

II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

# Die Rolle des Transkriptionsfaktors RUNX3 bei der Karzinogenese des Magens

Mathias J. Friedrich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Chr. Prinz
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 19. April 2007 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26. September 2007 angenommen.

Für meine Eltern

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

FRIEDRICH, MJ. ; RAD R. ; LANGER R. ; VOLAND P. ; HOEFLER H. ; SCHMID RM. ; PRINZ C. ; GERHARD M.: Lack of RUNX3 regulation in human gastric cancer. *J Pathol* (2006), Oktober, Nr. 210, S. 141–146

RAD R. ; BRENNER L. ; BAUER S. ; SCHWENDY S. ; LAYLAND L. ; PRAZERES DA COSTA C. ; REINDL W. ; DOSSUMBEKOVA A. ; FRIEDRICH M. ; SAUR D. ; WAGNER H. ; SCHMID RM. ; PRINZ C.: Cd25<sup>+</sup>/foxp3<sup>+</sup> t cells regulate gastric inflammation and helicobacter pylori colonization in vivo. *Gastroenterology* (2006), August, Nr. 131, S. 525–537

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1 Das Magenkarzinom des Menschen	9
1.1.1 Epidemiologie	9
1.1.2 Histopathologie des Magenkarzinoms	11
1.1.3 Mechanismen der Karzinogenese im humanen Magen	12
1.2 Der Transkriptionsfaktor RUNX3	19
1.2.1 Transkriptionsfaktoren aus der Runt-Familie	19
1.2.2 RUNX3 und Karzinogenese	22
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	23
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1 Biopsiematerial, Probengewinnung und Aufbereitung	24
2.1.1 Patienten	24
2.1.2 Proben zur Mikrodisektion	24
2.1.3 Frische Magenbiopsien	26
2.1.4 Helicobacterstatus	26
2.2 Laser Capture Mikrodisektion	26
2.2.1 Vorbereitung der Präparate	27
2.2.2 Mikrodisektion der Materialproben	28
2.2.3 Lyse der Mikrodisektate	28
2.3 Ribonukleinsäureextraktion	28
2.3.1 RNA-Extraktion aus Zellysaten	29
2.3.2 DNase-Verdau	30
2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.4.1 Primer	31
2.4.2 Praktische Durchführung	32
2.5 Agarose-Gelelektrophorese	33
2.5.1 Praktische Durchführung	33
2.6 Klonierung von PCR-Produkten	34

2.6.1	Durchführung der Klonierung . . . . .	35
2.6.2	Plasmidisolaton . . . . .	36
2.7	Reverse Transkription . . . . .	37
2.7.1	Reagenzien . . . . .	37
2.7.2	Praktische Durchführung . . . . .	38
2.8	Quantitative Real Time PCR (QRT-PCR) . . . . .	40
2.8.1	Methodische Grundlagen . . . . .	40
2.8.2	Quantifizierung . . . . .	41
2.8.3	Primer und Probes . . . . .	42
2.8.4	Praktische Durchführung . . . . .	42
2.9	Immunhistochemie . . . . .	43
2.9.1	Reagenzien und Methoden . . . . .	44
2.9.2	Praktische Durchführung . . . . .	46
2.10	Statistik und Abbildungen . . . . .	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
3.1	Etablierung der quantitativen PCR aus Mikrodissektaten . . . . .	48
3.1.1	Auswirkungen des DNase-Verdaus auf die RNA-Qualität . . . . .	48
3.1.2	Vergleich zweier Reverse Transkriptions-Systeme . . . . .	52
3.2	Quantitative Bestimmung der RUNX3-Expression in der Magenmucosa . . . . .	53
3.2.1	Patientenkollektiv, Auswahlkriterien und histologische Evaluation . . . . .	53
3.2.2	Erhöhte RUNX3-Expression in H. pylori-induzierter Gastritis . . . . .	55
3.2.3	Validierung der Methodik anhand frischer Magenbiopsien . . . . .	56
3.2.4	Keine Assoziation der RUNX3-Expression mit Karzinomen . . . . .	60
3.3	RUNX3-Expression in mikrodissezierter Magenmucosa . . . . .	61
3.3.1	RUNX3 wird überwiegend im Stroma exprimiert . . . . .	61
3.3.2	Die RUNX3-Expression wird im atrophischen, metaplastischen und neoplastischen Epithel nicht herunterreguliert . . . . .	62
3.4	Immunhistochemische Untersuchung der RUNX3-Expression . . . . .	64
3.4.1	RUNX3-Protein-Expression in der Magenmucosa . . . . .	64
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1	Einleitung . . . . .	67
4.2	RUNX3 und das Magenkarzinom des Menschen . . . . .	68
4.2.1	Gesteigerte RUNX3-Expression in entzündeter Magenschleimhaut . . . . .	68
4.2.2	Expressionsmuster in der Magenmucosa . . . . .	69
4.2.3	Kein Expressionsverlust in intestinalen Magenkarzinomen . . . . .	70
4.3	RUNX3 und Karzinogenese — eine Kontroverse . . . . .	70

4.4	Ein mögliches Modell zu RUNX3 und gastraler Karzinogenese . . . . .	72
4.4.1	RUNX3 ist kein epithelialer Tumorsuppressor . . . . .	72
4.4.2	RUNX3, TGF $\beta$ und Karzinogenese im Stroma . . . . .	73
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>78</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>98</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<i>E. coli</i>	Escherichia coli
<i>H. pylori</i>	Helicobacter pylori
ABC	Avidin–Biotin–Complex
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
BabA	Blood Group Antigen Binding Adhesin
BMP	Bone Morphogenic Protein
bp	Base Pairs
C <sub>T</sub>	Threshold Cycle
CagA	Cytotoxin Associated Gene A
CBFB	Core Binding Factor Beta
CDH1	Cadherin 1, Type 1, E-Cadherin
cDNA	Complementary DNA
CDX	Caudal Type Homeobox Transcription Factor
CTNNB1	Catenin Beta
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
FAP	Familäre Adenomatöse Polyposis
FF	Fresh Frozen
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
FRET	Förster–/Fluoreszenz–Resonanz–Energie–Transfer
GAPDH	Glyceraldehyd–3–Phosphat–Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin–Eosin
hMLH1	Human MutL Homolog 1
HNPCC	Hereditäres Nicht Polypöses Colon Carcinom
HRP	Horse–Radish–Peroxidase
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL–1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL–1RA	Interleukin 1 –Rezeptor-Antagonist

IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
ITF	Intestinal Trefoil Factor, TFF3
LB	Lysogeny Broth
LCM	Laser Capture Microdissection
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
mRNA	Messenger RNA
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
OR	Odds Ratio
PAS	Periodic Acid Schiff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. Polymerase Chain Reaction
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
QRT-PCR	Quantitative Real Time PCR
RD	Runt Domain
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Reverse Transkriptase, Reverse Transkription
RUNX	Runt Related Transcription Factor
SHH	Sonic Hedgehog
SMAD	Mothers Against Decapentaplegic Homolog
STAT	Signal Transducer And Activator Of Transcription
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TFF	Trefoil Factor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
TIMP	Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
uPA	Urokinase Type Plasminogen Activator
UreB	Urease B Gen
VacA	Vacuolating Cytotoxin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WNT	Wingless-Type MMTV Integration Site Family
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Magenkarzinom des Menschen

