis pyloricae | ADK, G2 | intestinal |
| 14446 | Carcinoma infiltrans ventriculi | ADK mit Siegelringzellen, G3 | diffus |
| 11807 | Carcinoma scirrhosum ventriculi fere totius | ADK mit Siegelringzellen, G3 | diffus |
| 11808 | Carcinoma scirrhosum ventriculi | Siegelringzellkarzinom, G3 | diffus |
| 18616 | mehrfach krebsig entartete Magentypen | ADK, G2 | intestinal |
| 8753 | Carcinoma in ulcere peptico ventriculi | ADK, teils muzinös intestinal, teils siegelringzellhaltig, G2-3 | intestinal/ diffus |
| 11794 | Carcinoma scirrhosum infiltrans ventriculi | Magenwand-Corpus, wenig Karzinomzellen, ADK, G3 | diffus |
| 11768 | Carcinoma simplex exulceratum curvaturae majoris ventriculi | Magenwand ohne Malignität (kein Karzinom) | |
| 8043 | Carcinoma papillae vateri | ADK, G2 | intestinal |
| 14983 | Carcinoma granulomatosum ventriculi | ADK mit Siegelringzellen, G3 | diffus |
| 8695 | Carcinoma ventriculi | ADK, G3 | diffus |
| 15809 | Carcinoma ventriculi | ADK, G3 | diffus |

Tab. 23: Pathologie der Proben aus Zürich

| Probenname | Originalbeschreibung | Histologie | |
|------------|---|--|------------|
| 322/1906 | Ulcus rotund. ventriculi regionis pyloricae; Diagnosis clinica: Carcinoma ventriculi | Entzündung, intestinale Metaplasie, Hyperplasie (kein Karzinom) | |
| 774/1930 | Colloid-Carcinom der Cardia ventriculi auf den Oesophagus übergreifend | Infiltrate eines wenig diff. Siegelringzellkarzinoms, ADK, G3 | diffus |
| 1356/1935 | Carcinoma solidum simplex des Magens mit Tumorthromben in den Venen der Magenwand und Einwachsen in die Vena portae | autolytische Magenschleimhaut, Infiltrat durch hoch- bis mitteldiff. ADK | intestinal |
| 8454/1951 | Carcinoma, entartete Magenschleimhaut, Polypen | Tubulovillöses Adenom der Magenschleimhaut mit hochgradiger Dysplasie; Übergang in mäßig diff. ADK, G2 | intestinal |
| 13901/1958 | Giant-rugae Gastritis, sek. polyposeres Carcinom | Tubuläres Adenom mit hochgradigen Dysplasien; Übergang in mäßigdiff. ADK, G2 | intestinal |
| 1094/Z | Carcinoma pylori | Magenschleimhaut mit Infiltraten eines mäßigdiff. ADK, G2 | intestinal |
| 1/Z | - | mäßigdiff. ADK, G2 | intestinal |
| 2/Z | - | Corpuschleimhaut, akute Entzündung, Hyperplasie (kein Karzinom) | |

Beispielhaft werden im Folgenden einige Diagnosen anhand von histologischen Schnittpräparaten der Gewebeproben vorgestellt.

Die Abbildungen 16 a und b zeigen Kontrollgewebe von Probe 448 aus Tartu. Auf der linken Seite ist die chronische Entzündung des Gewebes verdeutlicht (a). Die entzündungstypischen Lymphozyten (Pfeil) werden durch die Färbung als blaue Punkte dargestellt, die Drüsenlichtungen erscheinen weiß (Stern), das sie umgebende Drüsenepithel ist von Granulozyten als Ausdruck der akuten Entzündung durchsetzt. Im rechten Bildausschnitt (b) wird die intestinale Metaplasie, eine mögliche Vorstufe von Magenkarzinomen, mit den für sie charakteristischen Becherzellen (z.B. Pfeil) gezeigt.

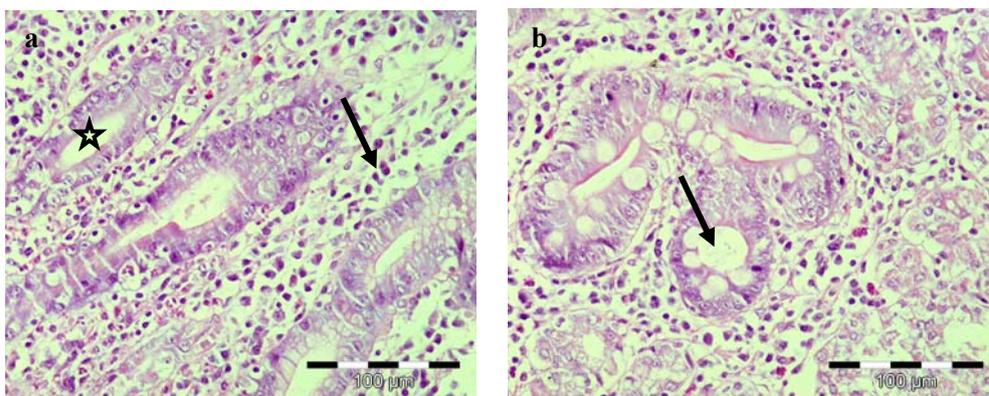


Abb. 16: Chronische Entzündung (a) und intestinale Metaplasie (b) von Probe 488 aus Tartu.

Abbildung 17 zeigt eine Lymphangiosis carcinomatosa in Probe 456 aus Tartu, links (a) in einer Übersicht im Querschnitt durch die Magenwand und rechts (b) als Vergrößerung. Die Tumorzellen sind von der Submukosa, die aus lockerem Bindegewebe besteht, in das Lymphgefäß eingewandert und können so zu Metastasen in Lymphknoten führen. Die Mukosa ist tumorfrei, der primäre Tumor an der Mukosa ist nicht abgebildet.

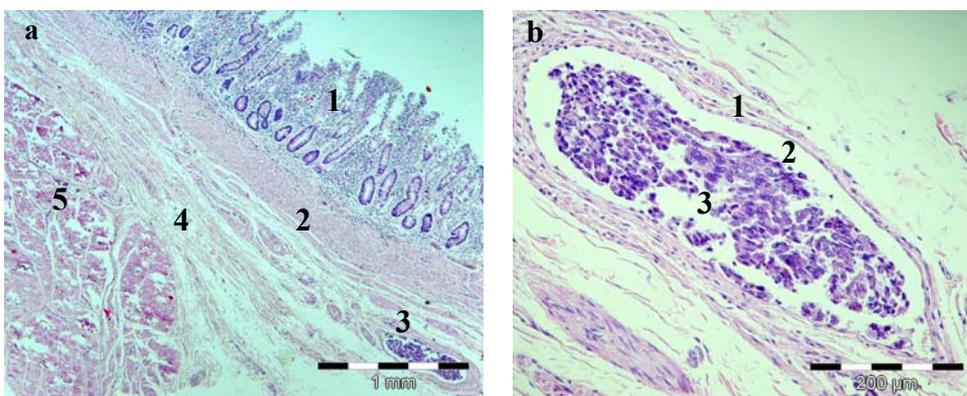


Abb. 17: 456 aus Tartu: a: Querschnitt durch den Magen: 1. Mukosa, leicht autolytisch verändert; 2. Muscularis mucosae; 3. Lymphangiosis carcinomatosa im rechten unteren Rand in der (4.) Lamina submukosa; 5. Muskularis; b: Vergrößerung: 1. Gefäßwand; 2. Lymphgefäßlumen; 3. Tumorzellverband.

Das Schnittpräparat der Berliner Probe 461/1953 (Abb. 18) zeigt ein Plattenepithelkarzinom. Dabei handelt es sich um einen malignen Tumor, dessen Zellen vom Plattenepithel ausgehen. In den meisten Fällen handelt es sich um ein Ösophaguskarzinom, welches sich auf den Magen ausgedehnt hat. Dieser Karzinomtyp ist im Vergleich zum Adenokarzinom durch solide Verbände größerer Tumorzellen, das Fehlen von Drüsen sowie Bildung von Keratin und Interzellularbrücken gekennzeichnet.

Abbildung (19) zeigt ein muzinöses Adenokarzinom, welches durch seine extrazelluläre Schleimbildung charakterisiert ist. Neben muzinösen Anteilen sind auch Siegelringzellen in der Mitte des Dünnschnitts zu erkennen.

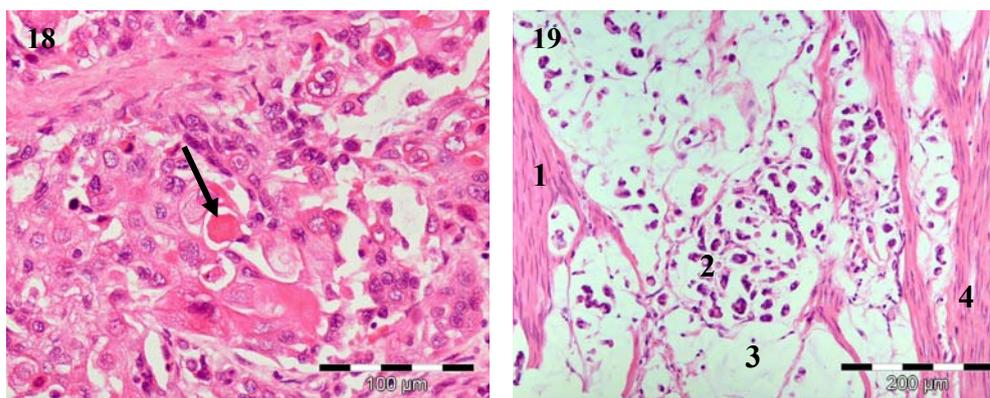


Abb. 18: Plattenepithelkarzinom bei Probe 461 aus dem Jahr 1953. Das Keratin der verhornten Zellen wird durch die Färbung intensiv rosa (z.B. Pfeil).

Abb. 19: Muzinöses Adenokarzinom in der Mitte des Dünnschnitts. 1+4. Muskularis; 2. Tumorzellen, mit lila gefärbtem Kern und pinkfarbenem Zytoplasma, zwischen den Tumorzellen in weiß mit blass rosafarbenem Schleier (3.) der extrazellulär gebildete Schleim.

Die autolytische Veränderung der Magenwand wird beispielhaft an der Probe 455 aus Tartu gezeigt (Abb. 20). Drüsen- und Magenwandstruktur sind nur noch schemenhaft erkennbar. Zytoplasma und Kerne der Zellen sind weitgehend homogenisiert.

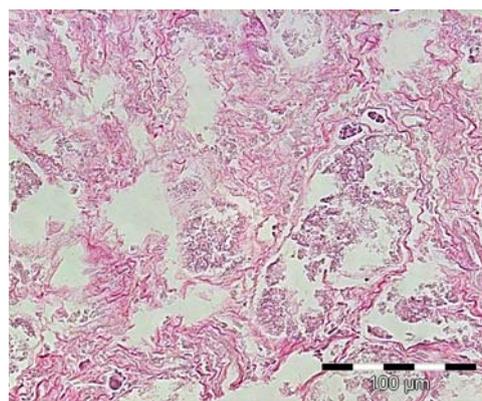


Abb. 20: Autolyse des Gewebes von Probe 455.

Eine Giemsa-Färbung, die zusätzlich zur H.E.-Färbung von einigen Proben angefertigt wurde, konnte in vereinzelten Fällen die Anwesenheit von Bakterien im Gewebe nachweisen. Einen positiven Befund der Giemsa-gefärbten Proben gab es bei Proben aus Tartu mit den Nummern 443, 444, 455 und 456 und wenigen Berliner Proben.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Giemsa-gefärbte Probe 415/1953 ohne Bakteriennachweis (Abb. 21a) und Probe 734/1955, in der vermutlich *E. coli* (21b, siehe Pfeil) und die Anwesenheit von Pilzen (21c, u.a. siehe Pfeil) bestätigt werden konnte. *H. pylori* konnte in keiner Probe gesichert festgestellt werden.

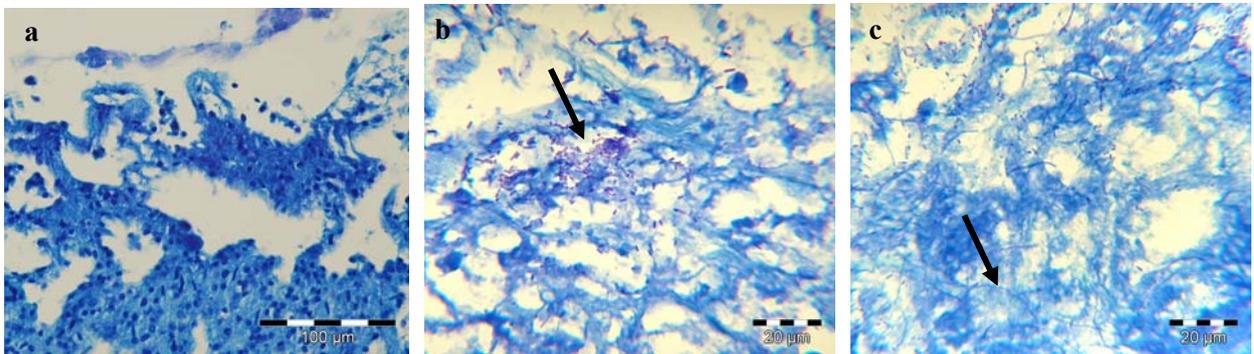


Abb. 21 a: Giemsa-Färbung ohne Bakteriennachweis, die weißen Flächen sind optische Hohlräume, die mit Schleim gefüllt waren; **b:** Die lila gefärbten Stäbchen in der Mitte des Bildes könnten *E. coli* sein; **c:** Die Pilze sind fadenförmig und durchziehen den ganzen Schnitt.

7.2 Molekulargenetische Untersuchungen

Die chemische Behandlung von Geweben reduziert den Erfolg von PCR-basierten Amplifikationen. Dennoch konnten p53-Mutationen und *H. pylori*-Infektionen der historischen Magenkarzinome nachgewiesen werden, wie die folgenden Kapitel zeigen.

7.2.1 DNA-Erhaltung

Insgesamt wurden 51 Feuchtgewebeprobe von Magenkarzinompatienten aus vier verschiedenen europäischen Sammlungen untersucht. Unter Einbeziehung aller Teiluntersuchungen ist festzustellen, dass die Berliner Proben die beste DNA-Erhaltung aufweisen. Material aus Tartu und Zürich ist in seiner Erhaltung divers, so dass nicht von allen Proben vollständige genetische Daten generiert werden konnten. Einzig die Proben aus Wien sind durch sehr schlechten DNA-Gehalt gekennzeichnet, aus ihnen konnten nur wenige Ergebnisse generiert werden.

Die Amplifikationserfolge des p53-Analysesystems und der genetischen Typisierung zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster. Daraus wird deutlich, dass die Unvollständigkeit der Ergebnisse nicht auf das jeweilige Untersuchungssystem an sich, sondern auf den Degradierungsgrad der Proben-DNA zurückzuführen ist.

Tabelle 24 zeigt den Amplifikationserfolg der Analysesysteme. Ein „vollständiges“ Ergebnis impliziert reproduzierbare Daten; „unvollständig“ heißt, dass Sequenzabschnitte bzw. Allele

amplifiziert werden konnten, aber nicht in allen Fällen eine Reproduktion möglich war. „Kein“ Amplifikationserfolg bedeutet, dass vereinzelt Sequenzabschnitte und Allele detektiert werden konnten, aber in nahezu keinem Fall eine Wiederholung möglich war. Proben, die nach mehreren Anpassungsversuchen (z.B. Erhöhung der Gewebemenge in die Extraktion, Erhöhung des Proteinase K-Gehaltes, Erhöhung der Extraktmenge in die PCR oder höhere Zyklenzahl in der PCR) keine verbesserten Typisierungsergebnisse zeigten, wurden von der weiteren Auswertung der Ergebnisse ausgenommen.

Tab. 24: Amplifikationserfolg der Analysensysteme für die p53-Untersuchung und der autosomalen STRs

| Sammlung | Probenanzahl | p53 | | STRs | |
|----------|--------------|---------------|----|---------------|----|
| Berlin | 15 | vollständig | 14 | vollständig | 13 |
| | | unvollständig | 1 | unvollständig | 1 |
| | | keine | 0 | keine | 1 |
| Tartu | 10 | vollständig | 5 | vollständig | 4 |
| | | unvollständig | 5 | unvollständig | 3 |
| | | keine | 0 | keine | 3 |
| Wien | 18 | vollständig | 0 | vollständig | 3 |
| | | unvollständig | 1 | unvollständig | 3 |
| | | keine | 17 | keine | 12 |
| Zürich | 8 | vollständig | 2 | vollständig | 3 |
| | | unvollständig | 0 | unvollständig | 0 |
| | | keine | 6 | keine | 5 |

Abbildung 22 zeigt die heterogenen Amplifikationsergebnisse am Beispiel von Proben aus Wien und des p53-Analysesystems. Von Probe 14446 konnten drei der vier p53-Fragmente amplifiziert werden, bei 4674 hingegen nur eines. Alle anderen Proben enthielten nicht genügend Ausgangs-DNA, um einen Amplifikationserfolg verzeichnen zu können. Als Längenstandard diente eine 1kb-Leiter (Invitrogen), deren Längen in Basenpaaren rechts neben der Abbildung dargestellt sind.



Abb. 22: Amplifikationserfolg des p53-Primersets „b“ bei Proben aus Wien.

Um auszuschließen, dass die schlechte DNA-Erhaltung des Wiener Materials auf Inhibitoren in den Aufbewahrungsflüssigkeiten zurückzuführen ist, wurden Extrakte mit Standard-DNA (K562, Promega) versetzt und amplifiziert. Abbildung 23 zeigt ein Agarose-Gelbild mit den Proben 14446 und 18616, die mit K562 versetzt wurden. Durch die Fragmentlängenanalyse konnte ein vollständiges Profil der Standard-DNA und zusätzlich einzelne Allele der alten Proben generiert werden. Eine Inhibition der PCR als Ursache der fehlenden Daten kann damit ausgeschlossen werden.

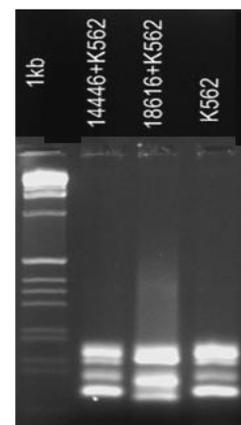


Abb. 23: Inhibitionstest

7.2.2 Tumorsuppressorgen p53

Die Analysefähigkeit der Primer und der Multiplex-Anwendung für die Untersuchung des Tumorsuppressorgens wurde an rezenter Mitarbeiter-DNA bzw. an Standard-DNA von K562 (Promega) getestet. Die Primerpaare erzielten einzeln und in Kombination einer Multiplex-PCR sehr gute Resultate. Beispielhaft wird der Amplifikationserfolg an Abbildung 24 dargestellt. Links neben der Abbildung sind die Fragmentlängen der Produkte abgebildet. Einige Proben zeichnen sich durch so gute DNA-Erhaltung aus, dass durch Verbindung des 5/2 *upper* Primers und des 6/1 *lower* Primers ein etwa 300bp großes Produkt entstand, welches das Intron zwischen Exon 5 und 6 einschloss. Mitgeführte Leerkontrollen waren in allen Amplifikationen negativ.

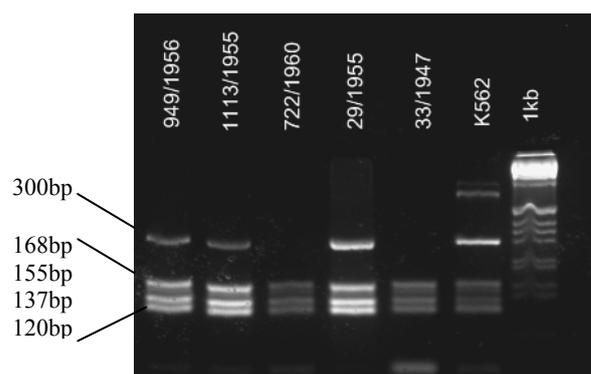


Abb. 24: Amplifikationserfolg mit dem p53-Primerset „b“ bei Proben aus Berlin. K562 diente als Positivkontrolle, die 1kb-Leiter als Längenstandard.

Je Probe wurde sowohl gesundes Kontroll- als auch Tumorgewebe getrennt voneinander extrahiert, amplifiziert und anschließend sequenziert. Als „Mutationen“ wurden nur solche Veränderungen aufgenommen, die in der Tumor-DNA, nicht jedoch in der Kontroll-DNA detektiert wer-

den konnten und reproduzierbar waren. Ein Beispiel für eine reproduzierbare Mutation -ein C zu T-Austausch an Probe 949/1956- ist in Abbildung 25 dargestellt. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Referenzsequenz X54156, darunter die Sequenz der Kontroll-DNA im Vergleich zur Tumor-DNA. Die veränderte Base ist an Position 13109 in rot markiert.

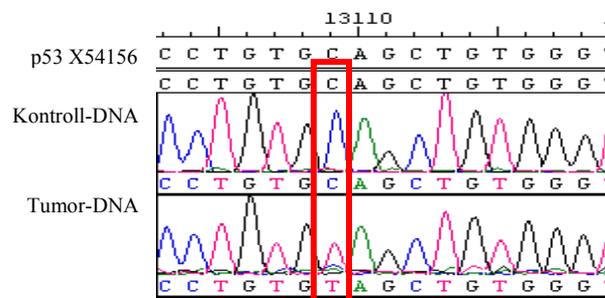


Abb. 25: Elektropherogramm eines Sequenzabschnitts von Exon 5 bei Probe 949/1956.

Von 45% (21 der 47) der Proben mit Magenkarzinomen konnten vollständige Sequenzen der Exons 5 bis 8 generiert werden. Davon hatten acht Proben eine und drei Proben zwei Mutationen, daraus ergibt sich eine Mutationsrate von 52%. Bei zehn Proben konnten keine reproduzierbaren Veränderungen detektiert werden. Drei verschiedene Mutationsereignisse wurden in Exon 5 detektiert und vier verschiedene in Exon 7, davon eines bei vier Proben. Außerdem konnten drei Mutationsereignisse in Exon 8, davon eines bei zwei Proben, detektiert werden. Da ein spezifisches Mutationsereignis (M246K) in verschiedenen Proben vorkam, ist absolut betrachtet die Hälfte der Veränderungen in Exon 7 lokalisiert.

Die Nomenklatur der Mutationen auf Ebene der genomischen DNA und dem Proteinlevel folgt Antonarakis et al. (Antonarakis 1998, den Dunnen & Antonarakis 2000).

Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse der Sequenzierung. „Q144X“ bedeutet, dass aus der Aminosäure Glutamin an Codon 144 durch Mutation ein Stoppcodon entstanden ist. „S166fsX180“ bedeutet, dass an Codon 166 mit der Aminosäure Serin eine Insertion stattgefunden hat und es so zu einer Leserasterverschiebung (*frame-shift*, fs) gekommen ist, die bei Codon 180 zu einem Stoppcodon führt.

Zur Unterscheidung der Standorte ist die Probe aus Tartu durch das Präfix „Ta“ und die Probe aus Zürich durch „Z“ gekennzeichnet. Spalte vier bezieht sich auf die Referenzsequenz der genomischen DNA von p53 (X54156, www.ncbi.nlm.nih.gov). Im vorderen Teil werden die Basenposition und die Basenabfolge des Codons vor und nach Mutation gezeigt, im hinteren die veränderten Basen.

Alle im Folgenden vorgestellten Ergebnisse haben als Grundlage die in Kapitel 2.1.4 vorgestellten Datenbanken *IARC TP53 Database* und *TP53 Web Site*.

Tab. 25: Ergebnisse der p53-Sequenzierung

| Aminosäure | Exon | Probenbezeichnung | genomische DNA X54156 | |
|------------|------|--|-----------------------|-------|
| Q144X | 5 | 949/1956 | cag13109tag | C > T |
| P152P | 5 | 777/1959 | ccg13135cca | G > A |
| S166fsX180 | 5 | Ta 430 | tca13174insA (atc) | InsA |
| G244V | 7 | 1160/1955 | ggc14058gtc | G > T |
| M246K | 7 | 1113/1955 1160/1955 949/1956 777/1959 | atg14064aag | T > A |
| R248W | 7 | 461/1953 | cgg14069tgg | C > T |
| L257V | 7 | 746/1951 | ctg14096gtg | C > G |
| R267R | 8 | Z 1356/1935 | cgg14470cga | G > A |
| E271K | 8 | 1294/1964 | gag14480aag | G > A |
| K291E | 8 | 722/1960 1234/1964 | aag14540gag | A > G |

In der nachfolgenden Tabelle werden weitere Informationen zu den einzelnen Mutationen aufgeführt (Tab. 26). Als Mutationstyp (Spalte zwei) wird die Art der Mutation bezeichnet, ob entweder *nonsense*-, *silent*- oder *missense*-Mutationen realisiert sind. Die Ergebnisse zeigen, dass nur die Veränderung Q144X direkt zu einer *nonsense*-Mutation mit Entstehung eines Stoppcodons führt. Die Insertion in Codon 166 führt zu einer *frame-shift*-Mutation (siehe oben). *Silent*-Mutationen, bei denen durch den Nukleotidaustausch keine Veränderung in der Aminosäuresequenz folgte, entstanden zweimal (P152P und R267R).

Die sechs *missense*-Mutationen können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zu Gruppe 1 gehören die Mutationen G244V, M246K und R248W, die in den *DNA binding loops* vorkommen. L257V, E271K und K291 werden unter 2 als „verbleibende“ *missense*-Mutationen eingefügt.

Die Substitution (Spalte drei) unterscheidet Transitionen (Purin- zu Purinbase bzw. Pyrimidin- zu Pyrimidinbase) und Transversionen (Pyrimidin- zu Purinbase oder umgekehrt). Bei den identifizierten Mutationen handelt es sich um sieben Transitions- und um sechs Transversionsereignisse. Siehe dazu auch Abbildung 26.

CpG-Inseln (Spalte vier) sind DNA-Bereiche, in denen eine C-G-Kopplung häufig vorkommt. Kommt es zu einer Methylierung des Cytosinrestes kann häufig keine Transkription stattfinden. Zwei Mutationen sind an CpG-Inseln lokalisiert.

Als einzige Mutation befindet sich E271K an einer *splice site* (Spalte fünf), welche beim Spleißen die Grenzen der Exons und Introns markieren. Die Veränderung betrifft ein Nukleotid, welches in der Sequenz verantwortlich ist, um p53-delta-Isoformen zu produzieren. Alle anderen Mutationen kommen außerhalb dieser Grenzen vor.

Das *Codon Usage* (Spalte sechs) gibt an, mit welcher Häufigkeit Codons des genetischen Codes -hier bei *Homo sapiens*- realisiert sind (Quelle: www.kazusa.or.jp/codon). Bei vier der zehn verschiedenen Ereignisse ist eine theoretische Zunahme des Codongebrauchs, bei fünf eine Abnahme und in einem Fall keine Veränderung zu verzeichnen. Selten verwendete Codons können die Translation bremsen, während häufige sie beschleunigen können.

Tab. 26: Informationen zu Mutationstypen, Substitution, Lokalisation an CpG-Inseln, Vorkommen der Mutationen an einer *splice site* und Veränderung des Codongebrauchs bei *Homo sapiens*

| Aminosäure | Mutationstyp | Substitution | CpG-Insel | <i>splice site</i> | Codon Usage |
|------------|--------------|--------------|-----------|--------------------|-------------|
| Q144X | nonsense | Transition | nein | nein | 34.2 > 0.8 |
| P152P | silent | Transition | ja | nein | 6.9 > 16.9 |
| S166fsX180 | frame-shift | | nein | nein | 12.2 > 20.9 |
| G244V | missense | Transversion | nein | nein | 22.3 > 14.5 |
| M246K | missense | Transversion | nein | nein | 22.1 > 31.9 |
| R248W | missense | Transition | ja | nein | 11.5 > 13.2 |
| L257V | missense | Transversion | nein | nein | 39.8 > 28.2 |
| R267R | silent | Transition | nein | nein | 11.5 > 6.2 |
| E271K | missense | Transition | nein | ja | 39.6 > 31.9 |
| K291E | missense | Transition | nein | nein | 31.9 > 39.6 |

Tabelle 27 zeigt die Auswirkungen der Mutationen auf die Transaktivierungen von einigen Genen, die in das p53-Netzwerk eingebunden sind. Kato und Kollegen (2003) unterscheiden vier Transaktivierungsklassen bei den acht untersuchten Promotoren, die als Prozent des Wildtypproteins dargestellt werden. 1. nicht funktional: < 20; 2. teilweise funktional 20-75; 3. funktional: 75-140; 4. supertrans: > 140.

Die vier Mutationsereignisse G244V, M246K, R248W und L257V werden als nicht funktional eingestuft. E271K bleibt teilweise und K291 vollständig funktional. Von den *silent*-Mutationen P152P und R267R wird angenommen, dass die Wildtypfunktionalität weiter vorhanden ist (Kato et al. 2003). Die Mutation Q144X wurde nicht untersucht, daher stehen keine Ergebnisse zur Verfügung. Für die *frame-shift*-Mutation S166fs stehen ebenfalls keine Daten zur Verfügung, da durch die Kato-Arbeitsgruppe nur *missense*-Mutationen untersucht worden sind.

Tab. 27: Transaktivierungskapazitäten der identifizierten Mutationen in Hefe (Kato et al. 2003); n.a.: not analyzed; wt: Wildtyp

| Mutation | WAF1 | Mdm2 | Bax | h1433s | AIP1 | Gadd45 | Noxa | p53R2 | Transaktivierungs- klasse |
|----------|------|------|------|--------|-------|--------|-------|-------|------------------------------|
| Q144X | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| P152P | wt | wt | wt | wt | wt | wt | wt | wt | wt |
| G244V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | nicht funktional |
| M246K | 0 | 0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | nicht funktional |
| R248W | 0 | 0 | 0.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | nicht funktional |
| L257V | 1.8 | 0 | 2.5 | 11.9 | 22.8 | 11.8 | 21.2 | 14.1 | nicht funktional |
| R267R | wt | wt | wt | wt | wt | wt | wt | wt | wt |
| E271K | 14.1 | 24 | 23.2 | 22.1 | 23.5 | 20.5 | 26.9 | 38.6 | teilweise funktional |
| K291E | 66.6 | 6.5 | 66.6 | 112.7 | 114.4 | 110.2 | 165.8 | 290 | funktional |

Die p53-Datenbank *TP53 Web Site* stellt online einen *p53 mutation verification test* von T. Soussi und J.M. Rubio-Nevado (2010_R1 Release, Version 2.01) zur Verfügung, mit der alle *missense*- und *nonsense*-Mutationen der kodierenden Region des p53-Gens ausgewertet werden können. Die Veränderungen werden als Mutation auf Protein- und cDNA-Ebene ausgegeben. Die folgende Tabelle beschränkt sich auf den Mutationsnamen für das Protein (Tab. 28). Zusätzlich gibt es Informationen zu veröffentlichten Häufigkeiten der Mutationen. Auch diese Datenbank ermöglicht keine Eingabe von Insertionen, so dass keine Information zur *frame-shift*-Mutation zur Verfügung steht.

Die Mutation R248W wird als bekannter *Hotspot* deklariert, was sich durch die Frequenz von 803 Einträgen widerspiegelt (Tab. 28). Ebenso sind Q144X, G244V und E271K als häufige Mutationen in der Literatur mit 57, 25 bzw. 45 Einträgen beschrieben. Zu seltenen Ereignissen gehören P152P, M246K, L257V und R267R. Einzig die Mutation K291E wurde erst zweimal beschrieben.

Die verbleibenden Aktivitäten der veränderten Proteine unterscheiden sich im Vergleich zum p53-Wildtyp (Kato et al. 2003). Bei der Mehrheit (Q144X, G244V, M246K, R248W, L257V und E271K) kommt es durch die Mutation zu einem Verlust der Proteinaktivität. Lediglich durch K291E wird die Aktivität nicht verändert. Der Test macht keine Aussage zur Aktivitätsveränderung der stillen Mutationen. Da die Aminosäuresequenz nicht verändert wird, ist eher mit indirekten Folgen der Mutationen zu rechnen.

Laut *TP53 Web Site* handelt es sich bei den identifizierten *silent*-Mutationen nicht um Polymorphismen; die Dateneinträge der *IARC TP53 Database* führen P152P und R267R jedoch als Polymorphismus auf. Ersterer wurde 15-mal publiziert, letzterer 6-mal.

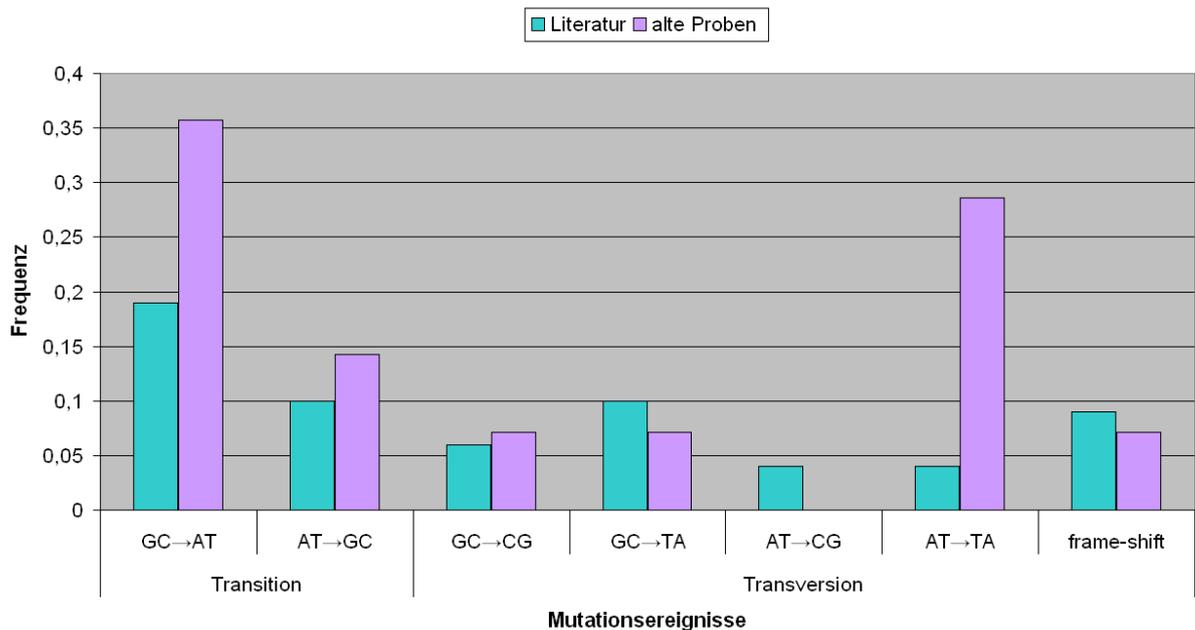
Obwohl die gleiche Studie zugrunde liegt, gibt es im Falle der Mutation E271K Unterschiede zwischen den Datenbanken mit Blick auf die Interpretation der verbleibenden Proteinaktivität. So steht eine verbleibende teilweise Funktionalität der *IARC TP53 Database* einem Verlust der Funktionalität laut des Verifikationstests gegenüber (vgl. Tab. 27).

Tab. 28: Ergebnistabelle nach dem *p53 mutation verification test* (2010 R1 Release, Version 2.01)

| Probenbezeichnung | Codon | Mutationsname | Frequenz | |
|-------------------|------------|---------------|----------|-------------|
| 949/1956 | 144 | p.Q144X | 57 | häufig |
| 777/1959 | 152 | p.P152P | 15 | selten |
| 1160/1955 | 244 | p.G244V | 25 | häufig |
| 1113/1955 | 246 | p.M246K | 12 | selten |
| 1160/1955 | | | | |
| 949/1956 | | | | |
| 777/1959 | | | | |
| 461/1953 | 248 | p.R248W | 803 | Hotspot |
| 746/1951 | 257 | p.L257V | 7 | selten |
| Z 1356/1935 | 267 | p.R267R | 6 | selten |
| 1294/1964 | 271 | p.E271K | 45 | häufig |
| 722/1960 | 291 | p.K291E | 2 | sehr selten |
| 1234/1964 | | | | |

Substitutionsereignisse werden nach den vom Austausch betroffenen Basen in Transitionen und Transversionen unterschieden (siehe oben). Abhängig vom Tumortyp sind unterschiedliche Frequenzen für die Mutationsereignisse bekannt. Die hier dargestellten Referenzwerte stammen von der *TP53 Web Site* und zeigen die genetischen Veränderungen bei Magenkarzinomen (Soussi et al. 2006). Auffällig sind die Frequenzunterschiede zwischen rezenten und historischen Tumortypen bei G:C zu A:T-Transitionen und A:T zu T:A-Transversionen (Abb. 26). Beide Ereignisse sind häufiger bei den historischen Proben beobachtet worden. Alle anderen Ereignisse kommen mit einer vergleichbaren Häufigkeit vor.

Frequenzvergleich von Mutationsereignissen zwischen Literaturdaten und eigenen Ergebnissen

**Abb. 26:** Vergleich von Substitutionsfrequenzen aus der Literatur und historischen Daten.

7.2.3 Mutationsstatus und histologischer Typ

Ein Zusammenhang zwischen einer p53-Mutation und dem histologischen Typ des Tumorgewebes (diffus vs. intestinal vs. Mischformen zwischen diffusum und intestinalem Krebs vs. Plattenepithelkarzinomen) konnte in den historischen Geweben nicht festgestellt werden ($p=0.84$). Es wurde auf einem Signifikanzniveau von 5% getestet.

7.2.4 Typisierungsergebnisse der autosomalen Marker und Amelogenin

Die Analysensysteme Oktaplex (Schilz 2006) und Heptaplex (Pfister 2008, Hollerbuhl 2009) wurden speziell für die Untersuchung von autosomalen STR-Markern und Amelogenin bei aDNA entwickelt (Kap. 6.8). Auf Probleme und Lösungsstrategien für die Auswertung von Typisierungsergebnissen von aDNA wird verzichtet und auf Schilz (2006) verwiesen.

Wie bereits in Kapitel 7.2.1 angedeutet, war der Amplifikationserfolg der autosomalen STR-Typisierung der Proben aus den verschiedenen medizinhistorischen Sammlungen sehr unterschiedlich. Eine Individualisierung jeder Probe war somit nicht möglich. Für insgesamt 49% (23 von 47) der Proben konnten vollständige genetische Fingerabdrücke generiert werden und sieben Proben ermöglichten reproduzierbare Ergebnisse in einzelnen Systemen. Die häufigsten positiven Ergebnisse konnten für die kürzeren Systeme (TH01: 86-102bp, D13S317: 103-131bp, Amelogenin: 107 und 113bp) ermittelt werden. Damit wird erneut die Annahme bestätigt, dass die zum Teil unzureichenden Typisierungsergebnisse auf den schlechten DNA-Erhalt bzw. den Degradierungszustand der Proben zurückzuführen sind. Eine Zusammenstellung der einzelnen Amplifikationen und des Gesamt-Genotyps befindet sich im Anhang (Kap. 13.4).

Abbildung 27 zeigt den heterogenen Amplifikationserfolg von Proben aus Tartu in der Heptaplex-Untersuchung. Tumor (T)- und Kontroll (K)-DNA von T430 und Kontroll-DNA von T432 zeigen ein unvollständiges Ergebnis, Kontroll-DNA von T432 keines und T434 und T443 ein vollständiges genetisches Profil.

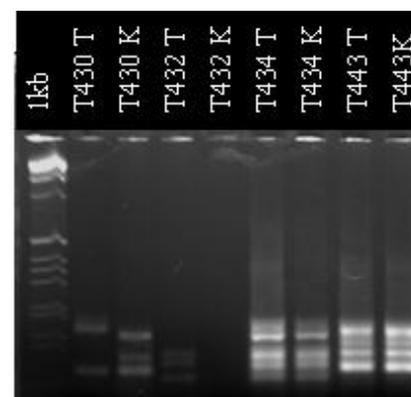


Abb. 27: STR-Analyse an Proben aus Tartu.

Ein Vergleich des gonosomalen Markers Amelogenin mit den bekannten Geschlechtern der Patienten ergab eine weitgehende Übereinstimmung, sofern der DNA-Erhalt eine Zuordnung zuließ. Lediglich die zwei Wiener Proben 11807 und 11808 wurden genetisch als männlich bestimmt, die Kennzeichnung der Proben wies jedoch weibliche Individuen aus (Tab. 3 und 40). Proben, deren Geschlecht nicht bekannt war, konnten auch genetisch nicht zugeordnet werden.

7.2.5 Messung des DNA-Gehalts

Im Verlauf der Arbeit wurde von einer Auswahl an Proben, die vollständige Ergebnisse bzw. einen Amplifikationsausfall zeigten, der DNA-Gehalt in verschiedenen Extrakten quantifiziert. Insgesamt wurde durch die PicoGreen[®]-Anwendung eine DNA-Konzentration zwischen 303ng/μl (415/1953) und 1.2ng/μl (15809) gemessen. Die Messungen zeigten außerdem, dass die getesteten Proben aus Wien bis auf die Ausnahme 18616 alle eine DNA-Konzentration im einstelligen Bereich vorwiesen, obwohl eine doppelte Gewebemenge in die Extraktion im Vergleich zu Berliner Proben eingesetzt worden war. Proben aus Berlin zeigten ebenfalls eine Abhängigkeit des DNA-Gehalts von der eingesetzten Gewebemenge. Für die Extraktion aus Paraffinschnitten wurden deutlich geringere Gewebemengen verwendet, so dass fast ein zehnfacher Unterschied entstand (2.8ng/μl aus Paraffinblock und 29ng/μl aus 30mg Gewebe bei Probe 33/1947).

Diese Ergebnisse sind ursächlich für den heterogenen Amplifikationserfolg, der in den unterschiedlichen Analysen offensichtlich wurde (Tab. 24).

7.3 Identifikation von *H. pylori*

Da positive Nachweise von *H. pylori* durch das 16S rRNA Gen in den historischen Magenkrebsproben möglich waren, wurden in weiterführenden Analysen weitere Genabschnitte untersucht. Dazu gehören die *cag* PAI und ein Abschnitt des 23S rRNA kodierenden Gens. Im Folgenden werden die Ergebnisse gemeinsam vorgestellt.

7.3.1 16S rRNA Gen, *cag* Pathogenitätsinsel und 23S rRNA Gen

Die DNA von Tumor- und Kontrollgewebe wurde jeweils separat analysiert. Um als positiver Nachweis aufgenommen zu werden, musste ein Ergebnis mindestens einmal reproduziert sein. Proben ohne positiven Karzinomnachweis und die Proben aus Wien, die in keiner Untersuchung

positive Nachweise generiert hatten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen, so dass von 27 Proben die genannten Genabschnitte untersucht wurden.

Die Tabellen 29 bis 31 zeigen eine Zusammenfassung der jeweiligen Untersuchungen aufgetrennt nach Gewebetypen für jeden Sammlungsstandort. In der letzten Spalte sind die Ergebnisse der Einzeluntersuchungen zusammengefasst. Die Resultate machen deutlich, dass durch die Kombination der Analysesysteme *H. pylori* in einer höheren Zahl von Proben identifiziert werden konnte.

Tab. 29: Ergebnisse der *H. pylori*-Untersuchungen bei Proben aus Berlin. Die Legende gilt für alle folgenden Tabellen: +: positiver Nachweis; -: kein Nachweis

| Berlin Probenbezeichnung | 16S rRNA Gen | | <i>cag</i> PAI | | 23S rRNA Gen | | Σ <i>H. pylori</i> |
|-----------------------------|--------------|-----------|----------------|-----------|--------------|-----------|---------------------------|
| | Tumor | Kontrolle | Tumor | Kontrolle | Tumor | Kontrolle | Tumor/Kontrolle |
| 33/1947 | + | - | - | - | - | - | +/- |
| 746/1951 | - | - | - | - | - | + | -/+ |
| 176/1952 | + | - | - | + | + | + | +/+ |
| 415/1953 | + | - | + | + | + | + | +/+ |
| 461/1953 | + | + | + | + | + | + | +/+ |
| 29/1955 | + | + | - | + | + | + | +/+ |
| 734/1955 | - | - | - | - | - | - | -/- |
| 1113/1955 | - | - | - | + | + | + | +/+ |
| 1160/1955 | + | + | - | - | + | + | +/+ |
| 949/1956 | + | + | - | + | + | + | +/+ |
| 777/1959 | - | + | - | - | + | + | +/+ |
| 722/1960 | + | + | - | + | + | + | +/+ |
| 741/1963 | + | + | - | - | + | + | +/+ |
| 1234/1964 | - | - | - | + | + | - | +/+ |
| 1294/1964 | - | - | - | - | - | - | -/- |
| Σ 15 | 9 | 7 | 2 | 8 | 11 | 11 | 12/12 |

Die eingesetzte Proben-DNA erreichte bei der Analyse des 16S-Genabschnitts durch die Real-Time PCR die Nachweisgrenze (rot) bei 36 bis 59 Zyklen. Ein früheres Erreichen der Nachweisgrenze konnte bei Extrakten beobachtet werden, die in einem geringeren Volumen eluiert worden waren (Kap. 6.5). Abbildung 28 zeigt am Beispiel der Probe 722/1960 eine Analyse mit 40 Zyklen. Da jede Probe duplex amplifiziert wurde, sind rechter Hand zwei Banden für die Kontroll-DNA zu sehen. Der obere Extrakt (722/1960 K u2) erreichte bei 36 Zyklen die Nachweisgrenze, der untere (722/1960 T t) bei 39. Beide Tumor-Extrakte blieben unterhalb der Nachweisgrenze (links).

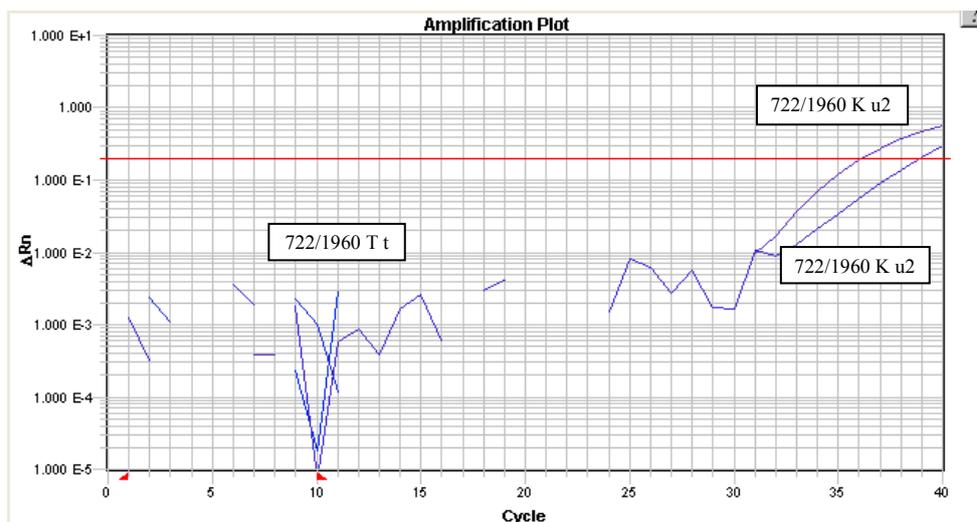


Abb. 28: Bildschirmkopie des *H. pylori*-Nachweises bei Probe 722/1960 mit der Software SDS 2.1 (Applied Biosystems). K: Kontroll-DNA; T: Tumor-DNA; t bzw. u2 geben die Extraktnummern an.

Keine Probe aus Tartu hatte ein positives Signal in der Real-Time PCR (Tab. 30), daher beschränkte sich der Nachweis von *H. pylori* auf die Ergebnisse der *cag* PAI und des 23S rRNA Gens. Die Ergebnisse für Proben aus Zürich sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tab. 30: Ergebnisse der Analysensysteme an Proben aus Tartu

| Tartu Probenbezeichnung | 16S rRNA Gen | | <i>cag</i> PAI | | 23S rRNA Gen | | Σ <i>H. pylori</i> Tumor/Kontrolle |
|----------------------------|--------------|-----------|----------------|-----------|--------------|-----------|--|
| | Tumor | Kontrolle | Tumor | Kontrolle | Tumor | Kontrolle | |
| 430 | - | - | - | - | - | - | -/- |
| 432 | - | - | - | - | - | - | -/- |
| 434 | - | - | + | + | + | - | +/+ |
| 443 | - | - | + | + | + | + | +/+ |
| 444 | - | - | - | + | - | + | -/+ |
| 449 | - | - | - | - | - | - | -/- |
| 455 | - | - | - | - | - | - | -/- |
| 456 | - | - | + | + | + | + | +/+ |
| 593 | - | - | - | - | - | - | -/- |
| Σ 9 | 0 | 0 | 3 | 4 | 3 | 3 | 3/4 |

Tab. 31: Ergebnisse der *H. pylori*-Analysen an Proben aus Zürich

| Zürich Probenbezeichnung | 16S rRNA Gen | | <i>cag</i> PAI | | 23S rRNA Gen | | Σ <i>H. pylori</i> Tumor/Kontrolle |
|-----------------------------|--------------|-----------|----------------|-----------|--------------|-----------|--|
| | Tumor | Kontrolle | Tumor | Kontrolle | Tumor | Kontrolle | |
| 774/1930 | + | + | + | - | + | + | +/+ |
| 1356/1935 | - | - | - | - | - | - | -/- |
| 8454/1951 | - | + | - | - | - | - | -/+ |
| Σ 3 | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1/2 |

Tabelle 32 fasst die Ergebnisse der *H. pylori*-Nachweise durch die Genabschnitte der 16S rRNA und 23S rRNA und der *cag* PAI zusammen. Die Ergebnisse zeigen, dass bei der Mehrheit der Proben entweder in beiden Gewebetypen oder in keinem das Magenbakterium nachgewiesen

werden konnte. Nur eine Probe war *H. pylori*-positiv im Tumor, jedoch negativ im Kontrollgewebe. Drei Proben waren hingegen im Tumor *H. pylori*-negativ, jedoch positiv im Kontrollgewebe.

Tab. 32: Zusammenfassende Darstellung der *H. pylori*-Analysen an Proben aus Berlin, Tartu und Zürich durch 16S rRNA Gen, *cag* PAI und 23S rRNA Gen

| vollständig positiv | Tumor positiv Kontrolle negativ | Tumor negativ Kontrolle positiv | vollständig negativ |
|---------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------|
| 15 | 1 | 3 | 8 |

Eine Einzelauswertung der drei Analysensysteme ergab, dass das 16S rRNA Gen zehn- (Tumor) bzw. neunmal (Kontrolle), die *cag* PAI sechs- (Tumor) bzw. zwölfmal (Kontrolle) und das 23S rRNA Gen 15- (Tumor) bzw. 15-mal (Kontrolle) detektiert werden konnte (Tab. 33). Nur die *cag*-Untersuchung weist eine deutliche Differenz der Nachweise zwischen Tumor- und Kontroll-DNA auf.

Tab. 33: Einzelergebnisse der Analysensysteme 16S rRNA, *cag* PAI und 23S rRNA

| 16S rRNA Gen Tumor/Kontrolle | <i>cag</i> PAI Tumor/Kontrolle | 23S rRNA Gen Tumor/Kontrolle |
|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| Σ 10/9 | Σ 6/12 | Σ 15/15 |

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass in 70,4% (19/27) der Magenkarzinompatienten *H. pylori*-Gene nachgewiesen werden konnten. Davon sind 44% (12/27) Träger der *cag* PAI.

23S rRNA Gen

Bei 17 von 27 Proben konnte das 115bp lange Fragment des 23S rRNA Gens amplifiziert und die Sequenzpositionen 2142 und 2143 untersucht werden. Alle Proben hatten Wildtypallele für diese zwei Positionen (Abb. 15 in Kap. 6.9.4).

Die Analyseergebnisse zeigen, dass bakterielle *H. pylori*-DNA verschiedener Genabschnitte in den histopathologischen Proben nachgewiesen werden konnte.

7.3.2 *H. pylori*-Infektion und histologischer Karzinomtyp

Die statistische Auswertung ergab, dass keine Assoziation zwischen einer *H. pylori*-Infektion und dem histologischen Magenkarzinomtyp nachgewiesen werden konnte ($p=0.84$). Die An- bzw. Abwesenheit von *H. pylori* wurde gegen den diffusen und intestinalen Typ, Mischformen zwischen diffusem und intestinalem Magenkarzinom und Plattenepithelkarzinomen mit dem

Fisher-Exact-Test getestet. Es wurde auf einem Signifikanzniveau von 5% getestet. Dazu wurde die frei zugängliche Internetseite der *SOCR Analyses* verwendet (siehe Kap. 7.4, Tab. 35).

7.4 p53-Mutationen und *H. pylori*-Infektion

Tabelle 34 zeigt die kombinierten Ergebnisse der p53- und *H. pylori*-Untersuchungen. Proben, die Mutationen im p53-Gen aufweisen, werden mit Namen aufgeführt. Insgesamt sind 73% (8/11) Proben mit p53-Mutation positiv für *H. pylori* und drei negativ getestet worden. Außerdem wurden in 63% (5/8) der Proben, die positiv auf *H. pylori* und die *cag* PAI getestet wurden, Mutationen in p53 identifiziert.

Elf Proben ohne Mutation wurden als *H. pylori*-positiv und fünf Proben als *H. pylori*-negativ identifiziert.

Tab. 34: Zusammenfassung der p53- und *H. pylori*-Analyseergebnisse

| Sammlung | Probe | p53-Mutation | <i>H. pylori</i> | <i>cag</i> PAI |
|----------|------------|----------------|------------------|----------------|
| Berlin | 746/1951 | L257V | + | - |
| | 461/1953 | R248W | + | + |
| | 1113/1955 | M246K | + | + |
| | 1160/1955 | G244V M246K | + | - |
| | 949/1956 | Q144X M246K | + | + |
| | 777/1959 | P152P M246K | + | - |
| | 722/1960 | K291E | + | + |
| | 1234/1964 | K291E | + | + |
| | 1294/1964 | E271K | - | - |
| | Tartu | Ta 430 | S166fs | - |
| Zürich | Z1356/1935 | R267R | - | - |

Um die Eingangshypothese, dass Patienten mit einer *H. pylori*-Infektion häufiger p53-Mutationen aufweisen, zu testen, wurde der Fisher-Exact-Test verwendet. Wie die nachstehende Tabelle verdeutlicht, wurden eine, zwei oder keine p53-Mutation gegen den Nachweis von *H. pylori* in den verschiedenen Gewebetypen getestet. „*H. pylori* Ja“ bedeutet, dass ein Nachweis in beiden Gewebetypen möglich war. „*H. pylori* nur Tumor“ bedeutet, dass die Bakterien nur im Tumorgewebe und nicht im Kontrollgewebe nachgewiesen werden konnten. Die Analyse ergab ein signifikantes Ergebnis von $p=0.019$. Es wurde wiederum auf einem Signifikanzniveau von 5% getestet.

Tab. 35: Eingabemaske auf www.socr.ucla.edu/htmls/ana/FishersExactTest_Analysis.html

| | <i>H. pylori</i> <i>Ja</i> | <i>H. pylori</i> nur Tumor | <i>H. pylori</i> nur Kontrolle | <i>H. pylori</i> Nein | Σ |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|----------|
| Mutation Ja 1 | 4 | 0 | 1 | 3 | 8 |
| Mutation Ja 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| Mutation Nein | 8 | 1 | 2 | 5 | 16 |
| Σ | 15 | 1 | 3 | 8 | 27 |

Dass Patienten, die mit *cag*-positiven *H. pylori*-Stämmen infiziert sind, häufiger p53-Mutationen bei Magenkarzinompatienten verursachen, konnte nicht bestätigt werden ($p=0.96$).

7.5 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Die Analyse organischer Bestandteile der historischen Konservierungsmittel erfolgte in einem ersten Schritt durch GC/MS. Die vorhandenen vierzehn Flüssigkeits- und drei Vergleichsproben wurden einzeln untersucht und die Messergebnisse mit einer Spektrenbibliothek (NIST) verglichen.

Abbildung 29 zeigt ein Chromatogramm, welches die Ergebnisse der GC/MS-Analyse für die untersuchte Probe aus Tartu abbildet. Die Höhe eines Peaks im Chromatogramm stellt ein Maß für die Menge der Komponenten (y-Achse in %) dar, während die Retentionszeit (x-Achse in min) substanzspezifisch ist. So wurde beispielsweise ein Signal nach 1.72min mit einer relativen Intensität (*relative abundance*) von 68% detektiert und im Vergleich mit der Massenspektrenbibliothek Formaldehyd zugeordnet. Bei Formaldehyd handelt es sich um das Gas der Formalinlösung.

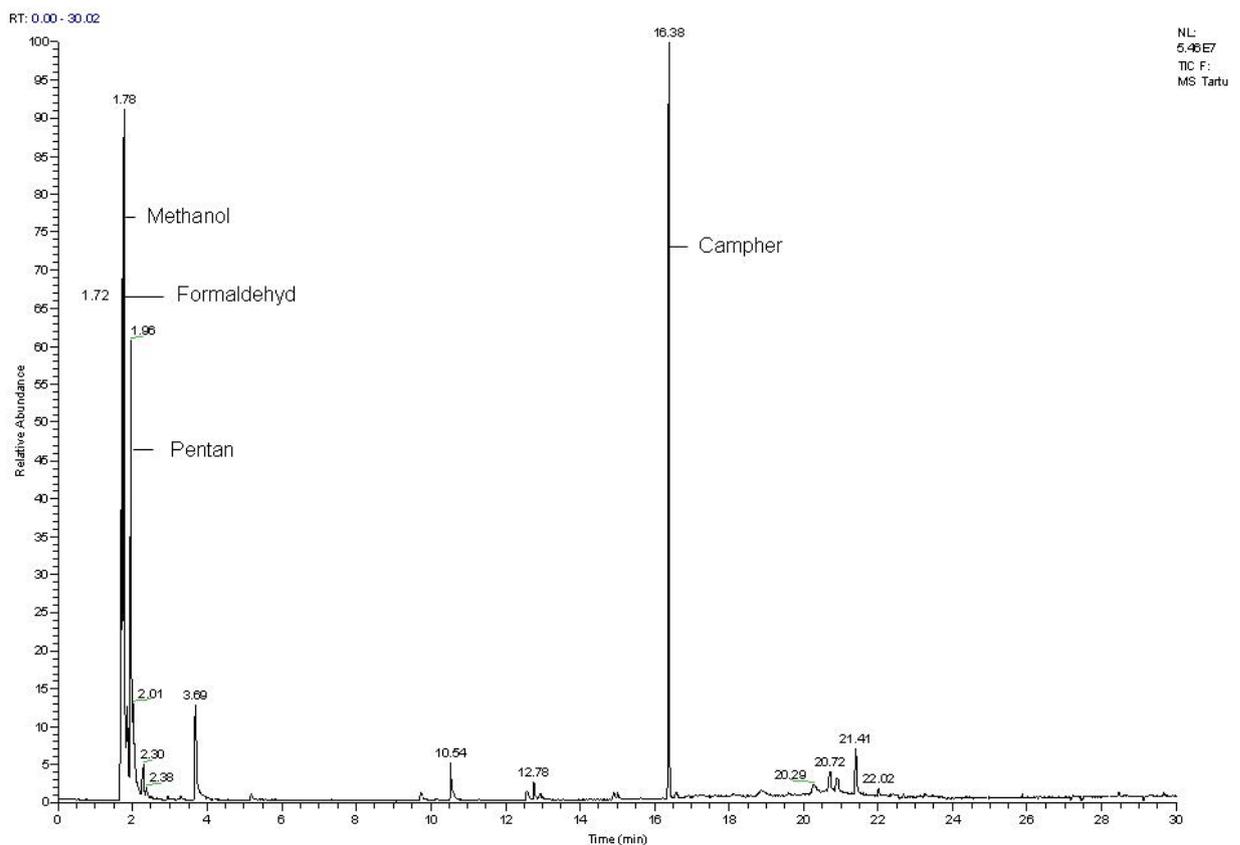


Abb. 29: Chromatogramm der GC/MS-Analyse für die Flüssigkeitsprobe aus Tartu.