### 1.1.1 Epidemiologie

Etwa 934.000 Menschen weltweit sind im Jahr 2002 neu an Magenkrebs erkrankt. Obwohl das Magenkarzinom damit die vierthäufigste maligne Erkrankung ist, ist es die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache, bedingt durch eine durchschnittliche Überlebensrate von lediglich 25% [121]. Epidemiologische Daten der IARC (International Agency for Research on Cancer) zeigen neben geschlechtsspezifischen auch deutliche regionale Unterschiede in der Inzidenz und Mortalität der Erkrankung. So ist die altersgenormte Inzidenzrate in Japan mit 62,1 bzw. 26,1 pro 100.000 Männer respektive Frauen wesentlich höher als beispielsweise in Westeuropa (12,8/6,6). Umgekehrt ist aber die mittlere Überlebensrate in Japan — bedingt durch umfangreiche Früherkennungsmaßnahmen — mit 52% weltweit die günstigste. Das Risiko, an Magenkrebs zu erkranken, ist in den letzten Jahrzehnten beständig gesunken: 2002 lag die durchschnittliche weltweite Inzidenzrate mit 22,0 bzw. 10,3/100000 Männer/Frauen um ca. 15% niedriger als im Jahre 1985 [119]. Höchstwahrscheinlich kann diese Entwicklung der rückläufigen Inzidenz der *H. pylori*-Infektion in jüngeren Generationen zugeschrieben werden, die durch bessere hygienische Bedingungen und günstigere Wohnverhältnisse bedingt ist [138]. Dennoch erlangt das Magenkarzinom seine Bedeutung weniger durch die Inzidenz als durch die schlechte durchschnittliche Überlebensrate, die seit 1990 lediglich um 4 Prozentpunkte von 21% auf heute 25% gestiegen ist [120]. Daher ist ein grundlegendes Verständnis der Karzinogenese des Magens ein erstrebenswertes Ziel.

### Risikofaktoren

Die regionalen Unterschiede in der Inzidenz des Magenkarzinoms deuten darauf hin, dass Umwelteinflüsse eine Rolle bei seiner Entstehung spielen. Bereits Anfang der achtziger Jahre wurde festgestellt, dass Menschen profitieren, wenn sie aus Gebieten mit hohem Karzinomrisiko in solche mit niedrigem Risiko migrieren [101]. Später zeigte sich, dass das Erkrankungsrisiko von Migranten stärker von den Umwelteinflüssen im Jugendalter bestimmt wird als von späteren Einflüssen [18]. Heute weiß man, dass die Ernährungs-

gewohnheiten einen deutlichen Einfluss auf die Karzinogenese im Magen haben: Hoher Salzgehalt der Nahrung oder hoher Gehalt an Nitraten/Nitriten, beispielsweise in Pökelfleisch, ist mit einem erhöhten Karzinomrisiko assoziiert [117]. Das Gleiche gilt generell für den Konsum von Fleisch [42]. Ebenso wird das Risiko durch Tabakrauchen deutlich erhöht, kann durch Abstinenz jedoch wieder verringert werden [41]. Protektiv hingegen wirkt der Konsum von frischem Obst und Gemüse durch die enthaltenen Antioxidantien [43].

Mit der (Wieder-) Entdeckung von *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) durch Marshall und Warren im Jahre 1984 [98] ist ein weiterer ätiologischer Faktor für das Magenkarzinom hinzugekommen. Verschiedene Studien haben *H. pylori* eindeutig mit der Karzinogenese des Magens in Verbindung gebracht [147, 158]: Abhängig unter anderem von Virulenzfaktoren des Erregers wurde ein 3 bis 30fach erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines Karzinoms bei Infektion mit dem Erreger beobachtet [8, 30]. Bereits in den neunziger Jahren wurde durch mehrere sero-epidemiologische Fall-Kontroll-Studien ein eindeutiger Zusammenhang zwischen *H. pylori* und dem Magenkarzinom hergestellt [36, 110, 124, 151]. Dies veranlasste die WHO (World Health Organization) 1994, *H. pylori* als Typ-I-Karzinogen (gesichertes Karzinogen) zu klassifizieren [61]. Seither wurden zahlreiche Studien zur Rolle von *H. pylori* bei der gastralen Karzinogenese durchgeführt und durch Metaanalysen umfassend ausgewertet: Der IARC zufolge beträgt demnach das odds ratio, durch die Infektion mit *H. pylori* an einem Magenkarzinom zu erkranken, im weltweiten Mittel *mindestens* 2,97 (95% KI 1,98–2,81) [122]. In den meisten dieser Studien wird das Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines Magenkarzinoms durch serologischen Nachweis spezifischer IgG-Antikörper bestimmt. Da die Infektion und damit auch die spezifischen Immunglobuline mit fortschreitender Atrophie der Magenschleimhaut häufig verschwinden, wurde das mit *H. pylori* assoziierte Karzinomrisiko daher höchstwahrscheinlich deutlich unterschätzt. Studien, die diesen Umstand anhand verfeinerter Nachweismethoden berücksichtigten, ergaben, dass *H. pylori* das Risiko, an einem Magenkarzinom zu erkranken, um das 5 bis 8-fache steigert. Vernachlässigt man die Kardiakarzinome, die mit der *H. pylori*-Infektion nicht assoziiert sind, steigt das Risiko sogar auf das 20-fache [8, 27, 68]. Damit lassen sich *mindestens* 63% aller Magenkarzinome weltweit auf *H. pylori* zurückführen [122]. Nach Eradikation des Bakteriums sinkt sowohl das Risiko, ein Magenkarzinom zu entwickeln [157, 166], als auch die Gefahr eines Rezidiv bei reseziertem Magenfrühkarzinom [156]. Außerdem ist die *H. pylori*-Infektion assoziiert mit MALT-Lymphomen (Mucosa Associated Lymphatic Tissue – Lymphome) des Magens [125]. Insgesamt ist *H. pylori* der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines Magenkarzinoms.

## Helicobacter pylori — ein kurzer epidemiologischer Überblick

Die Infektion mit *H. pylori* ist nach wie vor Gegenstand eingehender epidemiologischer Untersuchungen. Meist scheinen sich die Betroffenen bereits im Kleinkindalter zu infizieren. Studien, in denen die Prävalenz und Inzidenz der Infektion im Kindesalter untersucht wurden, zeigen ein erhöhtes Risiko für Kinder, deren Mütter oder Geschwister infiziert sind, während ein hoher Bildungsstand der Mutter sich eher positiv auswirkt [40, 170]. Trotz uneinheitlicher Datenlage erhärtet sich zunehmend der Verdacht, dass *H. pylori* häufig intrafamiliär und möglicherweise oft von der Mutter auf ihre Kinder übertragen wird: Genetisches Fingerprinting zeigte in einigen Studien, dass Kleinkinder häufig mit demselben *H. pylori*-Stamm infiziert sind, der in der Familie vorherrscht [137] beziehungsweise mit dem die Mutter infiziert ist [77]. Ein erhöhtes Infektionsrisiko besteht jedoch nicht ausschließlich in der Kindheit: So haben beispielsweise Angestellte in medizinischen Berufen, die mit *H. pylori*-infizierten Patienten in Kontakt kommen, ein erhöhtes Risiko der Ansteckung [155].