Formaldehyd und Ethanol sind Hauptbestandteile der Konservierungsflüssigkeiten. Die Proben unterscheiden sich jedoch in der Ausprägung der Hauptkomponenten und in den zusätzlichen Beimischungen bzw. Reaktionsprodukten (Tab. 36). Dabei sind Unterschiede zwischen den

Sammlungen erkennbar. Die untersuchten Flüssigkeiten von Berliner Proben sind dadurch gekennzeichnet, dass ihre Hauptkomponente Ethanol ist und kein Formaldehyd nachzuweisen war. Probe 176/1952 enthält außerdem Ethylacetat, welches auch in einer der neun Proben aus Zürich enthalten ist. Insgesamt enthält nur die Hälfte der Proben Formaldehyd. Außerdem fällt auf, dass Formaldehyd und Ethanol nur bei Probe 15582 aus Wien gemeinsam nachgewiesen werden konnten.

Auffällig ist weiterhin, dass bei fast allen Proben Campher die bzw. eine der Hauptkomponenten ist. Ausnahmen bilden lediglich die Proben 176/1952 und 1234/1964 aus Berlin, bei denen kein Campher nachzuweisen ist.

Etwa die Hälfte der Flüssigkeiten enthält Methanol und/oder Essigsäure bzw. deren Derivate, die durch Zerfallsprozesse entstanden sind.

Ferner konnte in vier Proben, drei aus Zürich und eine aus Tartu, Pentan nachgewiesen werden.

Tab. 36: Tabellarische Auflistung der GC/MS-Ergebnisse für jede untersuchte Flüssigkeitsprobe. Die Wiener Proben wurden nur in Vortests untersucht, da es sich nicht um Magenkarzinome handelt

| | Probe | Formaldehyd | Ethanol | Methanol | Campher | Essigsäure / -Derivate | Pentan |
|---------------|--------------|-------------|---------|----------|---------|---------------------------|--------|
| Wien | 15582 | + | + | + | + | - | - |
| | 6295 | + | - | + | + | + | - |
| Zürich | 322-145/1906 | - | + | - | + | + | - |
| | 1094 | + | - | - | + | - | - |
| | 2 | - | + | - | + | + | - |
| | 774/1930 | - | - | - | + | + | + |
| | 1356/1935 | - | - | - | + | - | + |
| | 1 | + | - | + | + | - | - |
| | 8454/1951 | + | - | + | + | - | - |
| | 13901/1958 | + | - | + | + | + | + |
| Berlin | 176/1952 | - | + | - | - | + | - |
| | 949/1956 | - | + | - | + | - | - |
| | 1234/1964 | - | + | - | - | - | - |
| Tartu | Tartu | + | - | + | + | - | + |

Die direkte Analyse von Pikrinsäure in den Konservierungsmitteln mittels Elektrospray-Massenspektrometrie ergab keine positiven Nachweise.

8 Auswertung der Analyseergebnisse

8.1 Histologische Begutachtung

Die Kurzberichte der Autopsien beschränken sich in den meisten Fällen auf eine Beschreibung der mit bloßem Auge sichtbaren Strukturen und Formen (Tab. 1 bis 4). Die heutige mikroskopische bzw. histologische Untersuchung der Pathologen ermöglicht eine differenziertere diagnostische Aussage (Tab. 20-23). Bemerkenswert ist dennoch die hohe Genauigkeit der alten Beurteilungen.

Die Untersuchung zeigte, dass entgegen der pathologischen Beschreibung bei der Sektion nicht alle Proben Tumorgewebe enthielten. So sollte es sich bei Probe 322/1906 aus Zürich um ein „Carcinoma ventriculi“ handeln, jedoch konnte dieses auch durch Beprobung verschiedener Stellen nicht verifiziert werden. Stattdessen handelt es sich um eine Entzündung des Gewebes mit intestinaler Metaplasie, einer potentiellen Krebsvorstufe und Hyperplasie (siehe Glossar, Kap. 14). Insgesamt wurden vier Proben ohne Tumorzellen identifiziert.

Die Diskrepanz zur makroskopischen Beurteilung „Krebs“ kann verschiedene Ursachen haben. Möglicherweise lag ein chronisches Ulcus vor und einhergehend damit eine falsche historische Diagnose. Denkbar ist aber auch, dass die rezente Probenentnahme nicht repräsentativ für den „Tumor“ war.

Erwartungsgemäß waren viele der historischen Gewebe autolytisch verändert, so dass nicht bei jeder Probe eine eindeutige histologische Auswertung und genetische Typisierung möglich war. Die Zerstörung des Gewebes durch zelleigene Abbauprozesse beeinträchtigte besonders die Bearbeitung des Wiener Materials (Kap. 9.1).

8.2 Molekulargenetische Untersuchungen

8.2.1 Tumorsuppressorgen p53

In der vorliegenden Untersuchung konnten bei 52% der analysierbaren Proben Mutationen im p53-Gen identifiziert werden. Damit liegt die Mutationsrate der historischen Magenkarzinome für p53 über dem heutigen Durchschnitt von etwa 30%.

Insgesamt wurden zehn Mutationen identifiziert, bei denen es sich um *missense*-Ereignisse handelt. Bei zwei Mutationen handelt es sich um *silent*- und bei jeweils einer um *nonsense*- bzw.

frame-shift-Mutationen. In der Literatur sind für Magenkarzinome 84% *missense*- und 7% bzw. 9% *nonsense*- und *frame-shift*-Mutationen beschrieben (Hjortsberg et al. 2008). Diese Verteilung konnte in ähnlicher Weise (71%, 7% bzw. 7%) auch in den alten Proben bestätigt werden. Das häufigere Auftreten von *missense*-Mutationen wird damit erklärt, dass diese Art der Veränderungen das p53-Protein stabilisiert, was für den Tumor Vorteile bedeutet (Soussi & Bérout 2001).

Die Auswertung der Sequenzen zeigte, dass sowohl hetero- als auch homozygote Ausprägungen der Mutationen möglich sind. Für homozygote Realisierungen sind zwei Ursachen denkbar. Erstens, dass tatsächlich beide Allele durch Mutationen verändert sind und zweitens, der wahrscheinlichere Fall in Tumoren, dass es zu einem Verlust der Heterozygotie kam und nur ein Allel mit Mutation vorhanden ist. Da es sich bei der Mehrheit der Ereignisse um heterozygote Realisierungen handelt, wurden in dieser Arbeit keine Heterozygotieverluste untersucht.

Zwei Mutationen (P152P und R248W) befinden sich an CpG-Inseln, das entspricht 14%. In der Literatur wird bei Magenkarzinomen von 14 bis 75% Mutationen an CpG-Inseln berichtet (Renault et al. 1993, Hongyo et al. 1995). Es kann nur spekuliert werden, ob diese Mutationen durch die höhere Mutationswahrscheinlichkeit an CpG-Inseln, äußere Einflüsse oder spontane Mutationen verursacht worden sind. Denkbar ist auch eine Kombination der Faktoren.

Das *Codon Usage* spielt eine Rolle in der Proteinbiosynthese. Selten verwendete Codons können die Translationsgeschwindigkeit reduzieren, während häufig genutzte sie beschleunigen. Die Berechnung ist nur bei Punktmutationen, die Auswirkungen auf Aminosäuren haben, sinnvoll. Bei der Entstehung eines Stoppcodons oder einer *frame-shift*-Mutation sind die Auswirkungen für die Proteinsynthese so tiefgreifend, dass eine Geschwindigkeitsberechnung überflüssig wird. Eine verlangsamte Translation gegenüber dem Wildtyp ist durch die Mutationen G244V, L257V, E271K und R267R zu erwarten. Kaum Veränderungen zeigt die Mutation R248W. Eine Zunahme der Translationsbeschleunigung ist bei P152P, M246K und K291E zu erwarten.

Um den Einfluss der Mutationen auf ihre Funktionalität im p53-Netzwerk einschätzen zu können, wurden die Transaktivierungskapazitäten in verschiedenen Promotoren untersucht (Kato et al. 2003). Man nimmt an, dass das Optimum durch den Wildtypzustand der Gene zur Verfügung gestellt wird und jede Abweichung Auswirkungen auf die nachfolgenden Prozesse hat (Levine et al. 1991, Thor et al. 1992).

Es zeigt sich, dass viele Transaktivierungskapazitäten durch die Mutationen verändert werden. Vier Ereignisse werden als nicht funktional eingestuft (Tab. 27). Das bedeutet, dass in Folge der

Mutationen G244V, M246K, R248W und L257V die untersuchten Promotoren keine Aktivität aufwiesen und daher das Zielgen nicht abgelesen werden konnte. Für die Abläufe in der Zelle bedeutet das, dass auf die Information einer Schädigung nicht reagiert werden konnte und sich Fehler manifestieren konnten, die langfristig ausschlaggebend für die Karzinogenese waren.

Die Mutation E271K hinterlässt eine teilweise Funktionalität, so dass die Promotoren nicht vollständig aktiviert werden können. Zusätzlich zum veränderten Aktivierungspotential hat diese *missense*-Mutation einen Einfluss auf die Proteinstabilität, da sie sich in Exon 8 am 3'-Ende einer *splice site* befindet. Durch die Mutation entsteht statt GA an Position 14480 AA, so dass die Erkennungssequenz für das Spleißen verändert wurde und die Spaltung des Strangs nicht vorgenommen werden kann (Tariverdian & Buselmaier 2004). Folgen können sein, dass nicht das ganze Exon in die reife RNA übernommen werden kann oder Exonsequenzen ausgeschlossen werden. Diese Mutation hatte daher trotz verbleibender Funktionalität einen gravierenden Einfluss auf die Entstehung der mRNA.

Die Mutation K291E erhält die Funktionalität des Wildtyp-Proteins. Bei einigen Promotoren kommt es sogar zu einer Zunahme der Transaktivierungskapazitäten bis zu 290% (Tab. 27). Diese Zunahme der Funktionsfähigkeit (*gain-of-function*) stellt ein Charakteristikum der Tumorgenese dar, indem es den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den Wildtypzellen verschafft.

Die Mutation R248W ist ein bekannter *Hotspot* bei rezentem Tumormaterial. Es handelt sich um eine DNA-Kontaktmutation, d.h. die DNA-Bindeeigenschaft von p53 wird verändert, die Konformation des Proteins bleibt aber weitgehend erhalten (Sigal & Rotter 2000). Es wurde festgestellt, dass es keine p53-abhängige Expression des p21-Proteins mehr gab, woraus auf einen Verlust der Transaktivierungsfähigkeit des Wildtyp-Proteins geschlossen wurde. Weitere Analysen am mRNA-Level anderer p53-Targetgene stellten die reduzierte Genexpression ebenfalls fest (Song et al. 2007). Zusammen mit den Mutationen R273H und R175H trägt R248W heute zu 15% aller p53-Mutationen bei (Liu et al. 2010).

Die Untersuchung von R248W zeigte weiterhin, dass die p53-abhängige Tumorsuppressoraktivität nicht nur verloren ging, sondern onkogene Aktivitäten hinzukamen (Song et al. 2007). Das Tumorspektrum von R248W-Mutanten überstieg sogar das von p53^{-/-} *knock-out*-Mäusen.

Die Mutation R248W in Probe 461/1953 stellt damit ein gravierendes Ereignis für die p53-Funktion in den Tumorzellen dar.

Bei zwei Mutationen handelt es sich um *silent*-Mutationen. Ein direkter Wachstumsvorteil dieser Tumorzellen gegenüber Wildtypzellen ist in diesen Fällen unwahrscheinlich und keine dieser

Mutationen befindet sich an einer *splice site*. In der Funktionalitätsanalyse von Kato et al. (2003) fielen etwa 16% der Mutationen auf, die bereits mindestens einmal in Tumoren identifiziert worden waren, obwohl sie ihre Wildtyp-Aktivität behalten hatten. Dafür gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Die wahrscheinlichste ist, dass die Mutationen funktionell keine Auswirkungen haben und nur zufällig während der klonalen Selektion der Tumorzellen vermehrt worden sind. Es würde sich bei diesen Mutationen daher um *passenger mutations* handeln. Das könnte bedeuten, dass z.T. mehrere Mutationen notwendig sind, um die Transaktivität von p53 zu inaktivieren, da die meisten Mutationen nur eine geringe Reduktion der p53-Transaktivität zur Folge haben (Ashcroft et al. 1999). Als zweite Möglichkeit könnte eine geringe Tumorsuppressionswirkung, die unabhängig von der Transaktivität ist, zurückbleiben und durch *silent*-Mutanten unterbrochen werden. Drittens könnte es *downstream* Gene geben, die bisher nicht untersucht worden sind und die nicht durch die Mutanten transaktiviert werden können (Kato et al. 2003).

Die beiden Datenbanken *IARC TP53 Database* und *TP53 Web Site*, mit denen die identifizierten Mutationen verglichen wurden, generieren nicht bei allen Eingaben identische Ergebnisse. So werden die zwei *silent*-Mutationen von *IARC TP53 Database* als Polymorphismen beschrieben. Da beide Veränderungen jedoch nur in Tumor-DNA vorkommen, wurden sie in der Auswertung als Mutationen behandelt, auch wenn die Basenveränderung wahrscheinlich keine veränderten (Trans-) Aktivitäten zur Folge hatten. Des Weiteren fällt auf, dass die Angaben zur Aktivitätsänderung durch die Mutation E271K voneinander abweichen, obwohl dieselbe Studie von Kato et al. (2003) als Grundlage für die Angaben diente. Einer verbleibenden teilweisen Funktionalität laut der *IARC TP53 Database* steht ein Funktionsverlust laut der *TP53 Web Site* gegenüber. Geringe Abweichungen werden außerdem für die Häufigkeiten der Mutationsereignisse angegeben, die sich jedoch mit unterschiedlichen Kriterien zur Aufnahme von Ergebnissen in die Datenbanken erklären lassen.

Der Substitutionsvergleich zwischen den generierten Daten zeigt Unterschiede bei der Häufigkeit von G:C zu A:T-Transitionen und A:T zu T:A-Transversionen (Abb. 26).

G:C zu A:T-Transitionen wurden bei fünf Mutationen (Q144X, P152P, R248W, R267R und E271K) identifiziert. Diese Veränderungen können durch Stickoxide induziert werden, die z.B. während einer Infektion mit *H. pylori* produziert werden (Wink et al. 1991, Nguyen et al. 1992). Beide Proben, in denen C zu T-Mutationen detektiert wurden, waren nachweislich mit dem Magenbakterium infiziert (Tab. 25). Für die Mutation R248W konnte *in vitro* gezeigt werden, dass diese durch reaktive Sauerstoffspezies und Stickoxid-freisetzende Komponenten hervorgerufen

werden kann (Souici et al. 2000). Dass *H. pylori* diese Mutation bei Probe 461/1953 hervorgerufen hat, ist daher wahrscheinlich.

Von den drei Proben mit G zu A-Mutationen war hingegen nur eine positiv für *H. pylori*. Wie die beiden *H. pylori*-negativen Proben zeigen, müssen andere Einflüsse jedoch ebenso in Betracht gezogen werden. G:C zu A:T-Transitionen gehören außerdem zu häufigen Veränderungen, die durch Komponenten des Zigarettenrauchs (Strauss 1991, Lea et al. 2007) oder durch N-nitroso Komponenten aus der Nahrung induziert werden (Sugimura et al. 1971). Eine epidemiologische Untersuchung von Ernährungsgewohnheiten um Florenz bestätigte ebenfalls den Zusammenhang zwischen Magenkrebsrisiko und einer erhöhten Nitrit- und Proteinaufnahme (Buiatti et al. 1990). Beides konnte durch den Beitrag von N-nitroso-Karzinogenen zur intragastralen Bildung erklärt werden (Correa 1992).

A:T zu T:A-Transversionen sind heute seltene Ereignisse, sie machen nur 5% der Mutationen aller Krebserkrankungen aus (Petitjean et al. 2007) und wurden bisher am häufigsten bei Kehlkopfkrebs und in Lungenepithelzellen von Mäusen beschrieben. Dieser Mutationstyp wurde jedoch an Codon 246 bei vier verschiedenen historischen Proben identifiziert, das entspricht 29% der Mutationen. Ein Zusammenhang der Veränderungen mit Bestandteilen aus dem Zigarettenrauch wie polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (Zhang et al. 1994) ist unwahrscheinlich, da diese üblicherweise G:C zu A:T-Transitionen bewirken (Strauss 1991). Es wird diskutiert, ob Industrieruß durch reaktive Sauerstoffformen einen oxidativen Schaden an der DNA hervorruft und so diese Veränderung begünstigt (Jacobsen et al. 2010). Ein weiterer potentieller exogener Einfluss ist Vinyl, welches in der Plastikindustrie verwendet wird, um PVC herzustellen (Creech Jr & Johnson 1974). Die aufgeführten Beispiele verdeutlichen, dass exogene Einflussfaktoren für A:T zu T:A-Transversionen am wahrscheinlichsten sind.

Die Frequenz der weiteren detektierten Transitionen, Transversionen und *frame-shift*-Mutationen von früher und heute sind vergleichbar.

Neben den genannten potentiellen exogenen Einflussfaktoren, welche die Mutationen hervorgerufen haben können, müssen spontane Mutationen ebenfalls in Betracht gezogen werden.

8.2.2 Häufigkeit der identifizierten Mutationen im Vergleich zu rezenten Daten

Die Ergebnisse zeigen eine Kombination aus heute sehr häufigen Mutationen in Form des *Hotspots* 248, drei häufigen und fünf seltenen Mutationsereignissen. Die folgende Tabelle (Tab. 37) vergleicht die Häufigkeiten der detektierten Mutationen mit Daten aus der Literatur. Spalte

zwei gibt die Frequenzen der Mutationen in absoluten Zahlen für alle Tumorarten an, Spalte drei die Frequenzen von Magenkrebs. Als letztes werden die Häufigkeiten für die in dieser Arbeit an historischem Gewebe generierten Daten wiedergegeben.

Tab. 37: Frequenzvergleich der Mutationen in absoluten Zahlen

| Mutation | Literatur | | alte Proben |
|------------|-----------|------------|-------------|
| | gesamt | Magenkrebs | |
| Q144X | 57 | 1 | 1 |
| P152P | 15 | 2 | 1 |
| S166fsX180 | - | - | 1 |
| G244V | 25 | 2 | 1 |
| M246K | 12 | - | 4 |
| R248W | 803 | 29 | 1 |
| L257V | 7 | - | 1 |
| R267R | 6 | - | 1 |
| E271K | 45 | - | 1 |
| K291E | 2 | - | 2 |

Da das Mutationsereignis M246K in dieser Arbeit bei vier verschiedenen Proben detektiert wurde (Tab 37), kann die Mutation als *Hotspot* der historischen Proben bezeichnet werden. Diese Art der Veränderung ist laut der *TP53 Web Site* für Magenkarzinome bisher nicht beschrieben, jedoch insgesamt zwölfmal u.a. für Gliome (Jafri et al. 2003, Yusoff et al. 2004), Astrozytome (Hunter et al. 1993), Lungenkrebs (Takeshima et al. 1993, Husgafvel-Pursiainen et al. 2000) und Burkitt's Lymphome (Wilda et al. 2004). Die zweithäufigste Mutation in dieser Arbeit, die ebenfalls nicht von rezenten Magenkrebspatienten bekannt ist, ist mit zwei Detektionen K291E. In der Literatur ist diese Mutation bei Lungenkrebs (de Anta et al. 1997) und Cholangiokarzinomen (Kamikawa et al. 1999) beschrieben. Alle anderen Mutationen wurden jeweils einmal identifiziert, unterscheiden sich jedoch in ihren allgemeinen Frequenzen und ihren Häufigkeiten bei Magenkrebs. Auffällig ist, dass die rezente *Hotspot*-Mutation R248W, welche die zweithäufigste Veränderung bei Magenkarzinomen darstellt (Fenoglio-Preiser et al. 2003), nur einmal detektiert wurde. Die weiteren rezenten *Hotspot*-Codons 175, 273, 282, 245 und 213 waren in dieser Untersuchung nicht von Veränderungen betroffen.

8.2.3 Autosomale STRs und Amelogenin

Die Authentizität und Individualität jeder Probe wurde dadurch gewährleistet, dass jede Probe zu Beginn und zum Abschluss der Untersuchungen durch genetische Fingerabdrücke typisiert wurde. Die zweite Analyse zeigte keine Abweichungen zum ursprünglichen Ergebnis, so dass Kontaminationen im Bearbeitungszeitraum ausgeschlossen werden können. So konnten für fast

die Hälfte der Proben vollständige genetische Typisierungen durchgeführt und die Proben damit individualisiert werden.

Diskrepanzen zwischen dem bekannten Geschlecht und den Analyseergebnissen des gonosomalen Markers Amelogenin wurden bei zwei Wiener Proben festgestellt. Einerseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine falsche Beschriftung der Probengefäße nach der Präparation handelt, andererseits kann eine Kontamination während der Probennahme durch den Präparator nicht ausgeschlossen werden. Das Risiko einer Kontamination mit moderner DNA wurde durch Abtragen der Oberfläche der Gewebeprobe vor der Extraktion reduziert. Gegen eine Kontamination spricht, dass die Ergebnisse der einzelnen Loci nicht in jedem Fall reproduzierbar waren. Da beide Proben jedoch keine ausreichende DNA-Erhaltung aufwiesen, um vollständige Fragmente bei der Analyse des Tumorsuppressorgens zu amplifizieren, können durch den potentiellen Eintrag fremder DNA keine Endergebnisse verfälscht worden sein.

8.2.4 Messung des DNA-Gehalts

Die Messergebnisse der quantitativen DNA-Bestimmung stimmten mit den Erwartungen nach verschiedenen Test-PCRs überein. Proben mit vollständigen Amplifikationsergebnissen wiesen zwei- bis dreistellige DNA-Konzentrationen in ng/µl auf. Außerdem bestätigten die Ergebnisse, dass in jeder Probe trotz ähnlicher Lagerung unterschiedliche DNA-Mengen verfügbar waren. Diese Differenzen sind wahrscheinlich auf die unterschiedliche Probenbehandlung zurückzuführen.

Auffällig war die Tatsache, dass bei Wiederholung der Messung zu einem späteren Zeitpunkt aus demselben Extrakt beim zweiten Mal bis zu 60ng/µl geringere Werte ermittelt wurden. Auch dieses Ergebnis entspricht empirischen Erfahrungen, dass der DNA-Extrakt direkt nach der Extraktion einen höheren Amplifikationserfolg erzielt als nach mehrmaligem Auftauen und Einfrieren.

8.2.5 Lebensalter des Patienten, Mutationsstatus und histologischer Typ

In der Literatur wird von Unterschieden im Alter der Magenkrebspatienten bezüglich des histologischen Karzinomtyps berichtet. Bei den unter 60jährigen werden nur diffuse Typen diagnostiziert, bei Älteren ist das intestinale Magenkarzinom hingegen die häufigste Erkrankung. Eine Erklärung des altersabhängigen Phänomens ist der Rückgang der chronischen Gastritis, welche mit dem Rückgang der *H. pylori*-Gastritis in Verbindung gebracht wird (Laurén & Nevalainen 1993). Eine weitere Erklärung der Reduktion der intestinalen Erkrankungen sind Veränderungen

in Umwelt und Ernährung, die einen Einfluss auf die Karzinomentstehung haben (Kap. 1.2.2, Kountouras et al. 2005).

Das Individualalter der Patienten des verwendeten Gewebes ist in vielen Fällen bekannt. Eine statistische Auswertung in Bezug auf die histologische Diagnose ist aufgrund der geringen Stichprobenzahl und der eingangs genannten Kriterien zur Probenauswahl nicht sinnvoll. Dennoch ist erkennbar, dass die Mischform von intestinalen und diffusen Adenokarzinomen eher bei Menschen jüngeren Alters aufgetreten ist. Das Durchschnittsalter betrug hier 51 Jahre, bei histologisch reinen intestinalen bzw. diffusen Formen betrug das Alter 69 Jahre.

Maesawa und Kollegen (1995) berichten von 0-21% p53-Mutationen in diffusem und 36-43% in intestinalem Magenkrebs. Eine ähnliche prozentuale Verteilung zeigten die historischen Proben mit 18% Mutationen in diffusem und 43% in intestinalem Magenkrebs. Ein statistisch abgesicherter Zusammenhang zwischen einer p53-Mutation und dem histologischen Typ der Magenkarzinome konnte durch die Analyse der historischen Proben jedoch nicht festgestellt werden. Möglicherweise liegt die Ursache in der geringen Stichprobengröße, die für die Auswertung zur Verfügung stand.

8.3 Identifikation von *H. pylori*

In historischem Knochenmaterial konnten bereits erfolgreich Krankheitserreger für Lepra (Rafi et al. 1994) und Tuberkulose (Dixon & Roberts 2001, Zink et al. 2005) nachgewiesen werden. Ebenso war ein Nachweis von *H. pylori* in 3000 Jahre alten mexikanischen Mumien möglich (Castillo-Rojas et al. 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *H. pylori* auch in historisch fixiertem Feuchtgewebe nachgewiesen werden kann.

Proben, aus denen in vorhergehenden Untersuchungen durch autosomale STRs und p53 keine Ergebnisse generiert werden konnten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Es hätte zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen können, wenn Proben als *H. pylori*-negativ deklariert würden, der DNA-Erhalt von vornherein jedoch keine erfolgreiche Amplifikation zuließe.

Eine Kombination der Ergebnisse aller untersuchten Marker ist möglich, obwohl nur die 16S- und 23S rRNA-kodierenden Gene in allen *H. pylori*-Stämmen konserviert sind. Aus der positiven Amplifikation der *cag* PAI kann somit auf das Vorhandensein der beiden anderen Gene geschlossen werden.

Die Zusammenfassung der Analysen an den Genen der 16S rRNA und 23S rRNA sowie der *cag* PAI stellt die Ergebnisse in vier Kategorien dar. Das Magengewebe war entweder *H. pylori*-po-

sitiv bzw. -negativ oder die Bakterien konnten nur in Tumor- bzw. Kontrollgewebe nachgewiesen werden. Grundsätzlich ist es allerdings unwahrscheinlich, dass nur ein Gewebetyp infiziert ist, man kann daher davon ausgehen, dass die vier Proben mit einem Nachweis in nur einem Gewebe den positiven zugeordnet werden können. Die fehlgeschlagene Identifikation kann im Falle der drei Tumor-negativ/Kontrolle-positiven Proben z.B. damit erklärt werden, dass die Bedingungen des Tumorgewebes nicht dem optimalen Milieu für *H. pylori* entsprachen und die Erreger sich in das gesunde Gewebe zurückgezogen haben. Damit reduzieren sich die Kategorien auf *H. pylori*-positiv und -negativ mit 19 respektive 8 Proben. Insgesamt konnten daher in 70% der Magenproben *H. pylori* nachgewiesen werden.

Die ermittelte Anzahl der *H. pylori*-positiven bzw. -negativen Proben stellt ähnlich wie die p53-Mutationen nur einen Richtwert dar. Erstens ist *H. pylori* im Magen nicht gleichmäßig verteilt (Scholte et al. 2001), daher könnten bakterienfreie Stellen des Magens beprobt worden sein. Zweitens kann von einer geringeren Menge Bakterien-DNA im Vergleich zur endogenen humanen DNA ausgegangen werden. Die erfolgreiche Amplifikation der menschlichen DNA ist daher nur ein Indikator für eine mögliche Erhaltung der bakteriellen DNA, aber kein Beweis. Drittens bleibt die Möglichkeit, dass *H. pylori* die Mägen der Patienten infiziert hatte, während des Fixierungsprozesses jedoch aus dem Gewebe in die Fixierflüssigkeit gespült wurde. Sofern die Fixierflüssigkeit in einem späteren Schritt durch Konservierungsflüssigkeit ersetzt wurde, wäre auch kein Nachweis in den Flüssigkeitsproben möglich. Das Verbleiben einzelner Bakterien im Magengewebe würde in der Analyse unterhalb der Nachweisgrenze bleiben.

Der Vergleich zwischen Infektionsraten aus historischen Proben und den rezenten Bevölkerungen zeigt, dass sich die ermittelte Prävalenz gut zwischen den aktuell 25% der Industrieländer, 39% Deutschland und 80% der Entwicklungsländer einordnen lässt (Parsonnet 1995, Pounder & Ng 1995, Breuer et al. 1996). Ferner muss beachtet werden, dass die ermittelte Infektionsrate von 70% eine Bevölkerungsgruppe mit Magenkarzinomen widerspiegelt, daher eine geringere Infektionsrate bei der gesunden Bevölkerung anzunehmen ist. Obgleich sich das Resultat nicht auf einen repräsentativen Bevölkerungsausschnitt bezieht, ist eine Infektionsrate von zwei Dritteln der europäischen Bevölkerung vor 60 Jahren wahrscheinlich.

Die Infektionsrate *cag*-positiver *H. pylori*-Stämme beträgt in den Industrieländern heute zwischen 20 und 60% (Konturek et al. 2009, Yamaoka 2009). Der positive Nachweis in 44% der aDNA-Proben fällt auch hier in diesen Bereich. Patienten, die mit *cag*-positiven *H. pylori*-Stämmen, infiziert waren, hatten ein erhöhtes Risiko für die Karzinomentstehung.

Alle erfolgreich untersuchten Proben hatten Wildtypallele auf dem untersuchten 23S rRNA-Genabschnitt und zeigten daher keine resistenztypischen Mutationen gegen das Antibiotikum Clarithromycin. Die publizierten Daten für Resistenzen gegenüber Clarithromycin in der heutigen europäischen Bevölkerung liegen zwischen 0 bis 21% (Glupeczynski et al. 2001, Kalach et al. 2001b). Seit der Markteinführung zum Beginn der 1990er Jahre wurden steigende Resistenzen bei *H. pylori* beobachtet. In Estland stieg bereits ein Jahr nach Einführung von Clarithromycin die Resistenz bei *H. pylori* rapide an (Lõivukene et al. 2002).

Obgleich die Mutationen A2115G, G2141A und T2717C aufgrund ihrer geringen Frequenz (Hultén et al. 1997, Fontana et al. 2002) nicht untersucht wurden, deuten die Ergebnisse auf eine fehlende Resistenz vor 60 Jahren hin.