Bei infizierten Personen kann *H. pylori* in Mageninhalt, Stuhl, Speichel und Atemluft während des Erbrechens enthalten sein und damit insbesondere im Rahmen von Magen-Darm-Erkrankungen übertragen werden. [126].

Sowohl der fäkal-orale als auch der oral-orale Übertragungsweg ist denkbar, es ist allerdings nicht geklärt, welcher der wesentliche ist. *H. pylori*-DNA ist umso häufiger in Wasserquellen und Abwässern nachzuweisen, je höher der fäkale Verschmutzungsgrad ist [131] und die Assoziation der *H. pylori*-Infektion mit fäkal-oral übertragenen Krankheitserregern wie Hepatitis A Virus, *Giardia lamblia* und *Salmonella typhi* [105, 161] spricht für eine fäkal-orale Übertragung zumindest unter schlechten sanitären Bedingungen. Der Nachweis *H. pylori*-spezifischer DNA in der Mundhöhle dyspeptischer Patienten [142] und die Korrelation mit schlechter Mundhygiene [1] rücken jedoch auch eine oral-orale Übertragung in den Bereich des Möglichen. Wahrscheinlich spielen beide Übertragungswege in Abhängigkeit unterschiedlicher hygienischer Standards eine Rolle. Generell ist das Risiko, mit *H. pylori* infiziert zu werden, deutlich höher, wenn die sozio-ökonomischen Rahmenbedingungen schlecht sind [12]. So liegt die Infektionsrate bei Kindern in entwickelten Ländern unter 5%, in Entwicklungsländern jedoch häufig über 50% [34].

### 1.1.2 Histopathologie des Magenkarzinoms

Das Magenkarzinom wird nach Lauren histologisch in zwei Subtypen unterschieden [82]: Der intestinale Typ zeigt je nach Differenzierungsgrad ein mehr oder weniger kontinuierliches, glanduläre Strukturen bildendes Wachstumsmuster und wird daher häufig auch als der differenzierte Typ bezeichnet. Der diffuse Typ hingegen wächst infiltrierend, schlecht differenziert und diskontinuierlich. Weist ein Karzinom glanduläre Differenzierung in

Kombination mit einer diffusen Komponente auf, spricht man vom sogenannten Mischtyp. Epidemiologisch unterscheiden sich der intestinale und der diffuse Typ in ihrer geographischen Verteilung, dem Lebensalter der Betroffenen, der Geschlechtsverteilung und der Letalität: Das intestinale Magenkarzinom betrifft häufiger ältere Menschen, bevorzugt das männliche Geschlecht und tritt vor allem in Risikogebieten mit hoher *H. pylori*-Durchseuchung auf. Der diffuse Typ hingegen ist vergleichsweise gleichmäßig geographisch verteilt, betrifft jüngere Menschen beiderlei Geschlechts und hat die schlechtere Prognose [21]. Beide Subtypen des Magenkarzinoms sind stark mit *H. pylori* assoziiert [59, 127, 158], jedoch sind Atrophie und intestinale Metaplasie anders als beim intestinalen Typ keine Voraussetzungen für die Entwicklung diffuser Magenkarzinome [127]. Interessanterweise wirkt eine *H. pylori*-Eradikationstherapie vor allem dann protektiv gegen die Entwicklung eines Magenkarzinoms, wenn sich noch keine präkanzerösen Läsionen entwickelt haben [166]. Dies unterstreicht die Bedeutung von Atrophie und Metaplasie für den intestinalen Typ und mag ein Hinweis darauf sein, dass dem intestinalen und dem diffusen Magenkarzinom distinkte Mechanismen zugrundeliegen.

Neben den histologischen Typen unterscheidet man zusätzlich nach der Lokalisation das proximale Magenkarzinom am Fundus und an der Kardie bzw. dem ösophago-gastralen Übergang und das distale Magenkarzinom, das alle anderen Karzinome distal der Kardie umfasst. In den vergangenen Jahrzehnten hat die Häufigkeit der distalen Karzinome in den entwickelten Ländern deutlich abgenommen, die der proximalen Karzinome jedoch zugenommen [21]. Wie bereits erwähnt erhöht die Infektion mit *H. pylori* das Risiko für distale Magenkarzinome deutlich. Dies gilt jedoch nicht für Kardiakarzinome: Neuere Untersuchungen zeigen, dass *H. pylori* das Risiko für proximale Karzinome signifikant reduziert (OR 0,31; 95% KI 0,11 – 0,89) [68]. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Abnahme der *H. pylori*-Durchseuchung in den entwickelten Ländern wesentlich für den Rückgang der distalen und die Zunahme der proximalen Magenkarzinome verantwortlich ist.

### 1.1.3 Mechanismen der Karzinogenese im humanen Magen

Bisher ist es nicht gelungen, die Entstehung des Magenkarzinoms befriedigend zu erklären. Dies ist unter anderem in der Vielzahl von Faktoren begründet, die bisher mit der gastralen Karzinogenese in Verbindung gebracht wurden [150]. Grundsätzlich sind Zellen, die sich im Gewebeverbund befinden, Kontrollmechanismen unterworfen, die das Zusammenspiel mit Zellen gleichen und unterschiedlichen Typs koordinieren und unkontrollierte (Dys-)Funktion verhindern sollen. Tumoren zeigen eine Tendenz zu unkontrolliertem Wachstum. Als maligne werden sie dann bezeichnet, wenn sie lokale Gewebegrenzen nicht beachten, sondern infiltrierend anstatt verdrängend wachsen, und wenn sie die Fähigkeit

besitzen, die lokale Gewebekontinuität zu verlassen und sich an anderer Stelle abzusiedeln. Zur Karzinogenese ist es also notwendig, dass Zellen eine Reihe von Kontrollmechanismen durchbrechen: Neben der Zunahme der Proliferation muss die Zelle resistent gegen Apoptose-induzierende Stimuli sein. Um beliebiges Wachstum zu ermöglichen, müssen außerdem die Mechanismen der Seneszenz — also der Zellalterung wie beispielsweise der Telomerverlust — überwunden werden. Zudem benötigt der Tumor die Fähigkeit, die Angiogenese im umgebenden Gewebe zur Eigenversorgung stimulieren zu können. Voraussetzung für die Infiltration und Metastasierung sind schließlich die Dysregulation des Zell-Zell-Kontakts und die Fähigkeit, die umgebende zelluläre Matrix verändern zu können.

Die genannten Mechanismen werden von teilweise komplex miteinander interagierenden Systemen von Zytokinen, Signalwegen, Genen und Genprodukten gesteuert und werden bisher nur unvollständig überblickt. Zwar wurden viele Faktoren und molekulare Vorgänge bereits mehr oder minder eindeutig mit der gastralen Karzinogenese assoziiert, jedoch konnte — anders als beispielsweise beim kolorektalen Karzinom — noch kein Mechanismus als zentral erkannt werden [150]. Die Heterogenität der verschiedenen histologisch und epidemiologisch unterschiedenen Typen des Magenkarzinoms deutet darauf hin, dass mehrere Mechanismen der Karzinogenese zugrunde liegen.