8.3.1 *H. pylori*-Infektion und histologischer Karzinomtyp

Ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von *H. pylori* im Gewebe und dem histologischen Karzinomtyp konnte nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit Nomura et al. (1991) überein, widerspricht jedoch dem von Parsonnet et al. (1991).

H. pylori soll nicht bei einer intestinalen Metaplasie des Wirts vorkommen, da diese eine Veränderung im Magenschleim hervorrufe, deren ungünstige physikochemischen Eigenschaften kein Lebensmilieu für die Bakterien darstellen. Dazu gehört ein deutlich saurer Magensaft (Hunt 1996). Das histologische Gutachten bestimmte für zwei Proben eine intestinale Metaplasie. Bei Probe 456 aus Tartu wurde *H. pylori* durch die Anwesenheit der *cag* PAI und des 23S rRNA kodierenden Gens nachgewiesen (Tab. 30). Es ist aber möglich, dass die Bakterien sich aus dem Bereich der akuten Metaplasie in angrenzendes Gewebe zurückgezogen hatten und ein Nachweis in solchem stattfand. In Probe 322/1906 aus Zürich wurde ebenfalls eine intestinale Metaplasie identifiziert, aufgrund der schlechten DNA-Erhaltung ist allerdings keine Aussage über den *H. pylori*-Status möglich.

Eine Giemsa-Färbung der Proben aus Tartu konnte in vier Fällen Bakterien nachweisen, drei dieser vier sind auch molekulargenetisch positiv für *H. pylori* (Tab. 34). Eine genauere Spezifizierung der Bakterien aufgrund der Färbungsnachweise ist jedoch nicht möglich, so dass es sich auch um einen *E. coli*-Nachweis handeln könnte. Dagegen spricht für diese Proben jedoch, dass vollständige Typisierungsergebnisse ermittelt werden konnten und eine längere unfixierte Lagerung, die zu fortgeschrittenen autolytischen Prozessen und zur Besiedlung mit Bakterien hätte führen können, unwahrscheinlich ist.

Durch die Arbeitsgruppe um Blaser (1995) konnte gezeigt werden, dass *cag*-positive *H. pylori*-Stämme mit intestinalem Magenkrebs assoziiert sind. In dieser Arbeit konnte jedoch kein Zusammenhang festgestellt werden, da je drei *cag*-positive Proben intestinal und drei diffus waren (Tab. 20).

8.4 Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Die Untersuchung der Konservierungsmittel bestätigt die Erwartung, dass Formaldehyd und Ethanol Bestandteile der Aufbewahrungsflüssigkeiten sind. Insgesamt enthalten sechs Proben u.a. Formaldehyd als funktionelles Reagenz, fünf Ethanol, eine sowohl Formaldehyd als auch Ethanol und zwei Proben keines von beiden. Bei nur einer Probe (1234/1964) wurde ausschließlich Ethanol identifiziert, bei allen anderen handelt es sich um Gemische. Das bestätigt, dass häufig verschiedene Chemikalien kombiniert wurden (Kap. 5.2), um die Vorteile der Reagenzien zu maximieren und die Nachteile zu minimieren.

Die Analyse ergab, dass in einigen Fällen zwei verschiedene Alkohole in den Flüssigkeiten nachzuweisen waren (Tab. 36). Es ist anzunehmen, dass Ethanol intentioniert als Lösungsmittel zu den Geweben gegeben wurde (Kap. 5.2). Die Verwendung von Methanol zur Konservierung ist nicht bekannt. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass es sich um ein Nebenprodukt handelt, da Methanol bis auf eine Ausnahme (1094 aus Zürich) nur im Zusammenhang mit Formaldehyd nachgewiesen werden konnte.

Campher scheint ein gängiger und überregionaler Bestandteil von Konservierungsflüssigkeiten gewesen zu sein, da es in Proben aller vier Sammlungsstandorte nachzuweisen ist. Außerdem wurde es über einen längeren Zeitraum -in Zürich über mindestens fünf Jahrzehnte- für die Aufbereitung von Präparaten verwendet.

Campher soll mit seiner antibakteriellen Wirkung auch der Schimmelbildung vorbeugen (Romeis 1989) und wurde daher für die Desinfektion verwendet. Im Museum of Human Disease in Sydney wurde Campher als Teil der Aufbewahrungsflüssigkeit noch bis vor zehn Jahren verwendet (pers. Mitteilung A. Mitchell). Dabei besteht kein Zusammenhang zwischen Campher und dem Ausbleiben eines Nachweises von *H. pylori*.

Ethylacetat und Acetaldehyd können entweder im Konservierungsprozess selbst zugesetzt worden sein oder sind Reaktionsprodukte von Essigsäure. Letzteres ist wahrscheinlicher, da Essigsäure- und deren Derivate der Gewebeschrumpfung im Fixierprozess entgegen wirken sollen (Romeis 1989), während die Zugabe von Ethylacetat und Acetaldehyd in die Fixierlösung nicht beschrieben wird.

Vier Proben enthalten Pentan. Pentan ist ein unreaktiver Stoff, so dass keine Funktion im Konservierungsgemisch anzunehmen ist. Es besteht die Möglichkeit, dass Pentan Fette aus der Probe löst, allerdings wäre hierfür eine hohe Konzentration notwendig. Eine weitere mögliche Ursache für den Nachweis von Pentan ist, dass Formaldehyd oder Ethanol durch Pentan verunreinigt waren, bevor sie zu dem Gewebe gegeben worden sind (pers. Mitteilung M. Gille).

In vielen Proben sind außerdem Formaldehydderivate nachweisbar, die durch Zerfallsprozesse bzw. Reaktionen von Formaldehyd entstanden sind.

Pikrinsäure konnte als Konservierungsmittel der historischen Gewebeproben nicht nachgewiesen werden. Eine ursprüngliche Verwendung als Fixier- und Konservierungsmittel kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, wenn im Zusammenhang mit Sammlungspflege Flüssigkeiten nach aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen ausgetauscht wurden. In einigen Fällen ist dieses allerdings unwahrscheinlich, da die Aufbewahrungsbehälter, die Verschlusstechnik und die Etikette der Präparate zum Teil original aus den jeweiligen Jahren stammen (pers. Mitteilung N. Widulin).

Eine weitere Möglichkeit ist der Zerfall von Pikrinsäure während der langen Lagerung. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es nicht zu den ursprünglichen Komponenten der Konservierungsmittel gehörte.

9 Diskussion der Methodik

9.1 Erhaltungszustand der DNA

Der Erhaltungszustand der DNA in den Karzinomgeweben unterschied sich sowohl innerhalb als auch zwischen den Sammlungen. Insgesamt konnten an 45% der Proben erfolgreiche Untersuchungen durchgeführt werden. Auffällig ist, dass keine der Gewebeproben aus Wien reproduzierbare Ergebnisse erbrachte.

Für Probenkonservierung sind Temperatur und Zeit die wichtigsten Faktoren. So wird zum einen als Schutz vor Autolyse eine Temperatur von 0 bis 4°C während der Fixierung empfohlen (Adam & Czihak 1964). Zum anderen ist das Zeitintervall zwischen Tod und Autopsie bzw. Probennahme aufgrund der einsetzenden autolytischen Prozesse ebenfalls ein kritischer Faktor. Daher könnte der schlechte DNA-Erhalt der Wiener Proben durch eine vergleichsweise lange Lagerung ohne Fixierung zu erklären sein. Einen Hinweis dafür liefert auch die bakterielle Besiedlung aller Magenwandschichten durch stäbchenförmige Bakterien (vermutlich *E. coli*), teilweise auch durch Fadenpilze (siehe Abb. 21b und c). Da diese Organismen beim Lebenden in den tiefen Schichten des Magens nicht vorkommen, ist die wahrscheinlichste Erklärung, dass das Gewebe erst nach einer längeren Lagerung in die Fixierlösung überführt wurde und die Besiedlung und Vermehrung dieser Organismen in der Zwischenzeit stattfinden konnte.

Als weiterer Faktor kann auch das Fixiermittel selbst einen entscheidenden Einfluss auf den DNA-Erhalt haben. So ist bekannt, dass seit den 1950er Jahren gepuffertes Formalin (Lillie 1954) verwendet wurde, was sich stabilisierend auf die DNA auswirkt. Die hierfür durchgeführte Untersuchung der Konservierungsmittel ermöglicht zu dieser spekulativen Frage jedoch keine eindeutige Aussage. Wie die Berliner Proben gezeigt haben, kann auch die Abwesenheit von Formalin eine überdurchschnittliche DNA-Erhaltung ermöglichen.

Einen weiteren Einfluss auf den Erhaltungszustand der DNA könnte das absolute Alter der Proben haben, wie eine Untersuchung an fixiertem Gewebe aus dem Pathologisch-anatomischen Museum Wien nachgewiesen hat (Paireder 2010). Auf Basis der vorliegenden Arbeit kann dem nicht zugestimmt werden, da der DNA-Erhalt der untersuchten Proben primär durch die oben genannten Einflüsse wie Temperatur und Zeit beeinflusst zu sein scheint. Allerdings ist ein Zusammenhang zwischen dem historischen Alter der Proben und dem verwendeten Fixiermittel wahrscheinlich. Das historische Alter könnte daher stellvertretend für die Probenbehandlung in den einzelnen Sammlungen stehen.

9.2 Analysemethoden

Das größte Problem in der molekularen Analyse von Tumoren ist die Anwesenheit von nicht-mutierten Zellen (Lymphozyten, Stromazellen) mit Wildtypallelen, die die Tumorprobe kontaminieren (Böni et al. 1999). Die Kontaminationsrate ist abhängig vom Tumortyp bzw. der Probe. Sie liegt bei chirurgischen Tumorproben bei wenigen Prozent, bei Biopsien bei 50% und bei Urin, Stuhl oder Bronchialspülungen bei mehr als 95%. Sind weniger als 20% Tumorgewebe in einer Probe vorhanden, bleibt die Tumor-DNA meist unterhalb der Nachweisgrenze (Böni et al. 1999).

Bei rezenten, stark kontaminierten Tumorproben können die Tumorzellen durch Mikrodissektion angereichert werden (Soussi 2007). Mit der Mikrodissektion können durch mikroskopische Kontrolle mittels Laser ausgesuchte Zellgruppen oder einzelne Zellen aus formalinfixierten, paraffineingebetteten oder gefrorenem Gewebe identifiziert und aus dem Verband gelöst werden (Böni et al. 1999). Diese Methode ist jedoch sehr aufwendig und weder für eine große Probenzahl rezenten Materials noch für die Analyse von aDNA geeignet, da in der Regel weniger als 50 Zellen mikrodisseziert werden. Außerdem kann es Probleme bei der Unterscheidung zwischen Tumor- und entzündeten Zellen geben, die auch durch Mikrodissektion nicht gelöst werden können (Fenoglio-Preiser et al. 2003).

Die Ausführung zeigt, dass dieser potentiellen Verfälschungsquelle in der vorliegenden Arbeit nicht vorgebeugt werden konnte. Erreichen die Mutationen durch Kontamination mit gesunden Zellen nicht die Nachweisgrenze, werden falsch-negative Mutationsraten ermittelt, so dass die festgestellten 52% Mutationsträger in den historischen Proben lediglich eine Mindestzahl darstellen.

Für die Analyse des Tumorsuppressorgens p53 wurden die Exons 5 bis 8 sequenziert. Als Alternative zu einer Sequenzierung wurden in der Literatur häufig immunhistochemische p53-Untersuchungen durchgeführt. Studien (zusammengefasst bei Fenoglio-Preiser et al. 2003) haben jedoch gezeigt, dass nur eine geringe Korrelation zwischen der immunhistochemischen Detektion von nukleärem p53-Protein, Mutationen in p53 und Magenkarzinomen besteht. Eine positive immunhistochemische Reaktion ist z.B. davon abhängig, an welcher Stelle im Gen die Mutation lokalisiert ist (Fenoglio-Preiser et al. 2003). Problematisch in diesen Untersuchungen ist außerdem der verwendete Antikörper, welcher das Ergebnis unter Umständen beeinflusst (Baas et al. 1994).

Eine weitere Methode zur Untersuchung von Mutationen ist die *single strand conformation polymorphism* (SSCP)-Analyse. Einerseits hat diese Methode das Potential einzelne Basenpaar-

substitutionen zu identifizieren, andererseits hat sich jedoch in der Anwendung gezeigt, dass durch SSCP etwa 38% der Mutationen nicht detektiert werden (Tolbert et al. 1999).

Somit steht derzeit kein alternatives Verfahren für die direkte Sequenzierung zur Verfügung.

Der Vergleich der drei Analysesysteme für den Nachweis von *H. pylori*-typischen Genabschnitten lässt die Annahme zu, dass die Systeme unterschiedlich spezifisch arbeiten. So scheint es, als wären der Nachweis der *cag* PAI und des 23S kodierenden Gens mit der konventionellen PCR trotz der um 15bp respektive 39bp längeren Fragmente sensibler als das 16S-System mit der Real-Time PCR.

Eine mögliche Erklärung dafür sind die Primer, die bei der *cag* PAI- und der Analyse des 23S rRNA Gens den Optimierungskriterien für aDNA entsprechen und daher einen effizienteren Nachweis ermöglichen. Die Primer für die 16S-Untersuchung stammen hingegen aus der Literatur und entsprechen in ihrem Energieprofil nicht den Anforderungen für aDNA (vgl. Kap. 6.3 und Hummel 2003).

Darüber hinaus wurden in der Untersuchung mittels Real-Time-PCR anstelle der üblichen 40 Zyklen bis zu 60 Zyklen verwendet. Eine erhöhte Zugabe der Reaktionskomponenten erfolgte hier jedoch nicht. Daher muss in Betracht gezogen werden, dass aufgrund verbrauchter Komponenten nicht zwangsläufig eine gesteigerte Reaktionseffizienz zu erwarten ist und einige Proben, die *H. pylori*-DNA nur im Spurenbereich beinhalten, trotz erhöhter Zyklenzahl unterhalb der Nachweisgrenze blieben.

Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedliche Effizienz der Analysesysteme ist die Beschaffenheit der TaqMan Sonden in der Real-Time-PCR. So ist bekannt, dass die Fluoreszenzeigenschaft durch die Lagerung und Anwendung reduziert wird. Obwohl die Sonde vor Tageslicht geschützt und als letzte Komponente dem Reaktionsgemisch zugefügt wurde, kann eine lichtinduzierte Fluoreszenzreduktion während des Ansetzens nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt kann jedoch festgehalten werden, dass sich die drei verwendeten Analysesysteme ergänzten und reproduzierbare Ergebnisse lieferten.

9.3 Basenveränderungen *in vitro*

Bei der molekular-genetischen Analyse fixierter Gewebe kann es durch Formalinzerstörung oder Vernetzung zwischen Proteinen und DNA (Chalkley & Hunter 1975) zu Artefakten durch einen fehlerhaften Einbau von Nukleotiden durch die Taq-Polymerase kommen. Auf diese Weise können künstliche C zu T- oder G zu A-Mutationen entstehen (Williams et al. 1999). Als Ursache

nimmt man den Wechsel der Polymerase zwischen den Zielsequenzen während der enzymatischen Amplifikation von zerstörter DNA an (Pääbo et al. 1990).

Ein Vergleich unterschiedlich konservierten Materials für die Analyse von Tumorgewebe durch Williams *et al.* (1999) zeigte, dass etwa ein formalininduzierter Basenaustausch je 500 Basen auftritt. In gefrorenem Gewebe hingegen konnten keine nicht-reproduzierbaren Sequenzveränderungen detektiert werden. Die Anzahl der Artefakte in Formalinmaterial korrelierte negativ mit der Anzahl der Zellen, die in die PCR eingesetzt wurden, so dass bei weniger Zellen in der Reaktion mehr Artefakte auftraten. Kommt es beispielsweise ausgehend von einem DNA-Strang im ersten Zyklus zu einem Fehleinbau, wären theoretisch 50% der Amplifikationsprodukte mutiert, sofern der zweite Teilstrang im zweiten Zyklus fehlerfrei verdoppelt werden würde (Williams et al. 1999). Die Mehrheit dieser Veränderungen betraf C zu T- oder G zu A-Transitionen. Ein Zusammenhang dieser Basenveränderungen mit anderer Probenbehandlung konnte nicht gefunden werden.

Nicht reproduzierbare Basenveränderungen waren ein häufiges Phänomen bei der Analyse der historischen Gewebe. Abbildung 30 zeigt einen nicht reproduzierbaren C/T-Austausch in Exon 8. Die veränderte Base befindet sich an Position 14537 (rot) bei Fragment 8-2. Im oberen Teil der Abbildung ist die Referenzsequenz X54156 dargestellt, darunter zwei Sequenzen der Kontroll-DNA von Probe 1356/1935 aus Zürich. Es handelt sich um den gleichen Extrakt, der mit verschiedenen Primerpaaren amplifiziert wurde, so dass das Ergebnis durch einen Fehleinbau durch die Taq-Polymerase in einem frühen Zyklus erklärt werden kann.

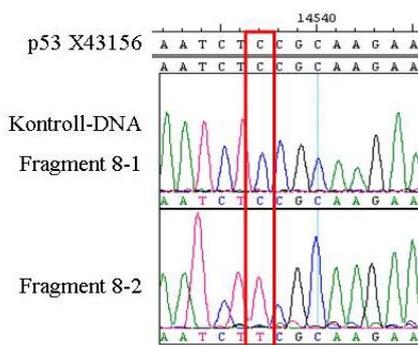


Abb. 30: Nicht reproduzierbarer Basenaustausch in Exon 8 (rot).

Da zur Generierung der meisten p53-Ergebnisse 35 Zyklen genügten, ist von einer ausreichend großen Anzahl an Ausgangskopien auszugehen. Ein fälschlicher Baseneinbau durch die Polymerase würde daher auch nur in einer geringen Zahl an Zielsequenzen manifestiert sein, die unterhalb der Nachweisgrenze blieben. Da außerdem das Kriterium der Reproduzierbarkeit galt, sind formalininduzierte Veränderungen für Ergebnisse dieser Arbeit zu vernachlässigen.

10 Diskussion der Analyseergebnisse

10.1 Veränderte Tumormutationen innerhalb von 60 Jahren

- Tumormutationen von historischen Magenkarzinomen unterscheiden sich von denen aus der rezenten Bevölkerung

In der vorliegenden Arbeit konnten zehn verschiedene Mutationsereignisse in p53 in den historischen Magenkarzinomen identifiziert werden. Mit Ausnahme der *frame-shift*-Mutation sind alle Mutationen aus der Literatur bekannt. Lediglich vier dieser Mutationen wurden jedoch in rezenten Magentumoren gefunden und nur eine Mutation tritt gehäuft auf (Kap. 8.2.2, Tab. 37). Zwei der zehn Mutationen sind an CpG-Inseln lokalisiert und nur eine ist heute als *Hotspot* bekannt. Ferner zeigen sich Unterschiede in den Substitutionsfrequenzen (Kap. 7.2.2, Abb. 26) und eine um etwa 20% höhere p53-Mutationsrate als heute. Somit können genetische Veränderungen zwischen historischem und rezentem Tumorgewebe innerhalb von 60 Jahren festgestellt werden. Daraus ergibt sich die Frage, wie die Veränderungen zu erklären sind.

Die vier bisher von Magentumoren beschriebenen Mutationen wurden alle in ostasiatischen Populationen identifiziert (Hongyo et al. 1995, Liang et al. 1995, Ott et al. 2003, Suzuki et al. 2004). Lediglich die *Hotspot*-Mutation R248W fand sich auch in Ländern außerhalb Asiens relativ häufig. Dieselben Mutationstypen von asiatischen und historischen Magenkarzinompatienten können den Hinweis geben, dass sich karzinogen wirkende Einflüsse ähneln.

Da die Ätiologie von Magenkarzinomen besonders mit dem Einfluss der Ernährung während der Kindheit und einer persistierenden *H. pylori*-Infektion in Verbindung gebracht wird (Cover & Blaser 1992, Lambert et al. 2002, Mayne & Navarro 2002, Becker 2006), ist es wahrscheinlich, dass Veränderungen dieser Faktoren auch Änderungen der genetischen Ausstattung von Tumoren bewirkt haben. Im Folgenden werden daher die Faktoren Ernährung und *H. pylori*-Infektion der historischen europäischen Bevölkerung mit der heutigen Hochrisikoregion Ostasien am Beispiel Japans verglichen.

Bis in die 1970er Jahre war die Ernährung in Japan neben Sojaprodukten und Reis durch traditionell zubereitete *Pickles* (in Gewürze und scharfen Essig eingelegtes Gemüse) sowie durch getrockneten und gesalzenen Fisch geprägt (Francks 2009). Diese Ernährungsweise mit hohen Kochsalzgehalten unterscheidet sich von der üblichen europäischen Ernährung im letzten Jahrhundert. Es gibt jedoch Zeitabschnitte, in denen gravierende Mängel in der Ernährung für die

durchschnittliche Bevölkerung auftraten, z.B. die Zeit während und nach den Weltkriegen in Europa. Die Ernährung während und nach dem Ersten Weltkrieg war schlecht und zeichnete sich durch einen hohen Kochsalzgehalt aus. Beispielsweise waren Salzheringe für die meisten Menschen das einzige verfügbare tierische Protein (Boeing & Frentzel-Beyme 1991). Außerdem ist bekannt, dass während der Kriegsjahre viele Ersatzlebensmittel konsumiert worden sind. Ein Beispiel hierfür ist ein Präparat, das als Ei-Ersatzmittel bekannt wurde. Es enthielt Kartoffelmehl, Kochsalz, Spuren von Eibestandteilen und einen Teerfarbstoff zur Gelbfärbung (Krüger & Tenius 1917). Kochsalz wurde außerdem einer Kombination verschiedener Schlachtabfälle zugesetzt und als „Würze“, „Paste“ oder „Ersatzbrühwürfel“ verkauft (Schwarte 1920). Die hohen Kochsalzgehalte überstiegen den Bedarf der Menschen bei weitem und leisteten einen Beitrag zu den häufiger vorkommenden Ödembildungen, die am Ende und nach dem Ersten Weltkrieg beobachtet wurden (Güstrau 1968) und stellten einen anerkannten Risikofaktor für Magenkarzinome dar.

Das Ernährungsverhalten von Europa und Japan unterscheidet sich maßgeblich durch den Konsum von Sojaprodukten, die kennzeichnend für die ostasiatische Ernährung sind. Die Inhaltsstoffe von Sojaprodukten sollen protektiv gegen verschiedene Krebserkrankungen wirken (Wu et al. 2000, Nagata et al. 2002, Yan & Spitznagel 2009), dennoch ist die Inzidenz für Magenkarzinome in Ostasien deutlich höher als in Europa (Kap. 1.2.1). In einer aktuellen Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von fermentierten Sojaprodukten, wie Sojasauce und Sojapaste, das Risiko für Magenkarzinome erhöht, die Aufnahme von nicht-fermentierten Sojaprodukten, wie Sojamilch und Tofu, das Risiko reduziert (Kim et al. 2011). Bei der Herstellung fermentierter Sojaprodukte werden größere Mengen Salz hinzugefügt, welche die Magenschleimhaut schädigen können (Kap. 1.2.2). Außerdem können sie N-nitroso-Komponenten (Correa et al. 1975, Kato et al. 1992) und Nitrat (Seel et al. 1994) enthalten. Die schützende Wirkung nicht-fermentierter Sojaprodukte konnte auf Isoflavone (Wang & Murphy 1994) zurückgeführt werden, welche die intragastrale Bildung karzinogener N-nitroso-Komponenten blockieren (Yanagihara et al. 1993, Mirvish 1995). Damit zeigt sich, dass der Konsum von Sojaprodukten differenziert betrachtet werden muss.

Neben dem Konsum von Sojaprodukten unterscheidet sich die Ernährung von Europa und Japan durch deren Nitratgehalt. In den 1970er Jahren lag die tägliche Nitrataufnahme in Japan bei 300mg, während in Großbritannien 60 bis 80mg aufgenommen wurden (White 1975). Die größte Nitratquelle in Japan war allerdings Gemüse, dem in Studien gleichzeitig eine protektive Wirkung durch Vitamin C zugeschrieben wird (Chyou et al. 1990).

Da Nitrate nicht nur durch Pflanzen aus dem Boden aufgenommen werden, sondern auch zu Konservierungszwecken verwendet wurden bzw. werden, sind auch für Europa zu Beginn des 20. Jahrhunderts höhere Aufnahmemengen wahrscheinlich.

Ein Grund für die seltenere Verwendung heute ist u.a. die Einführung von Kühlschränken in den Industrieländern. Bis diese neuen Errungenschaften in jedem Haushalt zu finden waren, dauerte es jedoch einige Jahrzehnte. Zwischen 1962 und 1973 verachtachte sich die Zahl der Kühlschränke in deutschen Küchen auf 98% (Statistisches Bundesamt 1973). In den Vereinigten Staaten hatten 1953 bereits 89% der Bevölkerung zu Hause einen Kühlschrank (Anderson 1953). In Japan begann erst nach 1960 die regelmäßige Nutzung, ab dieser Zeit wird jedoch von einem Rückgang der Magenkrebsinzidenz berichtet (Japanese Ministry of Health and Welfare 1980, Decarli et al. 1986).

Die Nutzung von Kühlschränken steht stellvertretend für veränderte Lagerungsbedingungen und Ernährungsgewohnheiten, da frische Produkte ohne künstliche Zusatzstoffe länger haltbar sind. Allerdings ist zu beachten, dass sowohl in Deutschland als auch in Japan schon vor der breitgefächerten Verfügbarkeit von Kühlmöglichkeiten die Magenkrebssterblichkeit ihren rückläufigen Trend begonnen hatte. Die Ursachen müssen daher früher liegen bzw. anderen Ursprungs sein (z.B. *H. pylori*, siehe unten). Bisher konnten jedoch noch keine eindeutigen Erklärungen gefunden werden (Becker & Korfmann 1998).

Dennoch zeichnet sich die Tendenz ab, dass ein langjähriger Kühlschrankgebrauch einer Bevölkerung (> 30 Jahre) eine Wende in der allgemeinen Ernährungsweise bedeutet hat (Coggon et al. 1989). Pointiert gesagt, stellte der Einzug des Kühlschranks in das alltägliche Leben eine erfolgreiche präventive Maßnahme gegen Magenkarzinome dar.

Doch nicht nur Bestandteile der Ernährung und Ernährungsgewohnheiten stellen ein Risiko für die Magenkarzinomentstehung dar, sondern auch die Infektion mit *H. pylori* (Kap. 1.2.2).

Für Europa und Japan sind für die Vergangenheit höhere *H. pylori*-Infektionsraten als heute bekannt. Als Gründe für den Rückgang werden Verbesserungen im Lebensstandard, den hygienischen Bedingungen und der erhöhte Antibiotikaeinsatz diskutiert (Banatvala et al. 1993).

In Europa waren besonders Generationen, die zu Beginn des 20. Jahrhunderts geboren sind, häufig von *H. pylori* verursachter Gastritis betroffen (Sipponen 1995). Für Japan sind hohe Infektionsraten von den Geburtskohorten aus den 1940er bis 1950er Jahren bekannt (Replogle et al. 1996), was für Europa durch die Auswirkungen des zweiten Weltkrieges und den schlechteren hygienischen Bedingungen ebenfalls angenommen werden kann. Rückläufige Infektionsraten konnten beispielsweise für Großbritannien seit den 1960er Jahren in retrospektiven Studien ermittelt werden (Banatvala et al. 1993, Canoy et al. 2002). Da für die japanische Bevölkerung erst

in den 1970er Jahren gravierende Veränderungen im täglichen Leben durch gestiegenen Wohlstand bekannt sind (Allen 1981), ist von einem späteren Rückgang der *H. pylori*-Infektionen auszugehen.

Bei drei der vier historischen Mutationen, die auch in rezenten Magenkarzinomen beschrieben worden sind, handelt es sich um G:C zu A:T-Transitionen (Kap. 8.2.2, Tab. 37). Da alle Patienten, die diese Mutationen trugen, mit *H. pylori* infiziert waren und eine deutlich höhere Inzidenz von Magenkarzinomen mit einer hohen Infektionsrate mit *H. pylori* in Verbindung gebracht wird (The EUROGAST Study Group 1993), ist es möglich, dass die produzierten Stickoxide der Bakterien einen Beitrag zur initialen Mutationsentstehung geleistet haben (vgl. Kap. 8.2.1).

Des Weiteren waren zwei Patienten, von denen ein G:C zu A:T-Basenaustausch in ihrem Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte, von *cag*-positiven *H. pylori*-Stämmen infiziert. Heute sind nahezu alle asiatischen *H. pylori*-Stämme Träger der *cag* PAI, wodurch sich das Risiko einer Magenkarzinomentstehung weiter erhöht (Konturek et al. 2009, Yamaoka 2009).

Die Ausführungen zeigen, dass insbesondere die Einflüsse einer salzreichen und nitrathaltigen Ernährung sowie hohe Infektionsraten mit *H. pylori* verbindende Faktoren zwischen der heutigen japanischen und der historischen europäischen Bevölkerung darstellen und damit vermutlich Quelle ähnlicher Tumormutationen ist.

Dass nur vier von zehn historische Mutationen bisher von Magenkarzinomen bekannt sind, lässt den Schluss zu, dass entweder nicht alle damals karzinogen wirkenden Einflussfaktoren noch heute relevant sind oder dass die Mutationen durch spontane Ereignisse ohne äußere Einflüsse entstanden sind. Da die Mutationen M246K viermal und K291E zweimal detektiert wurden, sind spontane Ereignisse für diese Beispiele jedoch eher unwahrscheinlich. Bei diesen Proben ist eher ein Einfluss der *H. pylori*-Infektion zu vermuten (Kap. 7.4, Tab. 37).

Potentiell andere Mutationsquellen, etwa durch Bestrahlungstherapien in Verbindung mit früheren Krebserkrankungen der Patienten, können aufgrund fehlender Patienteninformationen nicht ausgeschlossen werden.