### **Helicobacter pylori, Inflammation und Karzinogenese**

Dass die chronische *H. pylori*-Infektion ursächlich für die Entstehung des Magenkarzinoms ist, gilt als gesichert [36, 110, 124, 151]. Bis dato wurde in *H. pylori* allerdings kein direktes Karzinogen oder Mutagen nachgewiesen. Daher liegt es nahe, andere Faktoren zur Erklärung der fakultativ karzinogenen Wirkung des Bakteriums heranzuziehen. Chronische Infektion und Inflammation scheint generell in Geweben ein Milieu zu etablieren, das der Karzinogenese förderlich oder sogar ursächlich ist: Chronische Hepatitis B/C wirkt als Auslöser für hepatozelluläre Karzinome, humane Papillomaviren sind mit dem Zervixkarzinom assoziiert, Refluxösophagitis und Colitis ulcerosa prädisponieren zum Ösophagus- beziehungsweise Kolonkarzinom. Circa 15% aller Karzinome können allein auf Infektionskrankheiten zurückgeführt werden [80]. *H. pylori* verursacht in der Magenschleimhaut eine chronische Entzündungsreaktion, die höchstwahrscheinlich die Grundlage für die Entstehung der meisten Magenkarzinome ist. Die molekularen Mechanismen, die in entzündetem Gewebe Einfluss auf die Karzinogenese nehmen, sind Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht umfassend verstanden. Am Beispiel der myeloiden Zellreihe des Immunsystems (Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten, Mastzellen), die an der Entzündungsreaktion teilnimmt, wird deutlich, dass zwischen Inflammation und Tumorentstehung/-progression eine Vielzahl an Verbindungen bestehen könnte: Myeloide

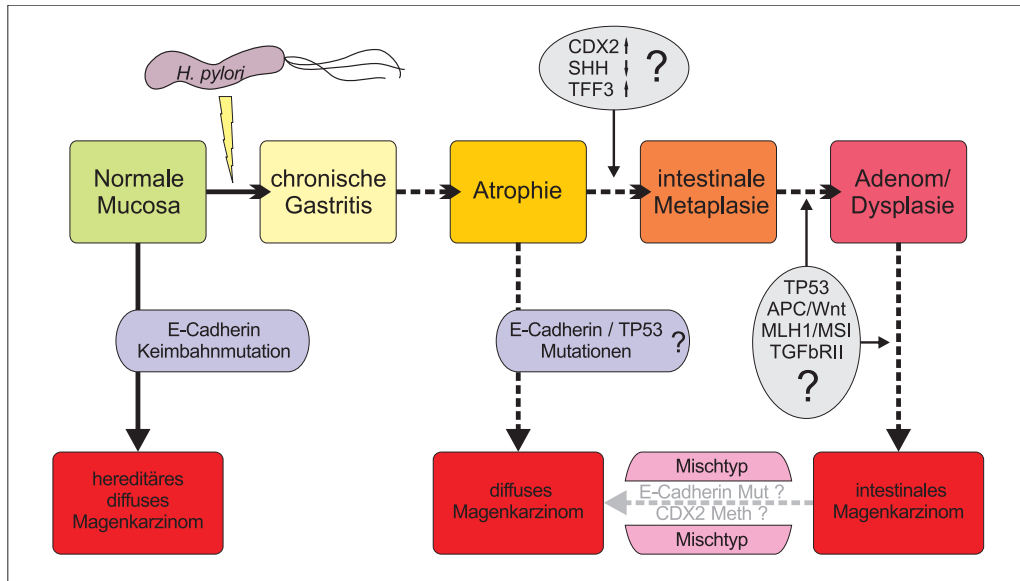
Zellen produzieren und sezernieren verschiedenste Faktoren, die auf Zellproliferation und Apoptose (z.B. TNF- $\alpha$ , IL-6, EGF, PGE<sub>2</sub> etc.), Angiogenese (VEGF, MMP-9, uPA, PGE<sub>2</sub> etc.) und Gewebsinvasion (MMP-9, TIMP, PGE<sub>2</sub>, versch. Chemokine etc.) Einfluss nehmen [171]. Außerdem bilden sie im Rahmen der Immunabwehr hochreaktive Verbindungen wie reaktiven Sauerstoff (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) [60, 93, 141], die der Abtötung bakterieller Krankheitserreger dienen. Beide verursachen aber auch DNA-Schäden und können damit Grundlage für Mutationen des Erbguts sein, die zur Karzinogenese führen [22, 79]. Da ROS und NO außerdem die Zellproliferation begünstigen und die Apoptoserate vermindern, steigen die Chancen für abnorme Zellen, weitere Veränderungen zu akkumulieren und schließlich maligne zu entarten [106].

Die Auswirkungen einer *H. pylori*-Infektion hängt wesentlich ab von verschiedenen Virulenzfaktoren des Keimes. BabA, ein Adhäsion, das an Lewis<sup>b</sup> Blutgruppenantigene auf Magenepithelien bindet und damit die Kolonisierung fördert, ist mit dem Magenkarzinom assoziiert [39]. VacA, ein von *H. pylori* sezerniertes Toxin, induziert Apoptose in Epithelzellen [20], hemmt die Antigenpräsentation [104] und die T-Zell-Aktivierung [6] und erleichtert damit die Persistenz des Keimes in der Schleimhaut. Der wohl wichtigste Virulenzfaktor von *H. pylori* ist CagA und die zugehörige Cag-Pathogenitätsinsel. Es handelt sich dabei um eine Serie von Genen, die ein Sekretionssystem codieren, das von *H. pylori* zur Injektion von bakteriellen Makromolekülen in die Epithelzellen genutzt wird. CagA induziert die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL8 aus Epithelzellen und CagA<sup>+</sup> *H. pylori*-Stämme sind mit höhergradiger Gastritis [169] und mit Magenkarzinomen assoziiert [123].

Individuelle Wirtsfaktoren nehmen ebenso Einfluss auf den Verlauf der *H. pylori*-assoziierten Gastritis. Wesentliche Faktoren sind dabei die individuelle Kapazität zur Säureproduktion und die Stärke der Immunreaktion. Unterschiede ergeben sich beispielsweise durch die Masse an vorhandenen Belegzellen, die die Säuresekretionsleistung des Magens bestimmt. Ebenso wird das Ausmaß der möglichen Säureproduktion durch Polymorphismen etwa in den Genen für IL-1 $\beta$  und IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA) modifiziert [28, 132]: IL-1 $\beta$  wirkt als äußerst potenter Säuresuppressor, und Polymorphismen, die mit einer gesteigerten Ausschüttung verbunden sind, sind mit einem erhöhten Magenkarzinomrisiko assoziiert [29]. Ähnliches gilt für genetische Polymorphismen von TNF- $\alpha$ , der auch als Säuresuppressor wirkt [28]. Wirtsfaktoren und Virulenzfaktoren des Keimes wirken dabei synergistisch auf die Steigerung des Risikos [133].

## Molekulare Karzinogenese im Magen

Wie bereits dargelegt existieren zwei histologisch distinkte Typen des Magenkarzinoms: der intestinale Typ, der vergleichsweise geordnetes Wachstum zeigt und intestinale Drü-



**Abbildung 1.1:** Mögliche Zusammenhänge bei der Karzinogenese des Magens: Durchgezogene Pfeile symbolisieren als gesichert geltende Zusammenhänge; Faktoren, deren Beteiligung an der Karzinogenese möglich, aber noch nicht gesichert ist, sind mit Fragezeichen gekennzeichnet

senstrukturen bildet, und der diffuse Typ, der sich durch ungeordnetes und infiltrierendes Wachstum auszeichnet. Die unterschiedliche Tumorbiologie lässt darauf schließen, dass beide Typen nach verschiedenen Mechanismen entstehen. Zwar existieren zur gastralen Karzinogenese mehr oder weniger fundierte Vermutungen, gesicherte Modelle wurden bisher jedoch nicht etabliert. Abbildung 1.1 soll einen knappen Überblick über mögliche Zusammenhänge bei der Entstehung des Magenkarzinoms bieten.

Insbesondere seitdem die Bedeutung der *H. pylori*-Infektion für die Karzinogenese erkannt wurde, hat sich unter anderem auf der Basis epidemiologischer Beobachtungen eine (nicht vollständig gesicherte) Modellvorstellung für die Entstehung des intestinalen Magenkarzinoms entwickelt: Die Infektion mit *H. pylori* führt zu einer in der Regel lebenslangen, in der Mehrzahl der Fälle asymptomatischen Gastritis. Bei 10–15% der Betroffenen treten jedoch im Verlauf gastro-duodenale Ulzera, bei circa 1% Adenokarzinome des Magens auf [31]. Seit längerem ist bekannt, daß *H. pylori*-infizierte Menschen, bei denen es zur Hyperchlorhydrie (erhöhte Säuresekretion) und der Entstehung von Duodenalulzera kommt, seltener Magenkarzinome entwickeln als andere *H. pylori*-Infizierte [49, 158]. Umgekehrt ist die verminderte Säuresekretion (Hypochlorhydrie) assoziiert mit einem erhöhtem Karzinomrisiko [19]. Dieses epidemiologische Phänomen führte zu der Annahme, dass die Säuresekretion des Magens eine wichtige Rolle bei der unterschiedlichen Entwicklung der verschiedenen *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen spielt. *H. pylori* infiziert aufgrund des höheren pH-Werts zunächst die Schleimhaut des Magenanschlusses.

Hier entwickelt sich eine Gastritis, die durch eine Stimulation der antralen Gastrinproduktion [23] zu einer erhöhten Säureproduktion des Korpus führen kann. Über den weiteren Verlauf der Erkrankung entscheidet nun unter anderem die individuelle Fähigkeit des Magens zur Säureproduktion: Ist diese ausreichend hoch, schützt der niedrige pH-Wert den Korpus vor Kolonisierung durch *H. pylori*, erhöht aber auch das Risiko für die Entstehung von säureinduzierten Duodenalulzera [100]. Kommt es jedoch aufgrund unzureichender Säureproduktion zur Ausweitung der Gastritis auf den Magenkorpus, führt die lokale Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und potenten Säuresekretionshemmern wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  zur Hypochlorhydrie. Im Sinne einer Selbstverstärkung durch günstigere Bedingungen für das Bakterium hat dies wiederum die Chronifizierung der Korpusgastritis und im längeren Verlauf die Atrophie der Korpusmucosa zur Folge [28].

Der intestinale Typ des Magenkarzinoms ist eindeutig mit intestinaler Metaplasie als Vorläuferläsion assoziiert [127]. Intestinale Metaplasie entwickelt sich aus atrophischer Gastritis, wobei noch nicht vollständig verstanden ist, welche molekularen Mechanismen dem zugrundeliegen. Vielversprechend sind Untersuchungen zu CDX2, einem Homeobox-Gen, das maßgeblich an der Regulation der ortsspezifischen Gewebedifferenzierung beteiligt ist. Die Transkriptionsfaktoren CDX1 und CDX2 bewirken die Differenzierung des Dick- bzw. Dünndarmepithels zum jeweils spezifischen Phänotyp und sind im gesunden Magenepithel nicht exprimiert. In Mäusen bewirkt die ektopische Expression von CDX2 im Magen die Bildung von intestinaler Metaplasie [143], und im menschlichen Magen ist CDX2 in metaplastischen Zellen hochreguliert [3]. Als Auslöser für die Intestinalisierung der Magenschleimhaut ist auch ein Verlust des Signalproteins SHH denkbar: SHH<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickeln intestinale Metaplasie [134], und obwohl SHH beim Menschen normalerweise in Fundusdrüsen exprimiert wird, fehlt es im metaplastischen Gewebe [10]. Ebenfalls diskutiert werden derzeit Proteine der TFF-Familie, deren physiologische Bedeutung in der Unterstützung der Heilung nach Epithelschädigung liegt [70]. TFF3 (ITF) ist ein säurestabiles Protein, welches normalerweise nur in Dün- und Dickdarm exprimiert und durch Verletzung der Mucosa induziert und ausgeschüttet wird [153]. Beim Menschen wird TFF3 allerdings auch in intestinaler Metaplasie des Magens gefunden und ist auch in Magenkarzinomen exprimiert. Die Expression von TFF1, welches physiologischerweise im Magen gebildet wird, fällt hingegen beim Übergang von Metaplasie in Dysplasie ab [153]. Insbesondere die Tatsache, dass sich Veränderungen der TFF-Expression schon vor dem Auftreten histologischer Alterationen beobachten lassen, lässt vermuten, dass diese Proteine bei der Entstehung der intestinalen Metaplasie eine grundlegende Rolle spielen.

Im Vergleich zum diffusen Typ behält das intestinale Magenkarzinom trotz seines malignen Wachstums meist einen vergleichsweise hohen Differenzierungsgrad bei und bildet relativ geordnete Drüsenstrukturen. Der Schluss liegt nahe, dass dieser Karzinomtyp aus intestinaler Metaplasie über die Deregelung der Zellproliferation und die Bildung von



dysplastischen Zellen hervorgeht. Auch in diesen Vorgang könnte CDX2 involviert sein, da gezeigt wurde, dass das Protein das Zellwachstum hemmt und die Differenzierung fördert [15]. Daher könnte die aus der intestinalen Metaplasie resultierende gesteigerte Expression von CDX2 im intestinalen Magenkarzinom wesentlich für dessen gute Differenzierung sein und ihr Verlust bei fortschreitender Karzinogenese die zunehmende Entdifferenzierung im Verlauf erklären [173].

Das diffuse Magenkarzinom ist, sofern nicht hereditärer Ursache, mit der *H. pylori*-Infektion und der resultierenden atrophischen Gastritis assoziiert [59, 127, 158], konnte jedoch bisher nicht mit einer eindeutigen Vorläuferläsion in Verbindung gebracht werden. Eine Modellvorstellung postuliert den Verlust der CDH1-Expression als Ursache für invasives Wachstum in frühen Stadien der Karzinogenese [13]. Dessen Genprodukt, das E-Cadherin, ist ein membranständiges Ankerprotein und für den Zell-Zell-Kontakt notwendig. Da E-Cadherin eine Bindungsstelle für  $\beta$ -Catenin besitzt, kommt es zudem über Interaktion mit dem WNT-Signalweg zur Beeinflussung der Zellproliferation [16].