- Patienten mit *H. pylori*-Infektion weisen vermehrt p53-Mutationen in ihren Magenkarzinomen auf

In den historischen Magenkarzinomproben konnte eine signifikante Assoziation zwischen p53-Mutationen und dem *H. pylori*-Infektionsstatus des Patienten festgestellt werden, wenn Tumor- und gesundes Gewebe getrennt betrachtet wurden ($p=0.019$). Das bestätigt Ergebnisse von rezenten Patienten (Nomura et al. 1991, Asaka et al. 1995). Eine Signifikanz wurde in dieser Arbeit nicht erreicht, wenn die Mutationen gegen den grundsätzlichen Nachweis von *H. pylori* getestet wurden ($p=0.112$). Allerdings ist eine Tendenz erkennbar, die vermuten lässt, dass eine Signifikanz bei größerer Stichprobenzahl erreicht wird.

H. pylori-induzierte p53-Mutationen sollen außerdem seltener in *Hotspot*-Regionen des p53-Gens vorkommen (Murakami et al. 1999). Das lässt sich auch in dieser Untersuchung finden. Lediglich eine Mutation (R248W) von zehn *H. pylori*-positiven Proben ist an einem bekannten *Hotspot* lokalisiert. Bei einer Interpretation dieses Ergebnisses muss allerdings berücksichtigt werden, dass drei Mutationen außerhalb von *Hotspots* detektiert wurden, die *H. pylori*-negativ sind und deren Ursache anderer Erklärungen bedarf (s.o.).

- *H. pylori*-Stämme, die Träger der Pathogenitätsinsel *cag* sind, verursachen häufiger Tumormutationen in p53 als *cag*-negative Stämme

Ein Zusammenhang zwischen *cag*-positiven *H. pylori*-Stämmen und Mutationen im p53-Gen, konnte für die historischen Proben nicht bestätigt werden ($p=0.96$). Dieses Ergebnis hängt vermutlich mit der geringen Stichprobengröße zusammen, da Studien mit einem größeren Probenumfang Zusammenhänge gefunden haben (Deguchi et al. 2001, Kubicka et al. 2002, Shibata et al. 2002).

Die Ergebnisse zeigen dennoch, dass fast zwei Drittel (63%) der *H. pylori*- und *cag* PAI-positiven Patienten Mutationen im p53-Gensegment aufweisen. Diese Verteilung ist zusätzlich aus einer größeren Stichprobe einer brasilianischen Untersuchung bekannt (Lima et al. 2008), die allerdings eine deutlich geringere Anzahl zeigt, als eine weitere Studie, bei der 98% Mutationen beobachtet wurden (Magalhães et al. 2003).

- Historische *H. pylori*-Isolate haben keine resistenztypischen Mutationen gegen Antibiotika, da ein entsprechender Selektionsdruck fehlte

Es konnten keine resistenztypischen Mutationen gegen Clarithromycin in den historischen Geweben identifiziert werden. Voraussichtlich hätten alle Patienten bei Eradikation mit diesem Antibiotikum eine erfolgreiche Behandlung gehabt.

Die Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass ohne Selektionsdruck durch entsprechende Antibiotika die Manifestation resistenztypischer Mutationen unwahrscheinlich ist (Mégraud et al. 1996). Vor 60 Jahren -ohne regelmäßigen Antibiotikakonsum- stellte eine spontane Mutation, die eine Resistenz zur Folge gehabt hatet, keinen Überlebensvorteil für die Magenbakterien dar. Das hat sich heute geändert, was die Behandlung verschiedener Krankheitsbilder erschwert (Malfertheiner et al. 2007). Es ist anzunehmen, dass sich die Resistenz auf weitere Antibiotika ausweiten kann, sofern es Eradikationsalternativen gegen die *H. pylori*-Infektion gibt.

Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit konnte p53-Mutationen und das Magenbakterium *H. pylori* in den historischen Gewebeproben identifizieren. Das veränderte Mutationsspektrum und die veränderte Lokalisation der Mutationen geben den Hinweis, dass sich die Einflüsse auf die Entstehung der Magenkarzinome im letzten Jahrhundert verändert haben.

10.2 Analyse der Konservierungsflüssigkeiten

Die Analyse der Konservierungsflüssigkeiten zeigt Unterschiede zwischen den verschiedenen Sammlungen und ermöglicht in einigen Fällen Vermutungen zur Präparationsmethode bzw. zur zeitlichen Einordnung der Proben.

Es fällt auf, dass in keiner Berliner Probe Formaldehyd, sondern ausschließlich Ethanol nachweisbar ist. Die Präparate stammen aus den Jahren 1952, 1956 und 1964, der Zeit des Wiederaufbaus der ursprünglichen Virchow-Sammlung. Es besteht die Möglichkeit, dass die Feuchtpräparate ursprünglich mit einer formalinhaltigen Lösung, z.B. Kaiserling (1896, Kap. 5.3), fixiert wurden, dann in einem zweiten Schritt zur Wiedererlangung der natürlichen Farbe die Gewebe in Ethanol eingelegt wurden, bis sie in einem dritten Schritt in die Aufbewahrungsflüssigkeit überführt und darin gelagert wurden. Formaldehyd wäre in diesem Fall nicht mehr nachweisbar, jedoch anfänglich verwendet worden (vgl. Pikrinsäure, Kap. 8.4).

Ein Zusammenhang zwischen Bestandteilen der Präparationsflüssigkeiten und der DNA-Erhaltung der Proben kann nur in Ansätzen hergestellt werden. Die Proben aus Berlin zeichnen sich generell durch eine gute Erhaltung aus, welches vollständige Typisierungsergebnisse ermöglicht. Von den Züricher Proben haben zwei eine sehr gute DNA-Erhaltung. Diesen Proben ist gemein, dass in ihren Konservierungsflüssigkeiten ebenfalls kein Formaldehyd nachzuweisen war. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Erkenntnissen, dass ungepuffertes Formalin zwar das Gewebe fixiert, jedoch einen negativen Einfluss auf die Erhaltung des genetischen Materials hat (Greer et al. 1991). Alle anderen Proben haben eine mäßige bis schlechte Erhaltung. Ein weiterer Zusammenhang zu anderen Bestandteilen ist durch die durchgeführten Analysen aber nicht möglich.

Im Falle der Züricher Proben sind Schlussfolgerungen zur Konservierungstechnik wie in der Berliner Sammlung nicht möglich, da weder Unterlagen zu den Proben selbst noch zur Präparationsmethode existieren. Stattdessen erlaubt die Zusammensetzung der Flüssigkeitsproben eine zeitliche Einordnung der Proben ohne jegliche Informationen. Die Probe 8454 von 1951 und Probe 1 weisen mit Campher, Methanol und Formaldehyd die gleichen Bestandteile auf. Daher ist es plausibel anzunehmen, dass Probe 1 ebenfalls in den 1950er Jahren oder vom selben Präparator bearbeitet wurde. Ferner ist eine Präparation von Probe 2 zu ähnlicher Zeit wie 322/1906 denkbar, da beide Ethanol, Campher und Essigsäureabkömmlinge (Ethylacetat und Acetaldehyd) enthalten. Die verbleibende undatierte Probe 1094 ist nach diesen Kriterien jedoch keiner Gruppe zuzuordnen.

Die Analyse der Züricher Proben ermöglicht trotz der geringen Stichprobe mit nur acht Flüssigkeitsproben die Darstellung einer zeitlichen Präferenz hinsichtlich der funktionellen Konservierungsmittel. Bei Proben um 1900 wurde Ethanol verwendet, in den 1930er Jahren weder Formaldehyd noch Ethanol und in den 1950er Jahren Formaldehyd. Campher konnte hingegen immer nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der Konservierungsflüssigkeiten ist nicht erschöpfend behandelt worden, da sie nur einen Nebenaspekt der vorliegenden Arbeit darstellt. Außerdem beschränken sich die durchgeführten Analysen auf organische und leicht flüchtige Bestandteile der Probenflüssigkeiten. Dennoch ermöglicht die Untersuchung einen Einblick in die Präparationsarbeit von vier verschiedenen europäischen pathologischen Sammlungen. Allen ist gemein, dass Campher über etwa sechs Dekaden zur Feuchtgewebekonservierung verwendet wurde, während die Verwendung von Formaldehyd bzw. Ethanol durch zeitliche Trends gekennzeichnet zu sein scheint.

10.3 Verfügbarkeit historischer Tumorgewebe

Die Verfügbarkeit von Probenmaterial ist einer der grundlegenden Limitierungsfaktoren aller Untersuchungen. Um geeignete Gewebeproben zur Verfügung zu haben, wurde mit verschiedenen pathologischen Instituten und Medizinhistorischen Museen weltweit Kontakt aufgenommen. Positive Rückmeldungen und die Erlaubnis Gewebeproben zu entnehmen, kamen von den Sammlungsverantwortlichen in Wien, Berlin, Tartu und Zürich (vgl. Kap. 3).

Auch im Gordon Museums des Kings College London (Medical, Dental and Biomedical Schools at Guy's, King's & St. Thomas's Hospital's) gibt es eine große Anzahl historischer Magenkarzinomproben. Die Erlaubnis zur Probenentnahme durch den Kurator William Edwards lag vor, allerdings war es nicht möglich zeitnah von der *Human Tissue Authority*, Großbritannien, eine Genehmigung für die Ausfuhr des menschlichen Materials zu erhalten.

Im Department of Human Pathology and Oncology der Universität Florenz, Italien, gibt es vermutlich zwei Magentumoren, der Aufwand für die Beschaffung einer so geringen Probenzahl überstieg jedoch den zu erwartenden Nutzen.

Ferner konnte ein Kontakt mit dem Marischal Museum (Aberdeen, Schottland) hergestellt werden, jedoch wollten die Verantwortlichen keine zerstörende Entnahme ihres historischen Materials. Ähnlich verhielt es sich mit Proben der Hunterian Collection des Royal College of Surgeons of England, da eine -erfolglose- Untersuchung von menschlicher und *H. pylori*-DNA in einigen Magentumoren bereits durch Barnes *et al.* (2000) erfolgt worden war.

Mit einer Vielzahl an pathologischen Instituten innerhalb Deutschlands (u.a. Göttingen, Greifswald, Heidelberg, Magdeburg, Marburg) wurde Kontakt aufgenommen, jedoch werden aufgrund von Platzgründen die in Paraffin eingebetteten Biopsien in der Regel nur 10 Jahre aufgehoben.

Im Museum Vrolik (Amsterdam, Niederlande) und im National Museum of Health and Medicine Armed Forces Institute of Pathology (Washington, USA) gibt es ebenfalls keine historischen Magenkarzinome.

Die geringe Verfügbarkeit an geeignetem Probenmaterial zeigt den wissenschaftlichen Wert der Sammlungen und Museen, die historisches menschliches (Feucht-) Gewebe aufbewahren. Obwohl die tatsächliche Probenanzahl in dieser Arbeit unter der Erwartung blieb und daher nicht alle Fragestellungen hinreichend beantwortet werden konnten, ermöglichten die untersuchten Proben Tendenzen hinsichtlich genetischer Veränderungen in historischen Magentumoren.

10.4 Offene Fragestellungen

Bei der Untersuchung der historischen Tumorproben mussten einige Aspekte unbeantwortet bleiben. Ursache dafür ist die geringe Zahl an Proben, die für die Analysen zur Verfügung stand (siehe Kap. 10.3), der Erhaltungszustand des Probenmaterials, der eine erfolgreiche Analyse von nur 45% der Proben ermöglichte und fehlende Anamnesen der Patienten.

Für Folgeuntersuchungen würden in Wien und Berlin -sofern es die Kapazität des dortigen Personals ermöglichte- einzelne weitere Gewebeproben zur Verfügung stehen. Außerdem sind Proben in London vorhanden, sofern die *Human Tissue Authority* eine Ausfuhrgenehmigung erteilen würde (Kap. 10.3).

Beispielsweise war es nicht möglich die Proben mit Mutationen im p53-Gen in die Zeiteinheiten 150, 100 und 50 Jahre einzuteilen, da zu wenig aussagekräftige Proben in diese Kategorien eingeteilt werden konnten. Daher konnten keine genetischen Veränderungen zwischen den Zeitintervallen und damit den äußeren Einflussfaktoren im Laufe der Zeit untersucht werden.

Weiterhin konnten die Tumormutationen nicht mit dem Verlauf von Therapien in Verbindung gebracht werden. Da bei keinem Präparat sichtbare chirurgische Eingriffe beobachtet werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Krankheit -wenn überhaupt- erst in einem späten Stadium diagnostiziert wurde. Da keine Patientenakten existieren, kann auch nicht ermittelt werden, ob eine anderweitige Behandlung, z.B. in Form einer Bestrahlungstherapie, zur Linderung der Beschwerden durchgeführt wurde.

Außerdem wurden die Bestandteile der Konservierungsflüssigkeiten nicht bis ins Detail analysiert (Kap. 10.2), so dass weitere Untersuchungen durchgeführt werden könnten.

10.5 Weiterführende Fragestellungen

Nachdem in dieser Arbeit festgestellt werden konnte, dass es Veränderungen im Mutationsspektrum von Magenkarzinomen innerhalb von 60 Jahren gibt, stellt sich die Frage, ob dieses Phänomen spezifisch für diesen Karzinomtyp ist oder ob es auch andere Karzinome betrifft. Veränderte Erkrankungshäufigkeiten sind beispielsweise auch von Lungen- und Blasenkarzinomen bekannt.

Da Veränderungen bei Lungenkrebs in erster Linie auf das veränderte Rauchverhalten, Bestandteile des Zigarettenrauchs und andere über die Lunge aufgenommene Umweltgifte zurückzuführen sind, stellt eine solche Untersuchung wenig neue Erkenntnisse in Aussicht. Eine Analyse von Tumormutationen in Blasenkarzinomen würde sich vielversprechender gestalten, da die Inzidenz

stetig steigende Raten zu verzeichnen hat (Parkin et al. 2005) und eine geographische und geschlechtsbedingte Stratifizierung zu beobachten ist. Littlekalsoy *et al.* (2007) konnten bei der Untersuchung von fünf bis 70 Jahre alten in Paraffin eingebetteten Biopsien von Blasenkarzinompatienten zeigen, dass immunhistochemische Unterschiede bestehen, die sie auf veränderte Phänotypen in dieser Zeitspanne zurückführten. In der detaillierten Analyse der verschiedenen Marker könnten weiterführende Studien eine Grundlage finden.

In zwei Proben wurden *silent*-Mutationen identifiziert, die dem Tumor keine offensichtlichen Wachstumsvorteile gegenüber anderen Zellen bringen. Auch hier könnten weiterführende Analysen einsetzen, um Mutationen in anderen Exons oder Genen zu identifizieren, deren Auftreten die Entstehung des Karzinoms erklären kann.

Eine weitere Anschlussuntersuchung bietet sich durch den erfolgreichen Nachweis von *H. pylori*. Da veränderte Tumormutationen innerhalb von 60 Jahren festgestellt werden konnten, stellt sich die Frage, ob und in welcher Weise genetische Veränderungen in *H. pylori* außerhalb von resistentypischen Mutationen in dieser Zeitspanne festgestellt werden können. Hintergrund wäre die Annahme, dass ein verändertes Milieu im Magen, z.B. durch veränderte Ernährungsweise des Wirts, einen Einfluss auf das Lebensmilieu der Magenbakterien haben könnte.

11 Zusammenfassung

Krebserkrankungen sind das Resultat komplexer Vorgänge und Veränderungen. Eine wichtige Variable in der Initialisierung ist die Interaktion zwischen Genotyp und Umwelt. Da Magenkarzinome zu den wenigen Krebserkrankungen gehören, bei denen im letzten Jahrhundert ein deutlicher Rückgang in der Inzidenz beobachtet werden konnte (Becker 2006), stellt sich die Frage, ob es Unterschiede in der genetischen Ausstattung von historischen Tumorgenomen im Vergleich zu rezenten gibt.

Als typisches Zielgen für Tumormutationen wurde das Tumorsuppressorgen p53 untersucht. Außerdem wurde *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) als Risikofaktor für die Entstehung von Magenkarzinomen in den historischen Proben identifiziert.

Insgesamt standen 51 Gewebeproben von Magenkarzinompatienten aus den Medizinhistorischen Museen Berlin und Zürich, dem Pathologisch-anatomischen Bundesmuseum Wien sowie der anatomischen Sammlung der Universität Tartu zur Verfügung. Bei 47 Proben handelte es sich nach histologischer Diagnose um Magenkarzinome. Die Proben sind zwischen 50 und 180 Jahre alt und wurden in Konservierungsflüssigkeiten unbekannter Zusammensetzung gelagert.

Von 45% der Proben konnten vollständige Sequenzen der Exons 5 bis 8 des p53-Gens generiert werden.

Es konnten Veränderungen im Mutationsspektrum und in der Lokalisation der Mutationen in den historischen Proben im Vergleich zu rezenten Tumormutationen festgestellt werden. Die Mutationsfrequenz betrug 52%. Insgesamt wurden zehn verschiedene Mutationsereignisse in p53 bei elf verschiedenen Proben detektiert, wobei drei Proben von zwei Mutationen betroffen waren. Zwei Mutationen führen direkt (Q144X) bzw. indirekt (S166fs) zu der Entstehung von Stoppcodons. Zu einem Verlust des p53-Proteins bei gleichzeitiger Akquirierung onkogener Funktionen kommt es durch die *Hotspot*-Mutation R248W (Wang & El-Deiry 2007). Zu einer Zunahme der Funktionsfähigkeit (*gain-of-function*) kommt es außerdem durch die Mutation K291E. Die Mutation E271K ist an einer *splice site* lokalisiert, so dass das Exon nicht in die mRNA übernommen werden kann. Die Konsequenzen der anderen Mutationsereignisse sind nicht eindeutig belegt, scheinen aber einen geringeren Einfluss auf die Funktionalität von p53 zu haben.

Abweichend zu rezenten Magenkarzinomen konnte die Mutation M246K als *Hotspot* der historischen Proben identifiziert werden. Insgesamt waren nur vier historische Mutationen bisher aus rezentem Magenkarzinomgewebe beschrieben, davon die Mehrheit in Studien mit asiatischen Patienten. Die veränderten Mutationen der historischen Magenkarzinome können als Hinweis

auf Veränderungen in den karzinogen wirkenden Einflussfaktoren dienen, etwa eine veränderte Lebens- und Ernährungsweise durch die Einführung von Kühlmöglichkeiten für Lebensmittel.

Der Risikofaktor *H. pylori* konnte in 70% der Gewebeproben sicher nachgewiesen werden. Der Anteil der Träger des Virulenzfaktors *cag* betrug 44%.

73% der Proben mit p53-Mutation waren nachweislich mit *H. pylori* und davon wiederum 63% mit einem *cag*-positiven Stamm infiziert. Die Infektion ermöglicht eine Teilerklärung für die untypische Lokalisation der Mutationen, da *H. pylori*-induzierte Mutationen seltener an Magenkarzinom-*Hotspots* vorkommen (Murakami et al. 1999).

Es konnten keine resistenztypischen Mutationen gegen das Antibiotikum Clarithromycin in den historischen Geweben identifiziert werden.

Die vorliegende Arbeit konnte p53-Mutationen und das Bakterium *H. pylori* in den historischen Gewebeproben identifizieren. Ein verändertes Mutationsspektrum und die veränderte Lokalisation der Mutationen geben den Hinweis, dass sich die Einflüsse auf die Entstehung der Magenkarzinome im letzten Jahrhundert verändert haben.

12 Literatur

- Adam H, Czihak G (1964) Arbeitsmethoden der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie. Fischer Verlag Stuttgart
- Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, Bukanov NO, Drazek ES, Roe BA, Berg DE (1998) Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 28:37-53
- Albenque M, Tall F, Dabis F, Mégraud F (1990) Epidemiological study of *Helicobacter pylori* transmission from mother to child in Africa. *Rev Esp Enferm Di* 78
- Allen GC (1981) A short economic history of Japan. Hong Kong: The Macmillan Press, Ltd.
- Alm RA, Ling L-SL, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ (1999) Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397:176-180
- Amieva MR, El-Omar EM (2008) Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 134:306-323
- Amieva MR, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S (2002) *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell Microbiol* 4:677-690
- Anderson OE (1953) Refrigeration in America: a history of new technologies and its impact. Princeton, NJ: Princeton University Press
- Andreeva VA, Unger JB, Pentz MA (2007) Breast cancer among immigrants: a systematic review and new research directions. *J Immigr Minor Health* 9:307-322
- Antonarakis SE (1998) Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* 11:1-3
- Argent RH, Hale JL, El-Omar EM, Atherton JC (2008) Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *J Med Microbiol* 57:1062-1067
- Argent RH, Kidd M, Owen RJ, Thomas RJ, Limb MC, Atherton JC (2004) Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 127:514-523
- Artelt W (1936) Die anatomisch-pathologischen Sammlungen Berlins im 18. Jahrhundert. *Klinische Wochenschrift* 3:96-99
- Asaka M, Kato M, Kudo M, Katagiri M, Nishikawa K, Yoshida J, Takeda H, Miki K (1995) Relationship between *Helicobacter pylori* infection, atrophic gastritis and gastric carcinoma in a Japanese population. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 7:S7-10
- Atherton JC (1998) *H. pylori* virulence factors. *Br Med Bull* 54:105-120
- Aunapuu M, Puusepp M, Toomsalu M, Arend A (2005) Tartu Old Anatomical Theatre 200- Contribution of German anatomists. *Ann Anat* 187:415-420
- Bach PB, Schrag D, Brawley OW, Galaznik A, Yakren S, Begg CB (2002) Survival of blacks and whites after a cancer diagnosis. *JAMA* 287:2106-2113
- Banatvala N, Mayo K, Megraud F, Jennings R, Deeks JJ, Feldman RA (1993) The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* 168:219-221
- Barbier JP (1994) Nicolas Appert inventeur et humaniste. Royer, Paris
- Bardhan PK (1997) Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Clin Infect Dis* 25:973-978
- Barnes I, Holton J, Vaira D, Spigelman M, Thomas MG (2000) An assessment of the long-term preservation of the DNA of a bacterial pathogen in ethanol-preserved archival material. *J Pathol* 192:554-559
- Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, Schiavon S, Guariso G, Ceroti M, Nitti D, Rugge M, Plebani M, Atherton JC (2008) Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology* 135:91-99

- Bauer K (1950) Über Chemie und Krebs - dargestellt am „Anilinkrebs“ (L. Rehn). Langenbeck's Archives of Surgery 264:21-44
- Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Höfler H (1994) E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. Cancer Res 54:3845-3852
- Becker N (2001) Epidemiologic aspects of cancer prevention in Germany. J Cancer Res Clin Oncol 127:9-19
- Becker N (2006) Epidemiologie von Tumoren. In: Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K (eds) Kompendium Internistische Onkologie. Standards in Diagnostik und Therapie. Springer, 4. Auflage
- Becker N, Korfmann A (1998) Magenkrebs. Neue Erkenntnisse in der Epidemiologie und Ursachenforschung. Onkologie 4:332-339
- Blaser MJ, Atherton JC (2004) *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J Clin Invest 113:321-333
- Blum F (1893) Der Formaldehyd als Härtungsmittel. Z wiss Mikr 10:314-315
- Bodner SM, Minna JD, Jensen SM, D'Amico D, Carbone D, Mitsudomi T, Fedorko J, Buchhagen DL, Nau MM, Gazdar AF, et al (1992) Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation. Oncogene 7:743-749
- Boeing H, Frentzel-Beyme R (1991) Regional risk factors for stomach cancer in the FRG. Environ Health Perspect 94:83-89
- Boncrisiano M, Paccani SR, Barone S, Olivieri C, Patrussi L, Ilver D, Amedei A, D'Elios MM, Telford JL, Baldari CT (2003) The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. J Exp Med 198:1887-1897
- Böni R, Zhuang Z, Burg G, Vortmeyer A (1999) Die Mikrodissektion. Anwendung in der molekularen onkologischen Dermatologie. Hautarzt 50:98-102
- Braithwaite J (1902) Excess of salt in the diet with three other factors the probable causes of cancer. London
- Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Pontén J (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 88:10124-12128
- Brenner H, Rothenbacher D, Bode G, Dieudonné P, Adler G (1999) Active infection with *Helicobacter pylori* in healthy couples. Epidemiol Infect 122:91-95
- Breuer T, Sudhop T, Hoch J, Sauerbruch T, Malfertheiner P (1996) Prevalence of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in the western part of Germany. Eur J Gastroenterol Hepatol 8:47-52
- Brewster L, Jacobson MF (1978) The changing American diet. Washington, DC: Center for Science in the Public Interest
- Brown LM (2000) *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. Epidemiol Rev 22:283-297
- Budzikiewicz H (1992) Eine Einführung. VCH Weinheim
- Buiatti E, Palli D, Decarli A, Amadori D, Avellini C, Bianchi S, Bonaguri C, Cipriani F, Cocco P, Giacosa A, et al (1990) A case-control study of gastric cancer and diet in Italy: II. Association with nutrients. Int J Cancer 45:896-901
- Burck H-C (1981) Histologische Technik. Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis. Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W (1999) DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. Electrophoresis 20:1722-1728
- Butler JM (2005) Forensic DNA Typing, Second Edition: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. Elsevier Academic Press
- Cancer Research UK (2007) Tobacco and cancer risk. <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/causes/lifestyle/tobacco/>.

- Canoy DS, Hart AR, Todd CJ (2002) Epidemiology of duodenal ulcer perforation: a study on hospital admissions in Norfolk, United Kingdom. *Dig Liver Dis* 34:322-327
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8790-8794
- Castillo-Rojas G, Cerbón MA, López-Vidal Y (2008) Presence of *Helicobacter pylori* in a Mexican Pre-Columbian Mummy. *BMC Microbiol* 8:119
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A (1996) *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14648-14653
- Chalkley R, Hunter C (1975) Histone-histone propinquity by aldehyde fixation of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1304-1308
- Chisholm SA, Owen RJ (2003) Mutations in *Helicobacter pylori* *rdxA* gene sequences may not contribute to metronidazole resistance. *J Antimicrob Chemother* 51:995-999
- Chow WH, McLaughlin JK, Malmer HS, Weiner JA, Ericsson JL, Stone BJ, Blot WJ (1994) Occupation and stomach cancer in a cohort of Swedish men. *Am J Ind Med* 26:511-520
- Chyou PH, Nomura A, Hankin JH, Stemmermann GN (1990) A case-cohort study of diet and stomach cancer. *Cancer Res* 50:7501-7504
- Clegg RM (1995) Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol* 6:103-110
- Coggon D, Barker DJ, Cole RB, Nelson M (1989) Stomach cancer and food storage. *J Natl Cancer Inst* 81:178
- Cook MG, McNamara P (1980) Effect of dietary vitamin E on dimethylhydrazine-induced colonic tumors in mice. *Cancer Res* 40:1329-1331
- Cooper A (1992) Removal of colourings, inhibitors of PCR, and the carrier effect of PCR contamination from ancient DNA samples. *Ancient DNA Newsletter* 1:31-32
- Correa P (1992) Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. *Cancer Res* 52:6735-6740
- Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M (1975) A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 2:58-60
- Correa P, Shiao YH (1994) Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 54:1941s-1943s
- Cover TL (1996) The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 20:241-246
- Cover TL, Blanke SR (2005) *Helicobacter pylori* *VacA*, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Micro* 3:320-332
- Cover TL, Blaser MJ (1992) *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease. *Annu Rev Med* 43:135-145
- Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM, Xiang Z, Tompkins DS, Perry S, Lindley IL, Rappuoli R (1995) *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J Clin Pathol* 48:41-45
- Creech Jr JL, Johnson MN (1974) Angiosarcoma of liver in the manufacture of polyvinyl chloride. *J Occup Med* 16:150-151
- de Anta JM, Jassem E, Rosell R, Martínez-Roca M, Jassem J, Martínez-López E, Monzó M, Sánchez-Hernández JJ, Moreno I, Sánchez-Céspedes M (1997) TP53 mutational pattern in Spanish and Polish non-small cell lung cancer patients: null mutations are associated with poor prognosis. *Oncogene* 15:2951-2958
- De Koster E, Buset M, Fernandes E, Deltenre M (1994) *Helicobacter pylori*: the link with gastric cancer. *Eur J Cancer Prev* 3:247-257
- Decarli A, La Vecchia C, Cislaghi C, Mezzanotte G, Marubini E (1986) Descriptive epidemiology of gastric cancer in Italy. *Cancer* 58:2560-2569
- Deguchi R, Takagi A, Kawata H, Inoko H, Miwa T (2001) Association between CagA+ *Helicobacter pylori* infection and p53, bax and transforming growth factor-beta-RII gene mutations in gastric cancer patients. *Int J Cancer* 91:481-485

- den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 15:7-12
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP (1996) Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274:430-432
- Dixon RA, Roberts CA (2001) Modern and ancient scourges: the application of ancient DNA to the analysis of tuberculosis and leprosy from archaeologically derived human remains. *Ancient Biomol* 3
- Dungal N (1959) The carcinogenic elements of smoked foods. *Krebsarzt* 14:22-24
- Dunn BE, Phadnis SH, Henderson J, Choi H (1995) Induction of gastric dysplasia by *H. felis* in p53-deficient mice. *Gut* 37:A40
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49
- El-Omar EM, Penman ID, Ardil IJE, Chittajallu RS, Howie C, McColl KE (1995) *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 109:681-691
- Fenoglio-Preiser CM, Wang J, Stemmermann GN, Noffsinger A (2003) TP53 and gastric carcinoma: a review. *Hum Mutat* 21:258-270
- Fiocca R, Luinetti O, Villani L, Mastracci L, Quilici P, Grillo F, Ranzani GN (2001) Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of gastric carcinoma: interactions between genetic alterations, cellular phenotype and cancer histotype. *Hepatogastroenterology* 48:1523-1530
- Flejou JF, Gratio V, Muzeau F, Hamelin R (1999) p53 abnormalities in adenocarcinoma of the gastric cardia and antrum. *Mol Pathol* 52:263-268
- Fontana C, Favaro M, Minelli S, Criscuolo AA, Pietroiusti A, Galante A, Favalli C (2002) New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 46:3765-3769
- Forbes RJ (1955-1958) *Studies in ancient technology*. Leiden, Vol. 3
- Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, Sitas F (1991) Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 302:1302-1305
- Francks P (2009) *The Japanese consumer. An alternative economic history of modern Japan*. Cambridge University Press, New York
- Fuchs CS, Mayer RJ (1995) Gastric carcinoma. *N Engl J Med* 333:32-41
- Furihata C, Ohta H, Katsuyama T (1996) Cause and effect between concentration-dependent tissue damage and temporary cell proliferation in rat stomach mucosa by NaCl, a stomach tumor promoter. *Carcinogenesis* 17:401-406
- Gaskell SJ (1997) Electrospray: principles and practice. *J Mass Spectrom* 32:677-688
- Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R (2003) *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* 301:1099-1102
- Georgopoulos SD, Mentis AF, Spiliadis CA, Tzouveleki LS, Tzelepi E, Moshopoulos A, Skandalis N (1996) *Helicobacter pylori* infection in spouses of patients with duodenal ulcers and comparison of ribosomal RNA gene patterns. *Gut* 39:634-638
- Giaccia AJ, Kastan MB (1998) The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 12:2973-2983
- Glatzel H (1955) *Nahrung und Ernährung. Altbekanntes und Neuerforschtes vom Essen*. Springer Verlag Berlin Göttingen Heidelberg
- Glupczynski Y, Langenberg W, Dankert J, Noach L, Rauws E, Mentis A (1992) European study group on antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori*. Results of a multicenter European survey in 1991 of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11:777-781