Ein geringer Teil der diffusen Magenkarzinome entsteht auf der Grundlage erblicher Erkrankungen: In einigen Familien des Maori-Stammes in Neuseeland und mittlerweile auch in zahlreichen Familien anderen ethnischen Hintergrunds wurden Mutationen des E-Cadherins entdeckt. Die CDH1-Keimbahnmutation wird autosomal dominant vererbt und prädisponiert mit einer Penetranz von über 70% zum Magenkarzinom [38, 45]. Außerdem neigen weibliche Betroffene vermehrt zur Entwicklung von Mammakarzinomen [128]. Oft treten Magenkarzinome auch im Rahmen monogenetisch vererbter Erkrankungen wie dem hereditären nicht-polypösen Colocarcinom (HNPCC), der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), dem Li-Fraumeni-Syndrom und dem Peutz-Jeghers-Syndrom auf [11, 55, 148].

Eine ganze Reihe weiterer Faktoren wurden mit der Entstehung von Magenkarzinomen in Verbindung gebracht: In mehr als der Hälfte aller Magenkarzinome vom intestinalen und diffusen Typ kann der Verlust des Tumorsuppressors TP53 nachgewiesen werden [73]. Analog zum Kolonkarzinom finden sich beim intestinalen Magenkarzinom in einem Teil der Fälle Mutationen in APC (Adenomatöse Polyposis Coli) und CTNNB1 ( $\beta$ -catenin) [83]. Veränderungen im TGF- $\beta$ -Signalweg (transforming growth factor beta), die Epithelzellen weniger empfindlich gegenüber dem proliferationshemmenden Effekt des Zytokins machen, sind mit dem Magenkarzinom assoziiert [118]. Mutationen im TGF- $\beta$ -Typ II-Rezeptor werden hier häufig beobachtet, und auch der Einfluss des in dieser Arbeit untersuchten RUNX3 auf den TGF- $\beta$ -Signalweg wird diskutiert [65]. Wie bei anderen gastrointestinalen Tumoren wird auch beim Magenkarzinom Mikrosatelliteninstabilität (MSI) beobachtet: Mikrosatelliten sind repetitive kurze DNA-Sequenzen bis 10 Basenpaare pro Repeat, die aufgrund ihrer Struktur anfällig für Veränderungen in der Anzahl der Wiederholungen sind. Da dies normalerweise durch DNA-Reparaturmechanismen weitestgehend

verhindert wird, weisen deutliche Veränderungen der Mikrosatelliten–DNA auf Defekte des Reparaturapparats hin. Diese Instabilität ist bei Magenkarzinomen meist auf die Down–Regulation des Reparaturgens hMLH1 zurückzuführen [46] und eher mit dem intestinalen Typ assoziiert [159].

### **Stammzellen und Karzinom–Stammzellen**

Die Vermutung, dass Gewebestammzellen den Ausgangspunkt der Tumorigenese bilden könnten, ist keineswegs neu: Rudolf Virchow formulierte bereits 1855 seine Theorie, Tumoren entstünden aus Resten embryonalen Gewebes, da dieses histologische Gemeinsamkeiten mit Tumorgewebe aufweist [160]. Seit langem besteht die Erkenntnis, dass die meisten Tumoren klonalen Ursprungs sind [35, 47], sich also aus einer Vorläuferzelle durch fortlaufende Zellteilung entwickeln. Ebenso ist bekannt, dass sie, obwohl klonalen Ursprungs, heterogen aufgebaut sind, also aus Zellen mit unterschiedlichen Phänotypen bestehen [51]. Es wurde für verschiedene maligne Tumore gezeigt, dass nur ein geringer Anteil der Zellen eines Tumors tatsächlich die Fähigkeit hat, eigenständig zu proliferieren und neue Tumorkolonien zu formen [111]. Der erste Nachweis einer Tumorstammzelle wurde für die humane akute myeloische Leukämie (AML) erbracht: Nur eine distinkte, sehr kleine Subpopulation der Leukämiezellen hat das Potential, die AML in immundefiziente Mäuse zu übertragen, während der Großteil nicht dazu befähigt ist [7]. In der Folge wurden Tumorstammzellen für das Mammakarzinom [25], Glio–/Medulloblastome [144], das Prostatakarzinom [168] und das Bronchialkarzinom [72] nachgewiesen.

Diese Beobachtungen bilden die Basis für die Stammzelltheorie der Karzinogenese: Stammzellen sind definiert als Zellen, die sich selbst durch fortwährende Selbsterneuerung erhalten können und zu verschiedenen reifen Zellen mit distinkten Funktionen ausdifferenzieren können. Organspezifische Stammzellen sorgen für die Regeneration und den Zellersatz nach Organschädigung durch Verschleiß oder Verletzung. In diesem Sinne kann ein Tumor als aberrantes Organ betrachtet werden, in dem Tumorstammzellen für Proliferation und Metastasierung sorgen, während die ausdifferenzierten Tumorzellen strukturbildend sind.

Grundsätzlich könnten verschiedene Zelltypen als Reservoir für die Entstehung von Tumorstammzellen in Frage kommen [135]: Differenzierte, gewebespezifische Zellen könnten durch genetische Fehlregulationen (Mutationen oder epigenetische Mechanismen) immortalisiert werden und in unkontrollierte Proliferation übergehen. Da differenzierte Zellen relativ kurzlebig sind, müssten sich genetische Alterationen jedoch in vergleichsweise kurzen Zeiträumen vollziehen. Gewebeständige Stammzellen hingegen sind langlebiger und verfügen per se über das Potential zur Unsterblichkeit. In der Transformation zu Tumorstammzellen müsste diese Fähigkeit also nicht erst reaktiviert werden und die zur

malignen Entartung nötigen Modifikationen könnten sich über längere Zeiträume etablieren. Zudem könnte die relative Resistenz von Stammzellen gegen Radiochemotherapie erklären, wieso maligne Tumoren mit diesen Modalitäten zwar teilweise bis unter die radiologische Nachweisgrenze reduzierbar, jedoch nur in Ausnahmefällen kurabel sind.

Als Alternative zu gewebespezifischen Stammzellen kommen Knochenmarksstammzellen in Betracht: Es wurde bereits gezeigt, dass einwandernde Knochenmarksstammzellen in verschiedensten Geweben zur Regeneration beitragen [50, 78] und damit auch als Zellpool für die Karzinogenese zur Verfügung stehen. Houghton et al. haben gezeigt, dass in Mäusen mit chronischer *Helicobacter felis*-assoziiertes Gastritis Stammzellen aus dem Knochenmark in die Magenschleimhaut einwandern und diese rekonstituieren [56]. Hierzu wurde weiblichen Mäusen nach Knochenmarksablation das Knochenmark männlicher Mäuse transplantiert und die männlichen Knochenmarkstammzellen in der Magenmucosa nachgewiesen. Nach 20 Wochen entstanden erst nur aus transplantierten Zellen bestehende Magendrüsen und nach einjähriger Infektion entwickelten die Versuchstiere nach Metaplasie und Dysplasie auch Magenkarzinome, die aus den eingewanderten Stammzellen hervorgingen. Interessanterweise führten durch Kälte oder Essigsäure provozierte Ulzerationen nicht zur Migration von Knochenmarksstammzellen, sondern wurden lokal regeneriert. Dies könnte die Assoziation der Magenkarzinome vom intestinalen Typ mit chronischer Inflammation erklären: Insbesondere die chronische Entzündung eines Gewebes resultiert — ähnlich dem Homing von Immunzellen — in einer Migration von Stammzellen aus dem Knochenmark, die möglicherweise aufgrund ihrer inhärenten Plastizität weniger resistent gegen den ausgeübten inflammatorischen Stress sind als gewebeständige spezialisierte Zellen. Wie dieses Homing gesteuert wird und nach welchen Mechanismen sich die Stammzellen in das Zielgewebe integrieren, ist derzeit Gegenstand der Forschung [57].