- Glupczynski Y, Mégraud F, Lopez-Brea M, Andersen LP (2001) European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 20:820-823
- Gorelova ND, Dikun PP (1958) Detection of 3, 4-benzopyrene in certain species of smoked fish; fluorescent-spectral analysis. Vopr Onkol 4:398-405
- Grady WM (2001) Genetics of gastric cancer. In: Cowell JK (ed) Molecular genetics of cancer. 2nd edition. Guilford, UK: Bios Scientific Publishers Limited, p 115-136
- Graham DY, Malaty HM, Go MF (1994) Are there susceptible hosts to *Helicobacter pylori* infection? Scand J Gastroenterol Suppl 205:6-10
- Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM (1991) PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. Am J Clin Pathol 95:117-124
- Güstrau E-M (1968) Die medizinische Beurteilung der Ersatzlebensmittel im und nach dem Ersten Weltkrieg. Dissertation, Berlin.
- Haber SL, Wissel RW (1962) Effect of vitamine E on the carcinogenicity of methylcholanthrene. Proc Soc Exp Biol Med 11:774-775
- Habrich C (1991) Zur Bedeutung von Sammlungen und Museen für die Wissenschafts- und Medizingeschichte. In: Ideologie der Objekte - Objekte der Ideologie. Naturwissenschaft, Medizin und Technik in Museen des 20. Jahrhunderts. Georg Wenderoth Verlag Kassel
- Haenszel W (1958) Variation in incidence of and mortality from stomach cancer, with particular reference to the United States. J Natl Cancer Inst 21:213-262
- Hamashima C, Shibuya D, Yamazaki H, Inoue K, Fukao A, Saito H, Sobue T (2008) The Japanese guidelines for gastric cancer screening. Jpn J Clin Oncol 38:259-267
- Harris N, Brill E, Shohat O, Prokocimer M, Wolf D, Arai N, Rotter V (1986) Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. Mol Cell Biol 6:4650-4660
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. Genome Res 6:986-994
- Hess C (2003) Prinzipien des Nachweises langer Deletionen an degradierter DNA aus forensischem und historischem Probenmaterial. Diplomarbeit, Biologische Fakultät, Universität Göttingen
- Heyne M (1901) Das deutsche Nahrungswesen von den ältesten geschichtlichen Zeiten bis zum 16. Jahrhundert. Hirzel Verlag, Leipzig
- Hibi K, Mitomi H, Koizumi W, Tanabe S, Saigenji K, Okayasu I (1997) Enhanced cellular proliferation and p53 accumulation in gastric mucosa chronically infected with *Helicobacter pylori*. Am J Clin Pathol 108:26-34
- Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M (2002) Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. Proc Natl Acad Sci USA 99:14428-14433
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 11:1026-1030
- Hirayama T (1984) Epidemiology of stomach cancer in Japan. With special reference to the strategy for the primary prevention. Jpn J Clin Oncol 14:159-168
- Hjortsberg L, Rubio-Navado JM, Hamroun D, Bérout C, Claustre M, Soussi T (2008) The p53 mutation handbook 2.0, available online; <http://p53.free.fr>.
- Hoffmann-La Roche AG, Urban, Schwarzenberg (1993) Roche Lexikon Medizin
- Hollerbuhl T (2009) Identifikation und Zuordnung prähistorischer menschlicher Skelettelemente aus dem Bernd-Saal der Lichtensteinhöhle anhand morphologischer und molekulargenetischer Kriterien. Diplomarbeit, Biologische Fakultät, Universität Göttingen
- Hongyo T, Buzard GS, Palli D, Weghorst CM, Amorosi A, Galli M, Caporaso NE, Fraumeni Jr JF, Rice JM (1995) Mutations of the K-ras and p53 genes in gastric adenocarcinomas from a high-incidence region around Florence, Italy. Cancer Res 55:2665-2672

- Hopkins RJ, Vial PA, Ferreccio C, Ovalle J, Prado P, Sotomayor V, Russell RG, Wasserman SS, Morris Jr JG (1993) Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. *J Infect Dis* 168:222-226
- Horii A, Nakatsuru S, Miyoshi Y, Ichii S, Nagase H, Kato Y, Yanagisawa A, Nakamura Y (1992) The APC gene, responsible for familial adenomatous polyposis, is mutated in human gastric cancer. *Cancer Res* 52:3231-3233
- Hormozdiari H, Day NE, B. A, E. M (1975) Dietary factors and esophageal cancer in the Caspian Littoral of Iran. *Cancer Res* 35:3493-3498
- Hoshiyama Y, Sasaba T (1992) A case-control study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes, and alcohol consumption in Saitama Prefecture, Japan. *Cancer Causes Control* 3:441-448
- Howson CP, Hiyama T, Wynder EL (1986) The decline in gastric cancer: Epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev* 8:1-27
- Hulten K, Cars O, Hjelm E, Engstrand L (1996) In-vitro activity of azithromycin in against intracellular *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 37:483-189
- Hultén K, Gibreel A, Sköld O, Engstrand L (1997) Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: mechanism and stability in strains from clarithromycin-treated patients. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2550-2553
- Hummel S (2003) Ancient DNA typing: methods, strategies and application. Springer, Berlin-Heidelberg-New York
- Hummel S, Schultes T (2000) From skeletons to fingerprints- STR typing of ancient DNA. *Ancient Biomol* 3:103-116
- Hunt RH (1996) The role of *Helicobacter pylori* in pathogenesis: the spectrum of clinical outcomes. *Scand J Gastroenterol Suppl* 220:3-9
- Hunter SB, Bandea C, Swan D, Abbott K, Varma VA (1993) Mutations in the p53 gene in human astrocytomas: detection by single-strand conformation polymorphism analysis and direct DNA sequencing. *Mod Pathol* 6:442-445
- Husgafvel-Pursiainen K, Boffetta P, Kannio A, Nyberg F, Pershagen G, Mukeria A, Constantinescu V, Fortes C, Benhamou S (2000) p53 mutations and exposure to environmental tobacco smoke in a multicenter study on lung cancer. *Cancer Res* 60:2906-2911
- IARC (1986) IARC Monographs on Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Vol 38. Tobacco smoking, IARC, Lyon
- IARC (1987) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs, vols. 1 to 42, Suppl 7. IARC, Lyon.
- IARC (1994) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 61. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC, Lyon, France.
- Ilver D, Barone S, Mercati D, Lupetti P, Telford JL (2004) *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. *Cell Microbiol* 6:167-174
- Ioachim E, Goussia A, Stefanou D, Agnantis NJ (1997) Expression of p53 protein in gastric cancer: an immunohistochemical study with correlation to proliferative activity. *Anticancer Res* 17:513-517
- Iwamatsu H, Nishikura K, Watanabe H, Ajioka Y, Hashidate H, Kashimura H, Asakura H (2001) Heterogeneity of p53 mutational status in the superficial spreading type of early gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 4:20-26
- Jacobsen NR, White PA, Gingerich J, Møller P, Saber AT, Douglas GR, Vogel U, Wallin H (2010) Mutation spectrum in FE1-MUTATM Mouse lung epithelial cells exposed to nanoparticulate carbon black. *Environ Mol Mutagen* [Epub ahead of print]
- Jafri A, Aziz MY, Ros S, Nizam I (2003) Mutations of the p53 gene in gliomas from Malay patients. *Med J Malaysia* 58:236-242

- Jalanko A, Kere J, Savilahti E, Schwartz M, Syvänen AC, Ranki M, Söderlund H (1992) Screening for defined cystic fibrosis mutations by solid-phase minisequencing. *Clin Chem* 38:39-43
- Japanese Ministry of Health and Welfare (1980) Koseino-shihyo "Cancer". Tokyo: Japan Ministry of Health and Welfare. Health and Welfare Statistics Association
- Japanese Ministry of Health and Welfare (1983) Japan National Nutritional Survey. Tokyo.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58:71-96
- Jones NL, Shannon PT, Cutz E, Yeger H, Sherman PM (1997) Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Pathol* 151:1695-1703
- Jores L (1896) Die Conservierung anatomischer Präparate in Blutfarbe mittels Formalin. *Zbl Path Jena* 7:134
- Jores L (1913) Über eine verbesserte Methode der Konservierung anatomischer Präparate. *Münch med Wschr* 60:976
- Kabat GC, Ng SK, Wynder EL (1993) Tobacco, alcohol intake, and diet in relation to adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Cancer Causes Control* 4:123-132
- Kaiserling C (1896) Über die Conservierung von Sammlungspräparaten mit Erhaltung der natürlichen Farben. *Klin Wschr* 33:775
- Kalach N, Benhamou PH, Dupont C, Raymond J, Bergeret M, Gottrand F, Husson MO (2001a) *Helicobacter pylori* in children: acquisition of antimicrobial resistance after an initial course of treatment. *J Clin Microbiol* 39:3018-3019
- Kalach N, Bergeret M, Benhamou PH, Dupont C, Raymond J (2001b) High levels of resistance to metronidazole and clarithromycin in *Helicobacter pylori* strains in children. *J Clin Microbiol* 39:394-397
- Kamikawa T, Amenomori M, Itoh T, Momoi H, Hiai H, Machinami R, Ishikawa Y, Mori T, Shimahara Y, Yamaoka Y, Fukumoto M (1999) Analysis of genetic changes in intrahepatic cholangiocarcinoma induced by thorotrast. *Radiat Res* 152:S118-124
- Kato I, Tominaga S, Ito Y, Kobayashi S, Yoshii Y, Matsuura A, Kameya A, Kano T, Ikari A (1992) A prospective study of atrophic gastritis and stomach cancer risk. *Jpn J Cancer Res* 83:1137-1142
- Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C (2003) Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8424-8429
- Kebarle P, Tang L (1993) From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of ESI-MS. *Anal Chem* 65:972A-986A
- Khalifa MM, Sharaf RR, Aziz RK (2010) *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen? *Gut Pathog* 2:2
- Kim J, Kang M, Lee JS, Inoue M, Sasazuki S, Tsugane S (2011) Fermented and non-fermented soy food consumption and gastric cancer in Japanese and Korean populations: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Sci* 102:231-244
- Kimpton C, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, Lygo J, Gill P (1994) Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int J Legal Med* 106:302-311
- Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams M (1993) Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl* 3:13-22
- Kishore R, Hardy WR, Anderson VJ, Sanchez NS, Buoncristiani MR (2006) Optimization of DNA Extraction from Low-Yield and Degraded Samples Using the BioRobot® EZ1 and BioRobot® M48. *J Forensic Sci* 51:1055-1061
- Kitchin PA, Szotyori Z, Fromholz C, Almond N (1990) Avoidance of false positives. *Nature* 334:201

- Kivi M, Johansson AL, Reilly M, Tindberg Y (2005) *Helicobacter pylori* status in family members as risk factors for infection in children. *Epidemiol Infect* 133:645-652
- Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO (1991) Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Gastrointestinal Physiology Working Group. Lancet* 337:1503-1506
- Kolbert CP, Persing DH (1999) Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2:299-305
- Konno M, Fujii N, Yokota S, Sato K, Takahashi M, Sato K, Mino E, Sugiyama T (2005) Five-year follow-up study of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by a random amplified polymorphic DNA fingerprinting method. *J Clin Microbiol* 43:2246-2250
- Kono S, Ikeda M, Ogata M (1983) Salt and geographical mortality of gastric cancer and stroke in Japan. *J Epidemiol Community Health* 37
- Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T (2009) *Helicobacter pylori* in gastric cancerogenesis. *J Physiol Pharmacol* 60:3-21
- Körbler J (1972) *Geschichte der Krebskrankheiten*. Dr Herta Ranner Verlag, Wien
- Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ (2000) New concepts of molecular biology for colon carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 47:1291-1297
- Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D (2005) New concepts of molecular biology on gastric carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 52:1305-1312
- Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D, Katsinelos P (2008) New aspects of *Helicobacter pylori* infection involvement in gastric oncogenesis. *J Surg Res* 146:149-158
- Krietsch P, Dietel M (1996) *Pathologisch-anatomisches Cabinet. Vom Virchow-Museum zum Berliner Medizinhistorischen Museum in der Charité*. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin Wien.
- Krüger H, Tenius G (1917) *Die Massenspeisung*. In: *Volkswirtschaftliche Abteilung des Kriegsernährungsamtes* (ed) *Beiträge zur Kriegswirtschaft*, Berlin
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387:299-303
- Kubicka S, Claas C, Staab S, Kühnel F, Zender L, Trautwein C, Wagner S, Rudolph KL, Manns M (2002) p53 mutation pattern and expression of c-erbB2 and c-met in gastric cancer: relation to histological subtypes, *Helicobacter pylori* infection, and prognosis. *Dig Dis Sci* 47:114-121
- Kuck D, Kolmerer B, Iking-Konert C, Krammer PH, Stremmel W, Rudi J (2001) Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immunol* 69:5080-5087
- Kuipers EJ (1999) Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 13:3-11
- Kwok S (1990) Procedures to minimize PCR-product carry over. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, p 142-145
- Lambert R, Guilloux A, Oshima A, Pompe-Kirn V, Bray F, Parkin M (2002) Incidence and mortality from stomach cancer in Japan, Slovenia and the USA. *Int J Cancer* 97:811-818
- Lascols C, Lamarque D, Costa JM, Copie-Bergman C, Le Glaunec JM, Deforges L, Soussy CJ, Petit JC, Delchier JC, Tankovic J (2003) Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 41:4573-4577
- Laurén F, Nevalainen TJ (1993) Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. A time-trend study in Finland with comparison between studies from high- and low-risk areas. *Cancer* 71:2926-2933
- Le-Pecq JB, Paoletti C (1966) A new fluorimetric method for RNA and DNA determination. *Anal Biochem* 17:100-107

- Lea IA, Jackson MA, Li X, Bailey S, Peddada SD, Dunnick JK (2007) Genetic pathways and mutation profiles of human cancers: site- and exposure-specific patterns. *Carcinogenesis* 28:1851-1858
- Lee JH, Abraham SC, Kim HS, Nam JH, Choi C, Lee MC, Park CS, Juhng SW, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT (2002) Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. *Am J Pathol* 161:611-618
- Levi E, Stryker SJ, Rao MS (1996) p53 Protein overexpression in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis: is it an early or late event? *Am J Gastroenterol* 91:11-14
- Levin ML, Goldstein H, Gerhardt PR (1950) Cancer and tobacco smoking; a preliminary report. *J Am Med Assoc* 143:336-338
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351:453-456
- Liang YY, Estève A, Martel-Planche G, Takahashi S, Lu SH, Montesano R, Hollstein M (1995) p53 mutations in esophageal tumors from high-incidence areas of China. *Int J Cancer* 61:611-614
- Lillie RD (1954) *Histopathologic technic and practical histochemistry*. The Blakiston Company: New York, Toronto
- Lima VP, de Lima MA, André AR, Ferreira MV, Barros MA, Rabenhorst SH (2008) *H. pylori* (*CagA*) and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas: correlation with p53 mutation and c-Myc, Bcl-2 and Bax expression. *World J Gastroenterol* 14:884-891
- Linz U, Degenhardt H (1990) Die Polymerase Kettenreaktion. Ein Überblick. *Naturwissenschaften* 77:515-530
- Littlekalsoy J, Vatne V, Hostmark JG, Laerum OD (2007) Immunohistochemical markers in urinary bladder carcinomas from paraffin-embedded archival tissue after storage for 5-70 years. *BJU Int* 99:1013-1019
- Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44:397-401
- Liu DP, Song H, Xu Y (2010) A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene* 29:949-956
- Liu H, Rahmann A, Semino-Mora C, Doi SQ, Dubois A (2008) Specific and sensitive detection of *H. pylori* in biological specimens by real-time RT-PCR and in situ hybridization. *PLoS ONE* 3:e2689
- Lõivukene K, Maaros HI, Kolk H, Kull I, Labotkin K, Mikelsaar M (2002) Prevalence of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolates in Estonia during 1995-2000 in comparison to the consumption of antibiotics used in treatment regimens. *Clin Microbiol Infect* 8:598-603
- Lüllmann-Rauch R (2006) *Histologie*. Stuttgart, New York, Thieme Verlag
- Luzza F, Mancuso M, Imeneo M, Contaldo A, Giancotti L, Pensabene L, Doldo P, Liberto MC, Strisciuglio P, Focà A, Guandalini S, Pallone F (2000) Evidence favouring the gastro-oral route in the transmission of *Helicobacter pylori* infection in children. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12:623-627
- Maesawa C, Tamura G, Suzuki Y, Ogasawara S, Sakata K, Kashiwaba M, Satodate R (1995) The sequential accumulation of genetic alterations characteristic of the colorectal adenoma-carcinoma sequence does not occur between gastric adenoma and adenocarcinoma. *J Pathol* 176:249-258
- Magalhães PP, Queiroz DM, Camargo AA, Simpson AJ (2003) *CagA* status of *Helicobacter pylori* infection and p53 gene mutations in gastric adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 24:145
- Maggi-Solcà N, Valsangiacomo C, Piffaretti JC (2000) Prevalence of *Helicobacter pylori* resistant strains in the southern part of Switzerland. *Clin Microbiol Infect* 6:38-40
- Maki CG, Howley PM (1997) Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol* 17:355-363

- Malaty HM (2007) Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 21:205-214
- Malaty HM, Engstrand L, Pedersen NL, Graham DY (1994) *Helicobacter pylori* infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann Intern Med* 120:982-986
- Malaty HM, Evans DG, Evans Jr DJ, Graham DY (1992) *Helicobacter pylori* in Hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterology* 103:813-816
- Malaty HM, Graham DY, Isaksson I, Engstrand L, Pedersen NL (1998) Co-twin Study of the Effect of Environment and Dietary Elements on Acquisition of *Helicobacter pylori* Infection. *Am J Epidemiol* 148:793-797
- Malfertheiner P, Bornschein J, Selgrad M (2010) Role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer pathogenesis: A chance for prevention. *J Dig Dis* 11:2-11
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ (2007) Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 56:772 - 781
- Malfertheiner P, Nilius M (1994) Pathogenese der *Helicobacter pylori*- Infektion und Diagnostik der *Helicobacter pylori*- Infektion. In: Malfertheiner P (ed) *Helicobacter pylori*: Von der Grundlage zur Therapie, Vol 1. Thieme, Stuttgart, New York, p 11-18, 55-61
- Maltzman W, Czyzyk L (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 4:1689-1694
- Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV (1987) Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 7:961-963
- Matozaki T, Sakamoto C, Suzuki T, Matsuda K, Uchida T, Nakano O, Wada K, Nishisaki H, Konda Y, Nagao M, Kasuga M (1992) p53 gene mutations in human gastric cancer: Wild-Type p53 but not mutant p53 suppresses growth of human gastric cancer cells. *Cancer Res* 52:4335-4341
- Mayne S, Navarro S (2002) Diet, obesity, and reflux in the etiology of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia in humans. *J Nutr* 132
- McCallion WA, Murray LJ, Bailie AG, Dalzell AM, O'Reilly DP, Bamford KB (1996) *Helicobacter pylori* infection in children: relation with current household living conditions. *Gut* 39:18-21
- McMichael AJ, McCall MG, Hartshorne JM, Woodings TL (1980) Patterns of gastro-intestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change. *Int J Cancer* 25:431-437
- Mégraud F, Camous-Juncas C, Occhialini A, et al (1996) *Helicobacter pylori* resistance levels to clarithromycin remain stable. *Gastroenterology* 110
- Melnikow-Raswedenkow N (1896) Über das Aufbewahren pathologisch-anatomischer Präparate. *Zbl Path Jena* 7:49-50
- Mendz GL, Mégraud F (2002) Is the molecular basis of metronidazole resistance in microaerophilic organisms understood? *Trends Microbiol* 10:370-375
- Milner J, Medcalf EA (1991) Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 65:765-774
- Mirvish SS (1983) The etiology of gastric cancer. Intragastic nitrosamide formation and other theories. *J Natl Cancer Inst* 71:629-647
- Mirvish SS (1995) Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Letters* 93:17-48
- Moll UM, LaQuaglia M, Bénard J, Riou G (1995) Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4407-4411
- Moll UM, Riou G, Levine AJ (1992) Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7262-7266

- Mörgeli C (1990) Das Medizinhistorische Museum der Universität Zürich. Zürich o. J.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350
- Murakami K, Fujioka T, Okimoto T, Mitsuishi Y, Oda T, Nishizono A, Nasu M (1999) Analysis of p53 gene mutations in *Helicobacter pylori*-associated gastritis mucosa in endoscopic biopsy specimens. *Scand J Gastroenterol* 34:474-477
- Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N, Shimizu H (2002) A prospective cohort study of soy product intake and stomach cancer death. *Br J Cancer* 87:31-36
- National Cancer Institute (1994) Annual cancer statistics review: 1973-1991. Bethesda, Md.: Department of Health and Human Services. (DHHS publication no. (NIH) 94-2789).
- National Institute of Health (1994) NIH Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH consensus development panel on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA* 272:65-69
- Neumann HG (2009) Risk assessment of chemical carcinogens and thresholds. *Crit Rev Toxicol* 39:449-461
- Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3030-3034
- Nomura A, Grove JS, Stemmermann GN, Severson RK (1990) A prospective study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes, and alcohol consumption. *Cancer Res* 50:627-631
- Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ (1991) *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 325:1132-1136
- Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Gastric Epithelial Cells by Type IV Secretion. *Science* 287:1497-1500
- Ott K, Vogelsang H, Mueller J, Becker K, Müller M, Fink U, Siewert JR, Höfler H, Keller G (2003) Chromosomal instability rather than p53 mutation is associated with response to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 9:2307-2315
- Owen RJ, Xerry J, Peters TM, Teare EL (2002) Surveillance and clinical relevance of vacA genotypes of *Helicobacter pylori* infecting dyspeptic patients in mid-Essex. *Commun Dis Public Health* 5:106-111
- Pääbo S, Irwin DM, Wilson AC (1990) DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J Biol Chem* 265:4718-4721
- Park WS, Oh RR, Park JY, Lee SH, Shin MS, Kim YS, Kim SY, Lee HK, Kim PJ, Oh ST, Yoo NJ, Lee JY (1999) Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res* 59:4257-4260
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74-108
- Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, et al (1992) Cancer incidence in five continents, Lyon: IARC, 1992. IARC Sci Publ VI
- Parsonnet J (1995) The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Alignment Pharmacol Ther* 9 Suppl2:45-51
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelstein JH, Orentreich N, Sibley RK (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325:1127-1131
- Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T (1999) Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA* 282:2240-2245

- Patzak B (2009) Faszination und Ekel. Das Pathologisch-anatomische Bundesmuseum im Wiener Narrenturm. Graz, Verlag F. Sammler.
- Peacock PR (1956) Discussion on cancer research: its present trends. Proc R Soc Med 49:664
- Peek Jr RM, Moss SF, Tham KT, Pérez-Pérez GI, Wang S, Miller GG, Atherton JC, Holt PR, Blaser MJ (1997) *Helicobacter pylori* cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. J Natl Cancer Inst 89:863-868
- Petersen AM, Sorensen K, Blom J, Krogfelt KA (2001) Reduced intracellular survival of *Helicobacter pylori* vacA mutants in comparison with their wild-types indicates the role of VacA in pathogenesis. FEMS Immunol Med Microbiol 30:103-108
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M (2007) Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum Mutat 28:622-629
- Pfister D (2008) Entwicklung einer Multiplex-PCR zur Typisierung der STR-Marker FGA, SE33, TH01, D18S51 und D21S11 in stark degradiertem forensischem und archäologischem Probenmaterial. Diplomarbeit, Biologische Fakultät, Universität Göttingen
- Piechocki R (1986) Makroskopische Präparationstechnik. Leitfaden für das Sammeln, Präparieren und Konservieren. Teil 1 Wirbeltiere. VEB Gustav Fischer Verlag Jena
- Pounder RE, Ng D (1995) The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Alignment Pharmacol Ther 9 Suppl 2:33-39
- Price BD, Calderwood SK (1993) Increased sequence-specific p53-DNA binding activity after DNA damage is attenuated by phorbol esters. Oncogene 8:3055-3062
- Rafi A, Spigelman M, Stanford J, Lemma E, Donoghue H, Zias J (1994) *Mycobacterium leprae* DNA from ancient bone detected by PCR. Lancet 343:1360-1361
- Rehn L (1895) Blasengeschwülste bei Fuchsin-Arbeitern. Verh Dtsch Gesellsch Chir 24:588-600
- Renault B, van den Broek M, Fodde R, Wijnen J, Pellegata NS, Amadori D, Khan PM, Ranzani GN (1993) Base transitions are the most frequent genetic changes at p53 in gastric cancer. Cancer Res 53:2614-2617
- Repogle ML, Kasumi W, Ishikawa KB, Yang S-F, Juji T, Miki K, Kabat GC, Parsonnet J (1996) Increased Risk of *Helicobacter pylori* Associated with Birth in Wartime and Post-War Japan. Int J Epidemiol 25:210-214
- Romeis B (1989) Mikroskopische Technik. Urban & Schwarzenberg. München, Wien, Baltimore
- Rotterdam H (1989) Carcinoma of the stomach. In: Rotterdam H, Enterline HT (eds) Pathology of the stomach and duodenum. Springer Verlag, New York, p 142-204
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350-1354
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467
- Sano T, Tsujino T, Yoshida K, Nakayama H, Haruma K, Ito H, Nakamura Y, Kajiyama G, Tahara E (1991) Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. Cancer Res 51:2926-2931
- Sato T, Fukuyama T, Suzuki T, et al (1959) Studies of the causation of gastric cancer. 2. The relation between gastric cancer mortality rate and salted food intake in several places in Japan. Bull Inst Public Health (Japan) 8:187-198
- Satoh K, Kihira K, Kawata H, Tokumaru K, Kumakura Y, Ishino Y, Kawakami S, Inoue K, Kojima T, Satoh Y, Mutoh H, Sugano K (2001) p53 expression in the gastric mucosa before and after eradication of *Helicobacter pylori*. Helicobacter 6:31-36
- Schilz F (2006) Molekulargenetische Verwandtschaftsanalyse am prähistorischen Skelettkollektiv der Lichtensteinhöhle. Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Göttingen

- Schlag P, Böckler R, Ulrich H, Peter M, Merkle P, Herfarth C (1980) Are nitrite and N-nitroso compounds in gastric juice risk factors for carcinoma in the operated stomach? *Lancet* 1:727-729
- Schlünzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Albrecht R, Yonath A, Franceschi F (2001) Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413:814-812
- Schmerer WM, Hummel S, Herrmann B (2000) STR-genotyping of archaeological human bone: experimental design to improve reproducibility by optimisation of DNA extraction. *Anthropol Anz* 58:29-35
- Schmidt T, Hummel S, Herrmann B (1995) Evidence of contamination in PCR laboratory disposables. *Naturwissenschaften* 82:423-431
- Schmitt W, Haas R (1994) Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol* 12:307-319
- Schmücker K (2007) Untersuchung zum Nachweis von Kontaminationen in PCR-Komponenten und Reaktionsgefäßen. Diplomarbeit, Biologische Fakultät, Universität Göttingen.
- Scholte GH, van Doorn LJ, Quint WG, Linderman J (2001) Genotyping of *Helicobacter pylori* strains in formalin-fixed or Formaldehyde-sublimate-fixed paraffin-embedded gastric biopsy specimens. *Diagn Mol Pathol* 10:166-170
- Schreiber S, Konradt M, Groll C, Scheid P, Hanauer G, Werling HO, Josenhans C, Suerbaum S (2004) The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5024-5029
- Schulz A (2005) Molecular biology of human cancers. An advanced student's textbook. Springer, Netherlands
- Schwarte M (1920) Die Technik im Weltkriege. Ernst Siegfried Mittler und Sohn, Berlin
- Seel DJ, Kawabata T, Nakamura M, Ishibashi T, Hamano M, Mashimo M, Shin SH, Sakamoto K, Jhee EC, Watanabe S (1994) N-nitroso compounds in two nitrosated food products in southwest Korea. *Food Chem Toxicol* 32:1117-1123
- Shiao YH, Rugge M, Correa P, Lehmann HP, Scheer WD (1994) p53 alteration in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol* 144:511-517
- Shibata A, Parsonnet J, Longacre TA, Garcia MI, Puligandla B, Davis RE, Vogelmann JH, Orentreich N, Habel LA (2002) CagA status of *Helicobacter pylori* infection and p53 gene mutations in gastric adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 23:419-424
- Shibuya K, Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJ (2002) Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer* 2:37
- Shikata K, Kiyohara Y, Kubo M, Yonemoto K, Ninomiya T, Shirota T, Tanizaki Y, Doi Y, Tanaka K, Oishi Y, Matsumoto T, Iida M (2006) A prospective study of dietary salt intake and gastric cancer incidence in a defined Japanese population: the Hisayama study. *Int J Cancer* 119:196-201
- Sigal A, Rotter V (2000) Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 60:6788-6793
- Sipponen P (1995) *Helicobacter pylori*: a cohort phenomenon. *Am J Surg Pathol* 19 Suppl 1
- Smetannikova MA, Beliavskaia VA, Smetannikova NA, Savkin IV, Denisova DV, Ustinov SN, Maksimov VN, Shabalin AV, Bolotnova TV, Voevoda MI (2004) Functional polymorphism of p53 and CCR5 genes in the long-lived of the Siberian region. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 11:25-28
- Smith RL (1956) Recorded and expected mortality among the Japanese of the United States and Hawaii, with special reference to cancer. *J Natl Cancer Inst* 17:459-473
- SNaPshot™ Multiplex Kit Protocol (2000)