## 1.2 Der Transkriptionsfaktor RUNX3

### 1.2.1 Transkriptionsfaktoren aus der Runt-Familie

Die RUNX-Gene der Säugetiere kodieren für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, deren Namensgebung auf den Transkriptionsfaktor RUNT aus *Drosophila melanogaster* zurückgeht. Bevor erkannt wurde, dass es sich um phylogenetisch verwandte Gene handelt, wurden einzelne Mitglieder der Familie in verschiedenen Spezies und unterschiedlichen Zusammenhängen untersucht und dementsprechend unterschiedlich benannt. Die daraus entstehende Vielfalt an Bezeichnungen [164] wird in Tabelle 1.1 auf der nächsten Seite aufgeführt, im Folgenden wird jedoch stets die RUNX-Nomenklatur verwendet.

Die wesentliche Gemeinsamkeit der RUNX-Transkriptionsfaktoren ist die sogenannte

Bezeichnung	Alternative Bezeichnungen		
RUNX1	CBFA2	AML1	PEBP2 $\alpha$ B
RUNX2	CBFA1	AML3	PEBP2 $\alpha$ A
RUNX3	CBFA3	AML2	PEBP2 $\alpha$ C

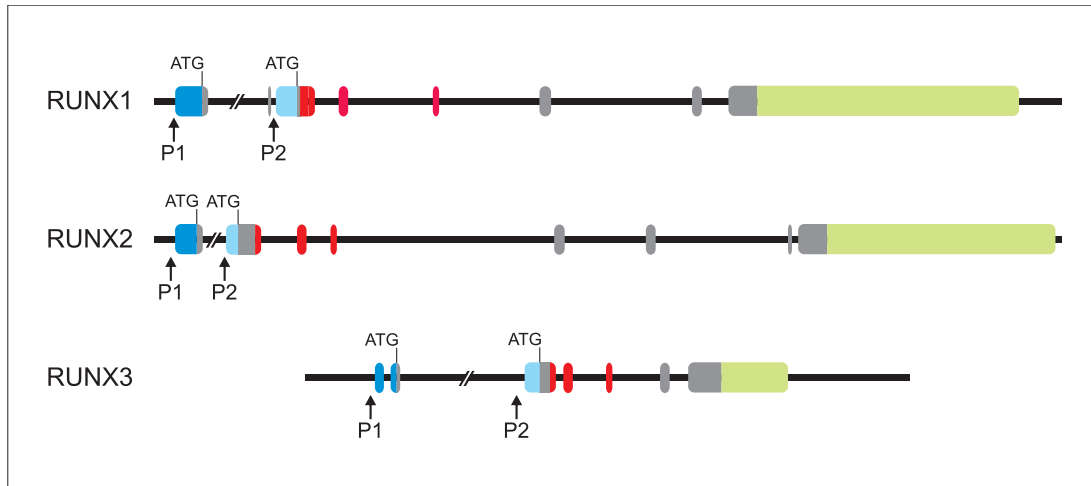
**Tabelle 1.1:** Verschiedene Bezeichnungen für Gene der RUNX-Familie: *Runt-related transcription factor (RUNX)*, *core binding factor alpha (CBFA)*, *acute myelogenous leukemia factors (AML)*, *polyoma enhancer-binding proteins 2 $\alpha$  (PEBP2 $\alpha$ )*

Runt-Domain (RD): Sie vermittelt sowohl die Bindung an die DNA-Zielsequenz als auch die Interaktion mit dem Ko-Faktor *core binding factor beta (CBFB)* [64]. Die RD findet sich hochkonserviert in verwandten Proteinen der Spezies *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und diverser Wirbeltiere [91]. Ausgehend vom ältesten Mitglied RUNX3 hat sich in Wirbeltieren durch Genduplikation [136] eine Familie von drei Transkriptionsfaktoren gebildet, deren RD eine Sequenzhomologie von über 90% aufweist [129]. Neben der RD ist auch die Genstruktur aller Mitglieder der Genfamilie ähnlich: Jedes besitzt zwei distinkte Promoterregionen, die jeweils selbst Bindungssequenzen für RUNX enthalten und damit die Möglichkeit einer Kreuzregulation bieten. Außerdem sind allen drei RUNX-Genen die benachbarten Gene *CLIC* und *DSCR* erhalten geblieben [92]. Eine Übersicht über die Genstruktur der humanen RUNX-Gene bietet [Abbildung 1.2 auf der nächsten Seite](#). In den folgenden Abschnitten beziehen sich alle Aussagen — sofern nicht explizit anderweitig angegeben — auf die RUNX-Transkriptionsfaktoren der Säugetiere.

### Funktion der RUNX-Transkriptionsfaktoren

Die RUNX-Transkriptionsfaktoren binden über die RD an die allen Mitgliedern gemeinsame Konsensussequenz 5'-PyGPyGGT-3'. Die Heterodimerisation mit dem Ko-Faktor *core binding factor beta (CBFB)* erhöht die Bindungsaffinität, stabilisiert den Gesamtkomplex und verhindert eine Ubiquitylierung [58], was Möglichkeiten der RUNX-Regulation über *CBFB* eröffnet [130]. RUNX kann die Transkription am Zielpromoter sowohl aktivieren (z.B. via Interaktion mit SMAD, AP1, STAT, CEBP) [64] als auch über die Rekrutierung von Ko-Repressoren wie *TLE (transducin-like enhancer-of-split)* unterdrücken [88]. Diese Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wird durch die RD und/oder durch den C-Terminus der RUNX-Proteine vermittelt.

Zahlreiche mögliche Zielgene, insbesondere aus den Bereichen der Hämatopoese und Osteogenese, wurden bisher identifiziert, viele Zusammenhänge müssen jedoch noch durch weiterführende Untersuchungen gesichert werden [116]. Obwohl die RUNX-Transkriptionsfaktoren dieselbe Zielsequenz binden, haben sie distinkte Wirkungen: Experimente an Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass sie Zelltyp-spezifische Aufgaben ausüben:



**Abbildung 1.2:** Struktur der humanen RUNX-Gene: distale Promoterregion (P1), proximale Promoterregion (P2), Initiatorcodon (ATG); Exons grau, Exons der Runx-Domäne (RD) rot, P1-5'UTR dunkelblau, P2-5'UTR hellblau, 3'-UTR grün