- Soltermann A, Perren A, Schmid S, Eigenmann F, Güller R, Weber KB, Meier J, Eichenberger P, Komminoth P (2005) Assessment of *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance mutations in archival gastric biopsy samples. *Swiss Med Wkly* 135:327-332
- Song H, Hollstein M, Xu Y (2007) p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat Cell Biol* 9:573-580
- Souici AC, Mirkovitch J, Hausel P, Keefer K, Felley-Bosco E (2000) Transition mutation in codon 248 of the p53 tumor suppressor gene induced by reactive oxygen species and a nitric oxide-releasing compound. *Carcinogenesis* 21:281-287
- Soussi T, Asselain B, Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Claustres M, Bérout C (2006) Meta-analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection. *Clin Cancer Res* 12:62-69
- Soussi T, Bérout C (2001) Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1:233-240
- Statistisches Bundesamt (1973) Reihe 18, H. 1, EVS
- Stewart HL (1967) Experimental alimentary tract cancer. *Natl Cancer Inst Monogr* 25:199-217
- Stolte M (1992) *Helicobacter pylori*- Hauptursache von Gastritis, Ulkus und Malignom? . *Verdauungskrankheiten* 10:120-128
- Stolte M, Bethke B, Ritter M, Lauer E, Eidt H (1990) Praxis der Gastritis-Klassifikationen. *Endoskopie heute* 4
- Strauss BS (1991) The 'A rule' of mutagen specificity: a consequence of DNA polymerase bypass of non-instructional lesions? *Bioassays* 13:79-84
- Sugimura T, Tanaka N, Kawachi T, Kogure K, Fujimura S (1971) Production of stomach cancer in dogs by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Gann* 62:67
- Sun XF, Carstensen JM, Zhang H, Stål O, Wingren S, Hatschek T, Nordenskjöld B (1992) Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 340:1369-1373
- Suzuki S, Muroishi Y, Nakanishi I, Oda Y (2004) Relationship between genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes (CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and NAT2), drinking habits, histological subtypes, and p53 gene point mutations in Japanese patients with gastric cancer. *J Gastroenterol* 39:220-230
- Syvänen AC, Söderlund H, Laaksonen E, Bengtström M, Turunen M, Palotie A (1992) N-ras gene mutations in acute myeloid leukemia: accurate detection by solid-phase minisequencing. *Int J Cancer* 50:713-718
- Tahara E (1993) Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 119:265-272
- Takehima Y, Seyama T, Bennett WP, Akiyama M, Tokuoka S, Inai K, Mabuchi K, Land CE, Harris CC (1993) p53 mutations in lung cancers from non-smoking atomic-bomb survivors. *Lancet* 342:1520-1521
- Talley NJ (2008) Is it time to screen and treat *H pylori* to prevent gastric cancer? *Lancet* 372:350-352
- Tamariz J, Voynarovska K, Prinz M, Caragine T (2006) The application of ultraviolet irradiation to exogenous sources of DNA in plasticware and water for the amplification of low copy number DNA. *J Forensic Sci* 51:790-794
- Tamura G (2006) Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12:192-198
- Tamura G, Kihana T, Nomura K, Terada M, Sugimura T, Hirohashi S (1991) Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res* 51:3056-3058
- Tamura G, Sakata K, Nishizuka S, Maesawa C, Suzuki Y, Iwaya T, Terashima M, Saito K, Satodate R (1996) Inactivation of the E-cadherin gene in primary gastric carcinomas and gastric carcinoma cell lines. *Jpn J Cancer Res* 87:1153-1159

- Tankovic J, Chaumette-Planckaert MT, Deforges L, Launay N, Le Glaunec JM, Soussy CJ, Delchier JC (2007) Routine use of real-time PCR for detection of *Helicobacter pylori* and of clarithromycin resistance mutations. *Gastroenterol Clin Biol* 31:792-795
- Tannahill R (1979) *Kulturgeschichte des Essens. Von der letzten Eiszeit bis heute.* Deutscher Taschenbuchverlag München
- Tariverdian G, Buselmaier W (2004) *Humangenetik. 3. Auflage,* Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- Taylor DE, Ge Z, Purych D, Lo T, Hiratsuka K (1997) Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2621-2628
- The EUROGAST Study Group (1993) Epidemiology of, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut* 34:1672-1676
- Thor AD, Moore DHI, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayall BH, et al (1992) Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 84:845-855
- Tkachenko MA, Zhannat NZ, Erman LV, Blashenkova EL, Isachenko SV, Isachenko OB, Graham DY, Malaty HM (2007) Dramatic changes in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection during childhood: a 10-year follow-up study in Russia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 45:428-432
- Tomb J-F, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388:539-547
- Tornaletti S, Rozek D, Pfeifer GP (1993) The distribution of UV photoproducts along the human p53 gene and its relation to mutations in skin cancer. *Oncogene* 8:2051-2057
- Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Munoz O (1998) A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis* 178:1089-1094
- Toyooka S, Tsuda T, Gazdar AF (2003) The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer. *Hum Mutat* 21:229-239
- Tricker AR (1997) N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev* 6:226-268
- Tully G, Sullivan KM, Nixon P, Stones RE, Gill P (1996) Rapid detection of mitochondrial sequence polymorphisms using multiplex solid-phase fluorescent minisequencing. *Genomics* 34:107-113
- Uchino S, Tsuda H, Noguchi M, Yokota J, Terada M, Saito T, Kobayashi M, Sugimura T, Hirohashi S (1992) Frequent loss of heterozygosity at the DCC locus in gastric cancer. *Cancer Res* 52:3099-3102
- Unger Z, Molnár B, Prónai L, Szaleczky E, Zágoni T, Tulassay Z (2003) Mutant p53 expression and apoptotic activity of *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis in correlation with the presence of intestinal metaplasia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15:389-393
- Ushijima T, Sasako M (2004) Focus on gastric cancer. *Cancer Cell* 5:121-125
- Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, Wahl GM (2002) c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* 9:1031-1044
- van Doorn L-J, Figueiredo C, Mégraud F, Pena S, Midolo P, De Magalhães Queiroz DM, Carneiro F, Vanderborght B, Pegado MDGF, Sanna R, De Boer W, Schneeberger PM,

- Correa P, Ng EKW, Atherton J, Blaser MJ, Quint WGV (1999) Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 116:823-830
- van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Mégraud F, Midolo P, Maggi-Solcà N, Queiroz DM, Nouhan N, Stet E, Quint WG (2001) Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1500-1504
- Varley JM, McGown G, Thorncroft M, Santibanez-Koref MF, Kelsey AM, Tricker KJ, Evans DG, Birch JM (1997) Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. *Cancer Res* 57:3245-3252
- Wahl GM, Stommel JM, Krummel K, Wade M (2007) Gatekeepers of the guardian: p53 regulation by post-translational modification, MDM2 and MDMX. In: Hainaut P, Wiman KG (eds) 25 years of p53 research. Springer, p 73-113
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506-513
- Wang HJ, Murphy PA (1994) Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* 42:1666-1673
- Wang S, El-Deiry WS (2007) p53, cell cycle arrest and apoptosis. In: Hainaut P, Wiman KG (eds) 25 years of p53 research. Springer, p 141-163
- Warren RJ, Marshall BJ (1983) Unidentified curved bacilli in gastric epithelium in active chronic gastric. *Lancet* 1:1273
- WCRF/AICR (2007) World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research: Food, nutrition, and physical activity, and the prevention of cancer: A global perspective. Washington, DC: AICR
- Weed TE, Nuessle W, Ochsner A (1981) Carcinoma of the stomach. Why are we failing to improve survival? *Ann Surg* 193:407-413
- Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G (2000) A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 287:482-485
- Weisburger JH (1985a) Causes of gastric and esophageal cancer. Possible approach to prevention by vitamin C. *Int J Vitam Nutr Res Suppl* 27:381-402
- Weisburger JH (1985b) Nutrition and cancer prevention: gastrointestinal cancer. *Gann Monogr* 31:275-283
- Westenthanner M (2007) Optimierung der Real Time PCR zur Charakterisierung der Degradation von ancient DNA (aDNA) in ausgewählten Skelettelementen. Diplomarbeit, Biologische Fakultät Universität Göttingen / Jena
- White JW (1975) Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. *J Agric Food Chem* 23:886-891
- Wilda M, Bruch J, Harder L, Rawer D, Reiter A, Borkhardt A, Woessmann W (2004) Inactivation of the ARF-MDM-2-p53 pathway in sporadic Burkitt's lymphoma in children. *Leukemia* 18:584-588
- Willerslev E, Cooper A (2005) Ancient DNA. *Proc Biol Sci* 272:3-16
- Williams C, Pontén F, Moberg C, Söderkvist P, Uhlén M, Pontén J, Sitbon G, Lundeberg J (1999) A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 155:1467-1471
- Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, et al (1991) DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254:1001-1003
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130-131, 134-138
- Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, Lai KC, Hu WH, Yuen ST, Leung SY, Fong DY, Ho J, Ching CK, Chen JS, China Gastric Cancer Study Group (2004) *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 291:187-194

- Wu AH, Yang D, Pike MC (2000) A meta-analysis of soyfoods and risk of stomach cancer: the problem of potential confounders. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:1051-1058
- Wu P, Brand L (1994) Resonance energy transfer: Methods and applications. *Anal Biochem* 218:1-13
- Xia HX, Buckley M, Keane CT, O'Morain CA (1996) Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*: prevalence in untreated dyspeptic patients and stability in vitro. *J Antimicrob Chemother* 37:473-481
- Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, Covacci A (1995) Analysis of expression of *CagA* and *VacA* virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *CagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 63:94-98
- Yamada Y, Yoshida T, Hayashi K, Sekiya T, Yokota J, Hirohashi S, Nakatani K, Nakano H, Sugimura T, Terada M (1991) p53 gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases. *Cancer Res* 51:5800-5805
- Yamagiwa K, Ichikawa K (1916) Mitt. a. d. med. Fak. d. Kais. Univ. Tokyo. 15:295
- Yamaoka Y (2009) *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration. *Clin Microbiol Infect* 15:829-834
- Yamaoka Y, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Figura N, Kim JG, Kodama T, Kashima K, Graham DY (1999) Relationship between the *cagA* 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology* 117:342-349
- Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M, Gutierrez O, Saitou N, Kodama T, Osato MS, Kim JG, Ramirez FC, Mahachai V, Graham DY (2002) *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Letters* 517:180-184
- Yan L, Spitznagel EL (2009) Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 89:1155-1163
- Yanagihara K, Ito A, Toge T, Numoto M (1993) Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 53:5815-5821
- Yi SY, Lee WJ (2006) A p53 genetic polymorphism of gastric cancer: differences between early gastric cancer and advanced gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12:6536-6539
- Young M, Russel WT, Browlee J, Collis EL (1926) An investigation into the statistics of cancer in different trades and professions. London
- Yuan J-P, Li T, Chen H-B, Li Z-H, Yang G-Z, Hu B-Y, Shi X-D, Tong S-Q, Li Y-X, Guo X-K (2004) Analysis of gene expression profile in gastric cancer cells stimulated with *Helicobacter pylori* isogenic strains. *J Med Microbiol* 53:965-974
- Yusoff AA, Abdullah J, Abdullah MR, Mohd Ariff AR, Isa MN (2004) Association of p53 tumor suppressor gene with paraclinical and clinical modalities of gliomas patients in Malaysia. *Acta Neurochir (Wien)* 146:595-601
- Zhang LF, Hemminki K, Szyfter K, Szyfter W, Söderkvist P (1994) p53 mutations in larynx cancer. *Carcinogenesis* 15:2949-2951
- Zink AR, Grabner W, Nerlich AG (2005) Molecular identification of human tuberculosis in recent and historic bone tissue samples: The role of molecular techniques for the study of historic tuberculosis. *Am J Phys Anthropol* 126:32-47

13 Anhang

13.1 Abkürzungen und Einheiten

| Abkürzung | Bedeutung |
|-------------------|--|
| % | Prozent |
| & | und |
| = | gleich |
| °C | Grad Celsius |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |
| Abb. | Abbildung |
| aDNA | ancient DNA |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| cm | Zentimeter |
| cm ³ | Kubikzentimeter |
| C _t | <i>threshold cycle</i> |
| ddNTP | Didesoxynukleosidtriphosphat |
| del | Deletion |
| DNA | <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynucleosidtriphosphat |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| ed. | <i>editor</i> , Herausgeber |
| et al. | et alii, und andere |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| Hrsg. | Herausgeber |
| HVR | Hypervariable Region |
| Hz | Hertz |
| i.e.S. | im engeren, eigentlichen Sinn |
| i.w.S. | im weiteren Sinn |
| Kap. | Kapitel |
| M | molar |
| mg | Milligramm |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| mt | mitochondrial |
| m/z | Masse-zu-Ladung-Verhältnis |
| n.Chr. | nach Christi Geburt |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion |
| pH | potentia hydrogenii, Protonenaktivitätsexponent |
| pmol | Picomol |
| ® | rechtlich geschützt |
| ROX | 6-Carboxylrhodamin |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| SBE | <i>single base extension</i> |
| sec | Sekunde(n) |
| SNP | <i>single nucleotide polymorphism</i> |
| STR | <i>short tandem repeat</i> |
| Tab. | Tabelle |
| Taq-Polymerase | <i>Thermus aquaticus</i> -DNA-Polymerase |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| ™ | <i>Trademark</i> |
| U | <i>unit</i> , Einheit für Enzymaktivität |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |

| Abkürzung | Bedeutung |
|-----------|--------------------|
| v.Chr. | vor Christi Geburt |
| vgl. | vergleiche |
| z.B. | zum Beispiel |
| λ | Wellenlänge |

| IUB-Code | |
|----------|-----------------|
| A | Adenin |
| B | nicht A |
| C | Cytosin |
| D | nicht C |
| G | Guanin |
| H | nicht G |
| K | G oder T |
| M | A oder C |
| N | A, C, G, oder T |
| R | A oder G |
| S | C oder G |
| T | Thymin |
| U | Uracil |
| V | nicht T |
| W | A oder T |
| Y | C oder T |

13.2 Verwendete Geräte, Einwegmaterialien, Hilfsmittel und Chemikalien

| Geräte | Hersteller |
|---|------------------------------------|
| ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, | Applied Biosystems |
| ABI PRISM™ 3130xl | Applied Biosystems |
| ABI PRISM™ 7900HT | Applied Biosystems |
| Demineralisationsanlage Typ LAB-UPW | TKA Wasseraufbereitungsanlage GmbH |
| DNA Thermal Cycler Typ Mastercycler® gradient | Eppendorf |
| DNA Thermal Cycler Typ Mastercycler® personal | Eppendorf |
| DNA Thermal Cycler Typ Mastercycler® | Eppendorf |
| DNA-Extraktor Biorobot® EZ1 | Qiagen |
| Elektrophoresekammern Horizon™ 1060 BD 11-14 (11×14 cm) | Gibco BRL |
| Elektrophoresekammern Horizon™ 1060 BD 58 (5×8 cm) | Gibco BRL |
| Elektrophoresekammern Middi large horizontal (15×17 cm) | G&P Kunststofftechnik |
| Elektrophoresekammern Mini horizontal (8×10 cm) | G&P Kunststofftechnik |
| GC: TRACE MS Ultra | Thermo Finnigan |
| Gel Jet Imager & Analyser mit Software IntasGel Capture | Intas |
| Glaskapillaren, 310 Capillaries 47-cm x 50 um 5/pkg | PE Applied Biosystems |
| IBM PC P4, WinXP | Dell Inc. |
| Magnetrührer Ikamag® RET, Ikamag® MTC. Ikamag® RH | Janke & Kunkel Ika-Werk |
| MicroTOF | Bruker Daltonik |
| MS: DSQ | Thermo Finnigan |
| pH 211 Microprocessor pH Meter | Hanna Instruments |
| Power Macintosh G3 | Apple Computer Inc. |
| Power Macintosh G4 | Apple Computer Inc. |
| Präzisionswaage exelence, Typ E 1200S | Satorius |
| Stromversorgung Typ ST606 Electrophoresis Power Supply | Gibco BRL |
| Tecan Ultra® Microplate Reader | |
| Test-tube-Rotator 34528 | Snijders |
| Thermomixer Comfort | Eppendorf |
| TissueLyser LT | Qiagen |
| Tissue Lyser LT Adapter, 12 Tubes | Qiagen |

| Geräte | Hersteller |
|--|--|
| UV-Lampe Typ LK-30 | Konrad Benda Laborgeräte u. Ultraviolettstrahler |
| Variable Mikroliterpipette Discovery 0,5 – 10 µl | ABIMED |
| Variable Mikroliterpipetten Reference®, Typ 4810, Satz 0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl | Eppendorf |
| Vortexer, lab dancer | IKA |
| Vortexer, Vibrofix VF1 | Janke & Kunkel, Ika-Werk |
| Wärmeschrank | Heraeus Typ B6028 |
| Wasser-Destilliergerät, Typ Muldestor | Wagner & Munz |
| Zentrifuge miniSpin | Eppendorf |
| Zentrifuge Typ 5415R | Eppendorf |

| Einwegmaterialien und Hilfsmittel | Hersteller |
|--|-----------------------------|
| Einmaluntersuchungshandschuhe Peha® -safe, Peha® -soft | Hartmann |
| Einmaluntersuchungshandschuhe Nitratex EP, non sterile | Ansell |
| Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 ml) safe-lock | Eppendorf |
| Eppendorf Reaktionsgefäße (2,0 ml) safe-lock | Eppendorf |
| GC/MS-Kapillarsäule, VF-5ms 30m x 25 mm ID, Filmdicke 0,25 µm | Varian |
| Gesichtsmasken Klinidrape® | Mölnlycke Health Care Inc. |
| Kimwipes® Lite | Kinberley Clark® |
| MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate | Applied Biosystems |
| OP-Haube Astronautenform Surgine® | Mölnlycke Health Care, Inc. |
| Parafilm® M | American National Clan™ |
| Pipettenspitzen: blaue Spitzen 1ml | Sarstedt |
| Pipettenspitzen: gelbe Spitzen 100µl | Sarstedt |
| Pipettenspitzen: Standardtips 10µl | Eppendorf |
| Pipettenspitzen: Standardtips 10µl silber | Eppendorf |
| Präparierte Probenröhrchen, 5ml mit 4.5% | Kabe Labortechnik |
| Formalinlösung als Fixativ | |
| SPME-Faser Carboxen/Polydimethylsiloxan 75µm | Supelco |
| 96-Well Microtiter Plates | Corning® Microtest |

| Chemikalien und Kits | Hersteller |
|---|--|
| 1 kb DNA-Leiter (Molekulargewichtslängenstandard) | Invitrogen, Life Technologies |
| 10× PCR Buffer II | Perkin Elmer Cetus |
| ABI Prism® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems |
| Agarose Roti® garose | Roth |
| Albumin (BSA), molecular biology quality | Roche |
| Alconox (Detergenz) | Aldrich |
| AmpliAq Gold™ DNA-Polymerase (5 U/µl) | Perkin Elmer Cetus |
| Aqua bidestillata | eigene Herstellung |
| BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5× Sequencing Buffer | Applied Biosystems |
| BioRobot® EZ1 DNA Tissue Kit | Qiagen |
| Borsäure, p.a. | Merck |
| Bromphenolblau, p.a. | Serva |
| dNTP Mix | Perkin Elmer Cetus |
| Ethanol absolut, p.a. | Zander-Göttingen, Nordbrand-Norhausen; Abfüllung Universitätsklinikumsapotheke Göttingen |
| Ethidiumbromid, wässrige Lösung 1% (w/v), 10 mg/ml | Serva |
| Exonuclease I Reaction Buffer 10× | New England Biolabs |
| Exonuclease I | New England Biolabs |
| Extran® Typ AP13 alkalisch mit Detergenzien | Merck |
| GeneScan™ -120 LIZ™ Standard | Applied Biosystems |
| GeneScan™ -500 ROX™ Standard | Applied Biosystems |
| Hi-Di™ Formamid | Fluka |
| Isopropanol, p.a. | Merck |

| Chemikalien und Kits | Hersteller |
|---|--------------------|
| K562, genomische DNA | Promega |
| LiChrosolv® HPLC – Wasser | Merck |
| MgCl ₂ Solution 2 mM | Perkin Elmer Cetus |
| MinElute™ PCR Purification Kit | Qiagen |
| NucleoSEQ Kit | MACHEREY-NAGEL |
| Oligonucleotide, HPLC-Grade | TIB-MOLBIOL |
| PicoGreen dsDNA quantitation reagent | MoBiTec |
| POP4™ (performance optimized polymer) | Applied Biosystems |
| POP6™ (performance optimized polymer) | Applied Biosystems |
| POP7™ (performance optimized polymer) | Applied Biosystems |
| Proteinase K | Qiagen |
| Qiagen® Multiplex PCR Kit | Qiagen |
| rAPid Alkaline Phosphatase | Roche |
| Salzsäure rauchend, HCl, 37%, p.a. | Merck |
| Tris (Tri[hydroxymethyl]aminoethan), Trizma™ Base, p.a. | Sigma |

13.3 Verwendete Software und Internetseiten

| Software | Hersteller |
|--|--------------------------------|
| ABI PRISM® 310 Data Collection (Version 3.1.0) | Applied Biosystems |
| ABI PRISM® 310 Sequencing Analysis (Version 5.1.1) | Applied Biosystems |
| ABI PRISM® 310 GeneScan-Analysis (Version 3.1.2) | Applied Biosystems |
| ABI PRISM® 310 GeneScan-Analysis (Version 2.1) | Applied Biosystems |
| ABI PRISM® 310 Collection (Version 2.0.2) | Applied Biosystems |
| EditSeq™, DNASTar Lasergene 8 (Version 8.0.2) | DNASTar Inc. |
| PrimerSelect™, DNASTar Lasergene 8 (Version 8.0.2) | DNASTar Inc. |
| MegAlign™, DNASTar Lasergene 8 (Version 8.0.2) | DNASTar Inc. |
| SDS (Version 2.1) | Applied Biosystems |
| SeqMan™II, DNASTar Lasergene 8 (Version 8.0.2) | DNASTar Inc. |
| XFluor4 Software | Tecan Ultra microplates reader |

Internetseiten

<http://p53.free.fr/index.html>
www.kazusa.or.jp/codon
www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
<http://www-p53.iarc.fr/p53aim.html>
<http://www.socr.ucla.edu/SOCR.html>

13.4 Längenstandards

| | Längenstandard |
|---|--|
| 1 Kb Leiter, Invitrogen, Life Technologies (Größen in bp) | 75 – 134 – 154 – 201 – 220 – 298 – 344 – 396 – 506 – 517 – 1018 – 1636 – 2036 – 3054 – 4072 – 5090 – 6108 – 7126 – 8144 – 9162 – 10180 – 11198 – 12216 |
| GeneScan 120 LIZ (in bp), Applied Biosystems | 15 – 20 – 25 – 35 – 62 – 80 – 110 – 120 |
| GeneScan 500 ROX (in bp), Applied Biosystems | 35 – 50 – 75 – 100 – 139 – 150 – 160 – 200 – 250 – 300 – 340 – 350 – 400 – 450 – 490 – 500 |

13.5 Einzeltypisierungsergebnisse der autosomalen STRs und Amelogenin

Tab. 38: Ergebnisse der autosomalen Analysen der Proben aus Berlin. Die Untersuchungen erfolgten mit der abteilungsinternen Oktaplex (Schilz 2006) und mit der Heptaplex (Pfister 2008, Hollerbuhl 2009). Legende gilt für alle folgenden Tabellen: Gewebetyp K: Kontrollgewebe, Gewebetyp T: Tumorgewebe, k.A.: keine Analyse durchgeführt, da das System nicht im Kit vorhanden ist; (): unsicheres Allel

| Probe | Extr./ Gewebe | D13S317 | D21S11 | Amelo- genin | D18S51 | TH01 | D5S818 | FGA | CSF1PO | VWA | D3S1358 |
|--------------------|--------------------|-------------|---------------------|-----------------|----------------|---------------|--------------|-------------|---------------------|--------------|--------------|
| 33/ 1947 | c / K | 11/12 | 28 | X/Y | k.A. | k.A. | 11/12/ 13 | (20)/(23) | (10)/(11) | 14/17/19 | 17 |
| | k / K | 11/12 | 28/30 | X/Y | k.A. | k.A. | 11/12/ 13 | 20/23 | 8/11 | 14/(16)/19 | 17/18 |
| | B1 / T qII / T | 12 11/13 | 31 | X/Y | 14/20 15 | 6/9.3 6/9 | 13 | 22/24 24 | k.A. k.A. | k.A. k.A. | k.A. k.A. |
| | Gesamt- Genotyp | 11/12 | 28/(30/31) | X/Y | (14/15/ 20) | 6/(9/ 9.3) | 11/12/13 | 20/23/24 | (8/10)/11 | 14/19 | 17/(18) |
| 746/ 1951 | c / K | 8/12 | 31.2 | X/Y | k.A. | k.A. | 11 | 19/25 | 12/13 | 14/17 | 14/18 |
| | q / K | 8/12 | 31.2 | X/Y | k.A. | k.A. | 11 | 19/25 | 12/13 | 14/17 | 14/18 |
| | k / T | 8/12 | 31.2 | X/Y | k.A. | k.A. | 11 | 19/25 | 12 | 14/17 | 14/18 |
| | t / T | 8/12 | 31.2 | X/Y | 12/17 | 7/9 | 11 | 19/25 | k.A. | k.A. | k.A. |
| Gesamt- Genotyp | 8/12 | 31.2/- | X/Y | 12/17 | 7/9 | 11/- | 19/25 | 12/13 | 14/17 | 14/18 | |
| 176/ 1952 | c / K | 9/12 | 28/29 | X/Y | k.A. | k.A. | 13/(15) | (18)/(23) | 10/11 | 15/18 | 14/15 |
| | k / K | 9/12 | 28/29 | X/Y | k.A. | k.A. | 12 | 18/23 | 10/11 | 15/18 | 14/15 |
| | t / T | 9/12 | 29 | X/Y | 15/17 | 8/9.3 | 12 | 18/23 | k.A. | k.A. | k.A. |
| | B1 / T | 9/12 | 28/29 | X/Y | 15/17 | 8/9.3 | 12 | 18/23 | k.A. | k.A. | k.A. |
| Gesamt- Genotyp | 9/12 | 28/29 | X/Y | 15/17 | 8/9.3 | 12/(13) | 18/23 | 10/11 | 15/18 | 14/15 | |
| 415/ 1953 | c / K | 11/14 | 29/(30)/(31) | X/Y | k.A. | k.A. | (12) | (18)/(19) | 10/12 | 17/18 | 14/15 |
| | k / k | 11/14 | 29/(30)/(31) | X/Y | k.A. | k.A. | 12 | 18/19 | 10/12 | 17/18/19 | 14/15 |
| | u / T | 11/14 | 29 | X/Y | 14/15 | 6/9.3 | 12 | 18/19 | k.A. | k.A. | k.A. |
| | B1 / T | 11/14 | 29/31 | X/Y | 14/15 | 6/9.3 | 12 | 18/19 | k.A. | k.A. | k.A. |
| Gesamt- Genotyp | 11/14 | 29/31 | X/Y | 14/15 | 6/9.3 | 12/- | 18/19 | 10/12 | 17/18 | 14/15 | |
| 461/ 1953 | c / K | 12/13 | 27/(28)/ (29)/30 | X | k.A. | k.A. | 9/11 | 21/22 | 9/11 | 17/18 | 14/15 |
| | k / K | 12/13 | 27/(28)/ (29)/30 | X | k.A. | k.A. | 9/11 | 21/22 | 9/11 | 17/18 | 14/15 |
| | t / T | 12/13 | 27 | X | 14/17 | 8/9 | 9/11 | (21)/22 | k.A. | k.A. | k.A. |
| | Gesamt- Genotyp | 12/13 | 27/30 | X/X | 14/17 | 8/9 | 9/11 | 21/22 | 9/11 | 17/18 | 14/15 |
| 29/ 1955 | c / K | 11 | 28/30 | X | k.A. | k.A. | 11/13 | (20)/(23) | (8)/10 | 14/19 | 11/13 |
| | B2 / K | 11 | 28/30 | X | k.A. | k.A. | 11/12 | 20/23 | (8)/11 | 14/19 | 11/13 |
| | k / T | 11 | (27)/28 | X | | 7 | | | k.A. | k.A. | k.A. |
| | B2 / T | 11 | 28/30 | X | 14 | 7/9.3 | 11/13 | 20/23 | k.A. | k.A. | k.A. |
| Gesamt- Genotyp | 11/11 | 28/30 | X/X | (14) | 7/(9.3) | 11/13 | 20/23 | 8/(10/11) | 14/19 | 11/13 | |
| 734/ 1955 | c / K | 11 | 30 | X/Y | k.A. | k.A. | 11/12 | 20 | | 14/16 | 15 |
| | q / K | | | | k.A. | k.A. | | | | 13.2/18 | |
| | k / T | 8 | | X/Y | k.A. | k.A. | | | 12 | | |
| | qII / T | 11 | 30 | X | | | | | k.A. | k.A. | k.A. |
| Gesamt- Genotyp | (8)/11 | 30/- | X/Y | -/- | -/- | (11/12) | (20/-) | (12/-) | (13.2/14/ 16/18) | (15/-) | |
| 1113/ 1955 | c / M | 12/13 | (30) | X | k.A. | k.A. | 10/12 | 20/22 | 10/11 | 12/17 | 15/16 |
| | k / M | 12/13 | 30 | X | k.A. | k.A. | 10/12 | 20/22 | 10/11 | 12/17 | 15/16 |
| | t / T | 12/13 | 30 | X | 14/17 | 6/7 | 10/12 | 20/22 | k.A. | k.A. | k.A. |
| | B3 / T | 12/13 | 30 | X | 14/17 | 6/7 | 10/12 | 20/22 | k.A. | k.A. | k.A. |
| Gesamt- Genotyp | 12/13 | 30/30 | X/X | 14/17 | 6/7 | 10/12 | 20/22 | 10/11 | 12/17 | 15/16 | |
| 1160/ 1955 | c / M | 8/11 | 30/31.2 | X | k.A. | k.A. | 12 | 20 | 10 | 15/19 | 15/18 |
| | k / M | 8/11 | 30/31.2 | X | k.A. | k.A. | 12 | 20 | 10 | 15/19 | 15/18 |
| | t / T | 8/11 | 30/31.2 | X | 12/18 | 6/9 | 12 | 20 | k.A. | k.A. | k.A. |
| | B1 / T | 8/11 | 30/31.2 | X | 12/18 | 6/9 | 12 | 20 | k.A. | k.A. | k.A. |
| Gesamt- Genotyp | 8/11 | 30/31.2 | X/X | 12/18 | 6/9 | 12/12 | 20/20 | 10/- | 15/19 | 15/18 | |

| Probe | Extr./ Gewebe | D13S317 | D21S11 | Amelo- genin | D18S51 | TH01 | D5S818 | FGA | CSF1PO | VWA | D3S1358 |
|--------------------|--------------------|---------|------------------------------|-----------------|--------|-------|--------|----------------|--------|---------|-----------|
| 949/ 1956 | c / M | 11 | 30(31)/ (31.2)/32.2 | X | k.A. | k.A. | 11 | 20/24/ (25) | 10/12 | 14/16 | 15/18 |
| | k / M | 11 | 30(31)/ (31.2)/ (32.2) | X | k.A. | k.A. | 11 | 20/24 | 10/12 | 14/16 | 15/18 |
| | t / T | 11 | 30/32.2 | X | 14/18 | 9 | 11 | 20/24 | k.A. | k.A. | k.A. |
| | B1 / T | 11 | 30/32.2 | X | 14/18 | 9 | 11 | 24 | k.A. | k.A. | k.A. |
| Gesamt- Genotyp | | 11/11 | 30/32.2 | X/X | 14/18 | 9/- | 11/11 | 20/24 | 10/12 | 14/16 | 15/18 |
| 777/ 1959 | c / M | 12/13 | 28/30.2 | X | k.A. | k.A. | 12 | 20/23 | 11/13 | 16/18 | 15 |
| | k / M | 12/13 | 28/30.2 | X | k.A. | k.A. | 12 | 20/23 | 11/13 | 16/18 | 15 |
| | u / T | 12/13 | 28/32.2 | X | 13/20 | 6/8 | 12 | 20/23 | k.A. | k.A. | k.A. |
| | Gesamt- Genotyp | | 12/13 | 28/32.2 | X/X | 13/20 | 6/8 | 12/12 | 20/23 | 11/13 | 16/18 |
| 722/ 1960 | c / M | (11)/12 | 28/30 | X/Y | k.A. | k.A. | 11/12 | 19/22 | 10/11 | 17/18 | 15/17 |
| | k / M | 11/12 | 28/30 | X/Y | k.A. | k.A. | 11 | 19/22 | 10/11 | 17/18 | 15 |
| | t / T | 11 | | X/Y | 18 | | 11/12 | 19/22 | k.A. | k.A. | k.A. |
| | B1 / T | 11/12 | | X/Y | | 9.3 | 11 | 19 | k.A. | k.A. | k.A. |
| Gesamt- Genotyp | | 11/12 | 28/30 | X/Y | (18) | (9.3) | 11/12 | 19/22 | 10/11 | 17/18 | 15/18 |
| 741/ 1963 | c / M | 9/12 | 33.2 | X/Y | k.A. | k.A. | 11/12 | 23/(25) | 9/12 | 13/18 | 17/18 |
| | k / M | 9/12 | 33.2 | X/Y | k.A. | k.A. | 11/12 | 23/25 | 9/12 | 13/18 | 17/18 |
| | t / T | 9/12 | 33.2 | X/Y | 16/18 | 7/9 | | 23/25 | k.A. | k.A. | k.A. |
| | B1 / T | 9/12 | 33.2 | X/Y | 16/18 | 7/9 | 11/12 | 23/25 | k.A. | k.A. | k.A. |
| Gesamt- Genotyp | | 9/12 | 33.2/33.2 | X/Y | 16/18 | 7/9 | 11/12 | 23/25 | 9/12 | 13/18 | 17/18 |
| 1234/ 1964 | c / M | 8/12 | 29/(30) | X | k.A. | k.A. | 10/11 | (21) | 11 | 14/17 | 15/18 |
| | k / M | 8/12 | 29 | X | k.A. | k.A. | 10/11 | 21 | 11 | 14/17 | 15/18 |
| | u / T | 8/12 | 29/34.2 | X | 13/16 | 6/9.3 | 10/11 | 21 | k.A. | k.A. | k.A. |
| | B1 / T | 8/12 | 29/(30/ 33.3/34.2) | X | 13/16 | 6/9.3 | 10/11 | 21 | k.A. | k.A. | k.A. |
| Gesamt- Genotyp | | 8/12 | 29/34.2 | X/X | 13/16 | 6/9.3 | 10/11 | 21/21 | 11/- | 14/17 | 15/18 |
| 1294/ 1964 | c / K | 9/11 | 28/29 | X/Y | k.A. | k.A. | 11 | 20/22 | 11/12 | 13.2/18 | 14/17 |
| | k / T | 9/11 | 29 | X/Y | k.A. | k.A. | 11 | 20/22 | 11/12 | 18 | 14/17 |
| | t / T | 9/11 | 28/29 | X/Y | 15/17 | 6/8 | 11 | 20/22 | k.A. | k.A. | k.A. |
| | Gesamt- Genotyp | | 9/11 | 28/29 | X/Y | 15/17 | 6/8 | 11/11 | 20/22 | 11/12 | (13.2)/18 |

Tab. 39: Ergebnisse der autosomalen Analysen der Proben aus Tartu

| Probe | Extr./ Gewebe | D13S317 | D21S11 | Amelo | D18S51 | TH01 | D5S818 | FGA |
|----------------|------------------|--------------|-----------------------|-------|------------|-----------|-----------|----------|
| 430 | T1 / K | | | X/Y | 14/17 | (9.3) | 10/11 | 23 |
| | T3 / K | 12/14 | | X | 15/17 | 9.3 | | 22/23 |
| | T3 / T | 9/11 | 31.2 | | | 6 | 9 | 23 |
| | T5c / T | 9 | | X/Y | | 7 | | 23 |
| | Gesamt-Genotyp | 9/(11/12/14) | (31.2) | X/Y | (14/15)/17 | (6/7)/9.3 | (9/10/11) | (22)/23 |
| 432 | T3 / K | | 30 | X | | | | |
| | T1 / T | 9 | | X | | 7 | 11 | |
| | T3 / T | 11 | 33 | Y | 18 | 6 | 11 | |
| | Gesamt-Genotyp | (9/11) | (30/33) | X/(Y) | (18) | (6/7) | 11/- | -/- |
| 434 | T1 / K | (9)/11 | 31.2/33 | X/Y | 13/18 | 6/7 | 9/11 | 22/(23) |
| | T3 / K | 9/11 | 31.2/33 | X/Y | 13/18 | 6/7 | 9/11 | 22/23 |
| | T1 / T | (9)/11 | 31.2/33 | X/Y | 13/18 | 6/7 | 9/11 | 22/(23) |
| | T3 / T | 9/11 | 31.2/33 | X/Y | 13/18 | 6/7 | 9/11 | 22/23 |
| | Gesamt-Genotyp | 9/11 | 31.2/33 | X/Y | 13/18 | 6/7 | 9/11 | 22/23 |
| 443 | T1 / K | 8/11 | 27/30.2/31.2 | X | 17 | 9.3 | 12 | 19/22 |
| | T3 / K | 8/11 | 27/(28)/ 30.2/31.2 | X | 17 | 9.3 | 12 | 19/22 |
| | T1 / T | 8/11 | 27/(28)/ 30.2/31.2 | X | 17 | 9.3 | 12 | 19/22 |
| | T3 / T | 8/11 | 27/(28)/ 30.2/31.2 | X | 17 | 9.3 | 12 | 19/22 |
| | Gesamt-Genotyp | 8/11 | 27/(28)/ 30.2/31.2 | X/X | 17/17 | 9.3/9.3 | 12/12 | 19/22 |
| | | | | | | | | |
| 444 | T1 / K | 11/12 | | X | 17 | 6/9.3 | 10/12 | 21 |
| | T3 / K | 11/12 | 30 | X | 14/17 | 6/9.3 | 10/12 | 21 |
| | T1 / T | 11/12 | (28) | X | 14/17/18 | 6/9.3 | 10/12 | 21/(22) |
| | T3 / T | 11/12 | 28 | X | 14/17 | 6/9.3 | 10/12 | 20/21/22 |
| | Gesamt-Genotyp | 11/12 | 28/(30) | X/X | 14/17 | 6/9.3 | 10/12 | 21/22 |
| 448 | T1 / T | | | X | | | | |
| | T3 / T | | | X | | | | |
| | Gesamt-Genotyp | -/- | -/- | X/- | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 449 | T1 / K | | | | | 9.3 | 12 | |
| | T1 / K | | | | | 9 | | |
| | T1 / T | | 32.2/33.2 | | | | | |
| | T1 / T | | | Y | | | | |
| | T3 / T | | | X | | | | |
| Gesamt-Genotyp | -/- | (32.2/33.2) | (X/Y) | -/- | (9/9.3) | (12) | -/- | |
| 455 | T1 / K | 10/11 | | | | (10) | 9 | |
| | T1 / K | | | | | 7 | | |
| | T3 / K | 11 | | | | | | |
| | T3 / T | | | | | 6 | | |
| | Gesamt-Genotyp | (10)/11 | -/- | -/- | -/- | (6/7) | (9) | -/- |
| 456 | T1 / K | 12 | | X/Y | | 9.3 | 12 | |
| | T3 / K | 8/12 | | X/Y | | 6/9 | 12 | |
| | T5cTL / K | 8/12 | | X/Y | | 9 | 12 | |
| | T1 / T | 12 | 32.2 | X/Y | | 9 | 12 | 21 |
| | T1 / T | 8/12 | 32.2 | X/Y | | 9/9.3 | 12 | 21/24 |
| | T3 / T | 8/12 | | X/Y | 17 | 9/9.3 | 12 | 21/24 |
| | T5cTL / T | 8/12 | | X/Y | 16/ (21) | 9 | 12 | 21 |
| | Gesamt-Genotyp | 8/12 | 32.2/32.2 | X/Y | (16/17/21) | 9/9.3 | 12/12 | 21/24 |
| 593 | T1 / K | 8/(11)/12 | | X | | 9.3 | | |
| | T3 / K | 11/13 | | X | 16 | 6 | | 20 |
| | T1 / T | 8 | | X | 17 | 6/9 | | 19/20/24 |
| | T3 / T | (11)/12 | | X | 16 | 6 | | 20 |
| | Gesamt-Genotyp | 8/11/12/(13) | -/- | X/X | 16/(17) | 6/(9/9.3) | -/- | 20/(24) |

Tab. 40: Ergebnisse der autosomalen Analysen der Proben aus Wien

| Probe | Extr./ Gewebe | D13S317 | D21S11 | Amelo | D18S51 | TH01 | D5S818 | FGA | CSF1PO | VWA | D3S1358 | | | | | |
|--------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|-------|---------|-------|---------|----------------|---------|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 476 | d / K | 12 | | | k.A. | k.A. | 12 | | 11 | 17 | | | | | | |
| | g | | | | k.A. | k.A. | | | | | | | | | | |
| | m | | | | k.A. | k.A. | | | | | | | | | | |
| | q | | | | k.A. | k.A. | 12 | | | | | | | | | |
| | Gesamt- Genotyp | (12)/- | -/- | -/- | k.A. | k.A. | 12/- | -/- | (11)/- | (17)/- | -/- | | | | | |
| 11773 | d / K | | | | k.A. | k.A. | | | 11 | | | | | | | |
| | h / T | | | | k.A. | k.A. | | | | | | | | | | |
| | Gesamt- Genotyp | -/- | -/- | -/- | k.A. | k.A. | (11)/- | -/- | (11)/- | -/- | -/- | | | | | |
| 1003 | d / K | | | X | k.A. | k.A. | 12 | | 11 | k.A. | 16 | | | | | |
| | W1 / K | | | | | | | | | | | | | | | |
| | q | 8 | | X | k.A. | k.A. | 12/13 | | | | k.A. | | | | | |
| | Gesamt- Genotyp | (8)/- | -/- | X/- | -/- | -/- | 12/(13) | -/- | (11)/- | -/- | (16)/- | | | | | |
| 4674 | d / K | 11/12 | | X | k.A. | k.A. | 10/11 | (24) | | 16/19 | 15 | | | | | |
| | g / K | 11/12 | | X | k.A. | k.A. | 10/11 | | | | | | | | | |
| | m | 11 | | X | k.A. | k.A. | 11 | | | | | | | | | |
| | o | 11 | | X | k.A. | k.A. | | | | | | | | | | |
| | Gesamt- Genotyp | 11/12 | -/- | X/X | k.A. | k.A. | 10/11 | -/- | -/- | 16/(19) | -/- | | | | | |
| 12675 | d / K | 9 | 27/28/ 29.2/30.2 | X/Y | k.A. | k.A. | 9 | 22 | 10/11 | 15/(17)/18 | 14/16 | | | | | |
| | f2 / K | | | | 13/21 | 6/9 | 22 | | k.A. | k.A. | k.A. | | | | | |
| | W1 / K | 30 | | | 13/21 | 6/9 | | | | | | | | | | |
| | W1 / T | 27/(28/ 29.2)/30.2 | | | | | | | | | | | | | | |
| Gesamt- Genotyp | (9/-) | 27/28/ 29.2/30.2 | (X/Y) | 13/21 | 6/9 | (9/-) | | | | | | 22/- | (10/11) | (15/18) | (14/16) | |
| 33003 | d / K | 14 | 30/31 | | k.A. | k.A. | | | k.A. | (11) | k.A. | | | | | |
| | W1 / K | | 29 | | | | | | | | | | | | | |
| | q / T | | | | k.A. | k.A. | 11 | 23 | | 15 | 17 | | | | | |
| | Gesamt- Genotyp | (14)/- | (29/30/31) | -/- | k.A. | k.A. | (11)/- | (23)/- | -/- | (15)/- | (17)/- | | | | | |
| 5474 | d / K | 12 | | X/Y | k.A. | k.A. | 12 | | 11 | 17 | | | | | | |
| | g / K | 8/12 | | Y | k.A. | k.A. | 11 | | | | | | | | | |
| | q / T | | | | k.A. | k.A. | | | | 11/15 | | | | | | |
| | Gesamt- Genotyp | (8)/12 | -/- | (X)/Y | k.A. | k.A. | (11/12) | (22)/- | (11)/- | (11/15/17) | | | | | | |
| 14446 | d / K | | | Y | k.A. | k.A. | | | 11 | 11 | | | | | | |
| | h / | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Gesamt- Genotyp | -/- | -/- | -(Y) | k.A. | k.A. | -/- | -/- | (11)/- | (11)/- | -/- | | | | | |
| 11807 | d / K | 8 | | X/Y | k.A. | k.A. | | | (10)/11 | 14 | | | | | | |
| | h / K | | | | k.A. | k.A. | | | | | | | | | | |
| | q / T | | | | k.A. | k.A. | (12)/13 | 19/22 23/24 | | 16/17 | (16)/17 | | | | | |
| | Gesamt- Genotyp | (8)/- | -/- | (X)/Y | k.A. | k.A. | 13/- | (19/22/23/24) | (11)/- | (14/16/17) | (17)/- | | | | | |
| 11808 | d / K | 8/12 | 27/28/ 29.2/30.2 | X/Y | k.A. | k.A. | 11/12 | 22 | 10 | 14/17 | 14/(16) | | | | | |
| | f / K | | | X/Y | 13/21 | 6/9 | 22 | | k.A. | k.A. | k.A. | | | | | |
| | f2 / K | | 27/30.2 | X/Y | 13/21 | 6/9 | | | | | | | | | | |
| | Gesamt- Genotyp | (8/12) | 27/30.2 | X/Y | 13/21 | 6/9 | | | | | | (11/12) | 22/- | (10/-) | (14/17) | (14/16) |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18616 | d / K | 12 | (28) | X | k.A. | k.A. | | 22/23/27 | | | | | | | | |
| | f2 / K | | 28/31.2 | X | 13 | 5/8 | | | | | | | | | | |
| | m/o / K | (8.2)/12 | 28 | X | k.A. | k.A. | | | | | | 10/11 | 23/27 | 11/13 | 13/18 | 15/16 |
| | W1 / K | 12 | | X | 12/13 | 8 | | | | | | 10/(11) | | k.A. | k.A. | k.A. |
| | W1 / T | 12 | | X | 13 | 8 | | | | | | 10/(11) | | k.A. | k.A. | k.A. |
| | Gesamt- Genotyp | 12/- | 28/(31.2/ 32.2) | X/X | (12)/13 | (5)/8 | 10/11 | 23/27 | (11/13) | (13/18) | (15/16) | | | | | |

| Probe | Extr./ Gewebe | D13S317 | D21S11 | Amelo | D18S51 | TH01 | D5S818 | FGA | CSF1PO | VWA | D3S1358 |
|-------|---|---------|----------|-------|----------------------|----------------------|---------|----------|--------|---------|---------|
| 8753 | d / K W1 / K | | 30.2 | | k.A. | k.A. | 11 | | | | |
| | Gesamt- Genotyp | -/- | (30.2)/- | (X)/- | -/- | -/- | (11)/- | -/- | -/- | k.A. | k.A. |
| 11794 | d / K | | | | | | | | | 17 | |
| | Gesamt- Genotyp | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | (17)/- | -/- |
| 11768 | h / K q / T | 8/12 | | | | | 12 | 21 | 11 | 17 | |
| | Gesamt- Genotyp | (8/12) | -/- | -/- | -/- | -/- | (12)/- | (21)/- | (11)/- | (17)/- | -/- |
| 8043 | d / K f2 / K | | 27/28 | | | | 12 | 24 | | | |
| | Gesamt- Genotyp | -/- | (27/28) | -/- | -/- | -/- | (12)/- | (24)/- | -/- | -/- | -/- |
| 14984 | s / T | | | | | | | 25.2 | | | |
| | Gesamt- Genotyp | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- | (25.2)/- | -/- | -/- | -/- |
| 8695 | d / T | | 31 | | k.A. | k.A. | | | | | |
| | Gesamt- Genotyp | -/- | (31)/- | -/- | k.A. | k.A. | -/- | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 15809 | d / K o / K s / T (Fuji) s / T (EZ1) | 9 11 | | | k.A. k.A. k.A. | k.A. k.A. k.A. | | | | 15/20 | |
| | Gesamt- Genotyp | (9/11) | -/- | -/- | k.A. | k.A. | (12/13) | (25) | -/- | (15/20) | -/- |

Tab. 41: Ergebnisse der autosomalen Analysen der Proben aus Zürich

| Probe | Extr./Gewebetyp | D13S317 | D21S11 | Amelo | D18S51 | TH01 | D5S818 | FGA |
|----------------|-----------------|---------|-------------|-------|---------|---------|--------|-------|
| 322/1906 | Z1 / K | 10/12 | | X | | 7/9/9.3 | 11/12 | 23 |
| | Z3 / K | 10/12 | | X/Y | 15/17 | 7 | 11/12 | 23 |
| | Z1 / T | 10 | | X/Y | | 7/9.3 | 11 | 23 |
| | Z3 / T | 10/12 | | X/Y | 15 | 7/9.3 | 11 | 23 |
| Gesamt-Genotyp | | 10/12 | -/- | X/Y | 15/(17) | 7/9.3 | 11/12 | 23/23 |
| 774/1930 | Z1 / K | 8/11 | 29/31 | X/Y | 12 | 8/9.3 | 11/12 | 20/22 |
| | Z3 / K | 8/11 | 29/31 | X/Y | 12 | 8/9.3 | 11/12 | 20/22 |
| | Z1 / T | 8/11 | 29/31 | X/Y | 12 | 8/9.3 | 11/12 | 20/22 |
| | Z3 / T | 8/11 | 29/31 | X/Y | 12 | 8/9.3 | 11/12 | 20/22 |
| Gesamt-Genotyp | | 8/11 | 29/31 | X/Y | 12/- | 8/9.3 | 11/12 | 20/22 |
| 1356/1935 | Z1 / K | 8/11 | 29/30 | X | 14/16 | 6/8 | 10 | 22/24 |
| | Z3 / K | 8/11 | 29/30 | X | 14/16 | 6/8 | 10 | 22/24 |
| | Z1 / T | 8/11 | 29/30 | X | 14/16 | 6/8 | 10 | 22/24 |
| | Z3 / T | 8/11 | 29/30 | X | 14/16 | 6/8 | 10 | 22/24 |
| Gesamt-Genotyp | | 8/11 | 29/30 | X/X | 14/16 | 6/8 | 10/10 | 22/24 |
| 8454/1951 | Z4 / T | | | | | 7 | | |
| Gesamt-Genotyp | | -/- | -/- | -/- | -/- | (7)/- | -/- | -/- |
| 13901/1958 | Z4 / K | | | | 14 | | | |
| | Z1 / T | | 31.2/32.2 | | | | | |
| | Z1 / T | | | | | | 13 | |
| Gesamt-Genotyp | | -/- | (31.2/32.2) | -/- | (14)/- | -/- | (13)/- | -/- |
| 1094/Z | Z1 / K | | | | | 6 | | |
| | Z1 / T | | | | | 11 | | |
| Gesamt-Genotyp | | -/- | -/- | -/- | (11)/- | (6)/- | -/- | -/- |
| 1 / Z | Z1 / K | | | X | | | | |
| Gesamt-Genotyp | | -/- | -/- | (X)/- | -/- | -/- | -/- | -/- |
| 2 / Z | Z1 / K | | | X | 12 | | | |
| | Z1 / K | 11 | | | | | | |
| | Z2 / T | | | X/(Y) | | 6 | 12 | |
| Gesamt-Genotyp | | (11)/- | -/- | X/(Y) | (12)/- | (6)/- | (12)/- | -/- |

14 Glossar

Hoffmann-La Roche AG *et al.* (1993)

Adenokarzinom: *Carcinoma adenomatosum*, Karzinom des drüsenbildenden Gewebes; je nach vorherrschenden Strukturen als alveoläres, papilläres, tubuläres, schleimbildendes, anaplastisches Karzinom bezeichnet

Anilinkrebs: ein bei Anilinarbeitern nach oft langer Latenzzeit vorkommender „Aminokrebs“ der Harnblase durch aromatische Amine als Begleitstoff des Anilins; oft erst nach vorherigem Auftreten einer papillomatösen Hyperplasie

Atrophie: Gewebsschwund infolge von Mangelernährung der Gewebe; allgemein bei Störung des Gleichgewichts zwischen auf- und abbauenden Stoffwechselprozessen zugunsten des letzteren

Autolyse: die Selbstverdauung (Autodigestion) abgestorbener bzw. absterbender Zellen durch die aus Lysosomen freiwerdenden Enzyme, und zwar ohne Mitwirkung von Bakterien

Biospie: v.a. mikroskopische Untersuchung einer dem lebenden Organismus mittels eines Instrumentes, z.B. einer Spezialkanüle; durch Exzision etc. entnommene Gewebprobe

cDNA: *complementary DNA*; DNA, die mittels des Enzyms reverse Transkriptase aus DNA synthetisiert wird

Cholangiokarzinomen: Gallengangskarzinom, von den intrahepatischen Gallengängen ausgehende bösartiges Geschwulst

Duodenum: Zwölffingerdarm

Dysplasie: Fehlgestaltung, Fehlbildung als Folge gestörter morphologischer Gewebs- und Organentwicklung; zytologisch: die epitheliale Dysplasie: Differenzierungsstörung des Plattenepithels bis zu Entdifferenzierung der Zellen = intraepitheliales Karzinom

Eradikation: vollständige, „auf die Wurzel (Radix) gehende“ Vernichtung = Ausrottung eines Krankheitsgeschehens

Gastrin: ein von der Schleimhaut des Magenantrums produziertes- und den Drüsen des Magenfundus und -korpus auf dem Blutweg zugeführtes- Peptidhormon aus 17 Aminosäuren

Gastritis: durch äußere oder innere (exo- oder endogene) Faktoren verursachte, akute oder chronische Magenschleimhautentzündung

Hypoxie: i.e.S. herabgesetzter Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut; i.w.S. verminderte bis unzureichende Sauerstoffversorgung der Körpergewebe

Inflammation: Entzündung, vom -aktiven- Bindegewebe und den Blutgefäßen getragene Reaktion des Organismus auf einen äußeren oder innerlichen ausgelösten Entzündungsreiz mit dem Zweck, diesen zu beseitigen oder zu inaktivieren und die reizbedingte Gewebsschädigung zu reparieren

intestinal: den Darmkanal, i.w.S. auch den Verdauungstrakt betreffend

Inzidenz: in der Epidemiologie die Anzahl neuer Erkrankungsfälle in der Zeiteinheit; meist als absolute Anzahl der Fälle pro Jahr oder pro 100.000 Personen pro Jahr

Kardia: der Speiseröhren-Magen-Übergang bzw. die *Pars cardiaca ventriculi*

Leiomyosarkom: ein bösartiger Tumor vom Typ der glatten Muskulatur; meist von Haarbalgmuskeln ausgehend; oft nur mit geringgradiger Zell- und Kernpolymorphie; wichtigstes Malignitätskriterium sind Zahl und Atypie der Mitose

LOH: *loss of heterozygosity*, Verlust der Heterozygotie; Ausschaltung des zweiten Allels durch Mutation nach Defekt des ersten Allels

Magenkarzinom: *Carcinoma ventriculi*, Magenkrebs: bösartiges epitheliales Geschwulst der Magenschleimhaut

Malignität: Bösartigkeit; die Neigung eines Krankheitsprozesses, fortzuschreiten, zerstörend zu wirken und zum Tode zu führen

Metaplasie: v.a. durch chronische Reize, Ernährungs- oder Funktionsmangel ausgelöste Umwandlung eines regelhaft reifen (= voll ausdifferenzierten) Gewebes in ein embryologisch verwandtes, dessen Zellen evtl. infolge andersgerichteter Differenzierung Formbesonderheiten aufweisen

Mortalität: Sterblichkeit; statistische Sterbeziffer: die Verminderung der Bevölkerungszahl durch den Tod, i.e.S. die Prozentzahl der Todesfälle in einem bestimmten Zeitraum, bezogen auf die Gesamtbevölkerung oder auf Bevölkerungsteile

Non-Hodgkin-Lymphome: die malignen Lymphome mit Ausnahme der Lymphogranulomatose („Hodgkin“-Krankheit)

Plattenepithelkarzinom: von der Epidermis, Plattenepithel-tragenden Schleimhäuten oder metaplasierterem Zylinderepithel ausgehendes Malignom mit ungleich großen, atypischen, in Strängen oder Nestern angeordneten Zellen

Prädisposition: Abschätzung des individuellen Risikos für die Krebsanfälligkeit

Prävalenz: epidem. Häufigkeit aller Fälle einer bestimmten Krankheit in einer Population zum Zeitpunkt der Untersuchung

Siegelringzelle: große runde Zelle mit schleimreichem Zytoplasma und randständigem Kern

Skrotalkrebs: verhorntes Plattenepithelkarzinom der Hodensackhaut; bei Schornsteinfegern als Berufskrebs

Spindelgifte: *spindle poisons*; die Bildung des Spindelapparates verhindernde bzw. den Bau verändernde oder die Funktion hemmende Substanzen; Mitosegift: chemisches Agens, das durch Einwirkung auf den Ruhekern (G₁, S oder G₂ der Interphase) oder auf die Mitose (oder Meiose) schädliche bis letale, meist irreversible Veränderungen der Chromosomen oder Störung des Spindelapparates oder der Plasmateilung bewirkt

szirrhöses Karzinom: Karzinom von besonders harter Konsistenz; es besteht aus Bindegewebsfasern, in die Tumorzellen eingestreut sind

Tumor: Pl. Tumoren; allg. jede umschriebene Schwellung („Geschwulst“) von Körpergeweben

Tumor-Nekrose-Faktor (*tumor necrosis factor*, TNF): von Zellen des Makrophagen-/Monozyten-Systems gebildeter oder gentechnologisch hergestellter Faktor, der selektiv zur Auflösung maligner Zellen führt

Ulcus duodenum: Zwölffingerdarmgeschwür; Genese: neben erhöhter Säuresekretion kommen Störungen der Autoregulation, exogene Noxen, gesteigerte Motilität und Defekte an schleimhautschützenden Mechanismen in Frage

15 Lebenslauf

Katharina Licht
Geiststraße 3c / 49
37073 Göttingen

PROMOTION

Seit Januar 2008

Stipendiatin des DFG-Graduiertenkollegs 1034 an der Georg-August-Universität Göttingen

„Die Bedeutung genetischer Polymorphismen in der Onkologie: Von den Grundlagen zur individualisierten Therapie“
Sprecher: Prof. Dr. Jürgen Brockmöller

Promotion zum Thema: „Identifikation von Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 und des Bakteriums *Helicobacter pylori* in Magenkarzinomen histopathologischer Präparate aus verschiedenen medizinhistorischen Sammlungen.“

Anleiter: Dr. S. Hummel

Betreuer: Prof. Dr. B. Herrmann; Prof. Dr. J. Brockmöller

PUBLIKATION Schmücker K, Herrmann B, Hummel S (2009) Possible changes in the genomic features of tumor tissues over the last 150 years. *J Clin Pharmacol Therapeut* 47 (1): 44-45

STUDIUM

10/2002-01/2007

Studium an der Georg-August-Universität Göttingen im Diplomstudiengang Biologie

Hauptfach: Anthropologie

1. Nebenfach: Mikrobiologie
2. Nebenfach: Geologie

Diplomarbeit zum Thema: „Untersuchung zum Nachweis von Kontaminationen in PCR-Komponenten und Reaktionsgefäßen“ in der Abteilung für Historische Anthropologie

Abschluss: Dipl. Biol.

SCHULBILDUNG

08/1993-07/2002

Ökumenisches Domgymnasium Magdeburg,
Abschluss: Abitur