RUNX1-defiziente Mäusembryonen sind nicht zu erythroider und myeloider Hämatopoese fähig und versterben im Alter von ca. 12 Tagen [112]. RUNX2<sup>-/-</sup>-Mäuse hingegen versterben kurz nach der Geburt an Atemversagen und sind wegen fehlender Osteoblasten-Differenzierung unfähig, Knochenmatrix zu bilden [115]. Für RUNX3 wurde gezeigt, dass Knockout-Mäuse unter Entwicklungsstörungen von Neuronen der Rückenmarks-Hinterwurzel und sukzessive unter schwerer Ataxie leiden [62, 89] und dass RUNX3 essentiell für die Entwicklung CD8-positiver Zellen in der Thymopoese ist [167]. Diese Selektivität einzelner RUNX-Proteine für bestimmte Funktionen scheint nicht durch spezifische Promoter der Zielgene bedingt zu sein, da die RUNX-Proteine zumindest *in vitro* in ihrer Funktion teilweise austauschbar sind [116]. Ob dies auch *in vivo* zutrifft, wurde bisher nicht ausreichend untersucht. Wahrscheinlich ist, dass die Funktionsselektivität unter physiologischen Bedingungen durch gewebespezifische Expression der RUNX-Proteine realisiert wird, wobei je nach Zelltyp nur eines oder mehrere gleichzeitig exprimiert sein können [87]. Funktionsunterschiede resultieren auch aus differierenden C-Termini der RUNX-Proteine, deren Bindungsfunktion für Ko-Faktoren nur eingeschränkt zwischen den RUNX-Transkriptionsfaktoren austauschbar sind [37].

Seit einiger Zeit werden RUNX-Proteine als Bestandteil des TGF $\beta$ /BMP/SMAD-Signalwegs betrachtet [103]: Interaktion von RUNX3 und SMAD2/SMAD3 ist notwendig zur TGF $\beta$ -abhängigen Induktion der Immunglobulin-Klassenumschaltung zu IgA in B-Lymphozyten [48] und SMAD1/SMAD5 vermittelt gemeinsam mit RUNX2 die BMP-abhängige Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoblasten [84]. Da TGF $\beta$  als potenter

Inhibitor der Zellproliferation wirkt [103], könnte die Beteiligung der RUNX-Transkriptionsfaktoren an diesem Signalweg eine Verbindung zur Karzinogenese darstellen.

### 1.2.2 RUNX3 und Karzinogenese

RUNX-Transkriptionsfaktoren wurden auch beim Menschen bereits mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert: Mutationen und Haploinsuffizienz des RUNX2-Gens sind verantwortlich für Cleidocraniale Dysplasie [108]. RUNX1 ist eines der häufigsten Zielgene für chromosomale Translokationen in leukämischen Erkrankungen [44] und für ca. 30% aller akuten Leukämien verantwortlich [95].

RUNX3 wurde erstmals durch Experimente mit Knockout-Mäusen mit Karzinogenese in Verbindung gebracht: Li et al. stellten fest, dass RUNX3<sup>-/-</sup>-Mäuse neben den oben beschriebenen Einschränkungen eine deutliche Hyperplasie der Magenmucosa aufweisen, und daher in der Regel am ersten Tag nach Geburt aufgrund von Mangelernährung versterben [94]. Die Autoren wiesen nach, dass RUNX3<sup>-/-</sup>-Epithelzellen dieser Mäuse unempfindlicher gegenüber des Apoptose-induzierenden Effekts des Wachstumsfaktors TGF $\beta$  sind, und zogen daher die Möglichkeit in Betracht, es könne sich bei RUNX3 um einen Tumorsuppressor handeln. Gestützt wird diese Annahme durch Untersuchungen anderer Autoren, die zeigten, dass die RUNX3-Expression in humanen Magenkarzinomen häufig durch Promoter-Hypermethylierung unterdrückt wird [109, 114, 139]. Außerdem konnte *in vitro* durch die exogene Expression von RUNX3 in Tumorzelllinien deren Wachstum gehemmt und *in vivo* deren Tumorigenität und Metastasierungsfähigkeit vermindert werden [162].

Allerdings wird eine mögliche Funktion von RUNX3 als Tumorsuppressor kontrovers diskutiert: Levanon et al. erzeugten ebenfalls RUNX3-Knockout-Mäuse, jedoch mit anderem genetischen Hintergrund (ICR und MF1 statt C57/BL6). Bezüglich der beeinträchtigten Thymopoiese [152, 167] und Rückenmarks-Neurogenese [62, 89] zeigten beide Knockouts gleiche Phänotypen. Eine bereits bei Geburt bestehende Hyperplasie der Magenmucosa konnte jedoch von Levanon et al. nicht beobachtet werden: Die Mäuse verstarben nicht kurz nach Geburt, sondern überlebten bis zu 2 Jahre. 80% der Tiere entwickelten ab einem Alter von acht Monaten eine Hyperplasie der Magenschleimhaut, jedoch keine Magenkarzinome [9]. Interessanterweise kamen beide Autoren zu unterschiedlichen Ergebnissen, was das Expressionsmuster von RUNX3 angeht: Li et al. konnten in ihren (durch LacZ-Insertion generierten) Knockouts mittels LacZ-Färbung und In-Situ-Hybridisierung die Expression von RUNX3 in Magenepithelien erkennen [94]. Die von Levanon et al. erzeugte Knockout-Maus hingegen exprimiert RUNX3 nicht im Magenepithel [9, 87, 90]. Die Unterschiede im Expressionsmuster erklären damit die Beobachtungen bezüglich des Phänotyps der Magenschleimhaut. Ähnlich widersprüchliche Ergebnisse liegen auch für

die RUNX3-Expression in humaner Magenmucosa vor: Einige Autoren konnten immunhistochemisch RUNX3-Protein in Epithelzellen des Magens nachweisen [63, 113], während andere zeigten, dass keine Expression vorhanden ist [14].

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Transkriptionsfaktor RUNX3 erfüllt — wie auch die anderen Mitglieder der RUNX-Familie — grundlegende Aufgaben im Rahmen der Zelldifferenzierung. Im Jahr 2002 wurde er erstmals mit der Karzinogenese des Magens in Verbindung gebracht. Aufgrund von Untersuchungen an Knockout-Mäusen wurde vermutet, es könnte sich bei RUNX3 um einen epithelialen Tumorsuppressor handeln, der eine ursächliche Rolle bei der Entstehung des Magenkarzinoms spielt [94]. Andere Autoren konnten diese Beobachtungen an ähnlichen RUNX3-Knockouts hingegen nicht nachvollziehen [9]. Da sich beide Mausmodelle lediglich im Phänotyp des Magens unterscheiden, andere Auswirkungen der RUNX3-Defizienz jedoch identisch sind [62, 89, 152, 167], ist die Bedeutung von RUNX3 im Magen ungeklärt. Insbesondere ist nicht eindeutig belegt, ob RUNX3 physiologischerweise in Epithelzellen des Magens exprimiert wird, da diesbezüglich auch im Rahmen von Untersuchungen am Menschen widersprüchliche Beobachtungen gemacht wurden [14, 63, 113].

Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die RUNX3-Expression im menschlichen Magen detailliert und umfassend zu untersuchen. Anhand einer großen Patientenpopulation sollte zum einen gezeigt werden, inwieweit im Rahmen der Karzinogenese histologische Veränderungen wie Gastritis, Atrophie und intestinale Metaplasie die Expression beeinflussen. Zum anderen sollte mittels Mikrodissektion geklärt werden, ob RUNX3 in den beiden feingeweblichen Kompartimenten der Magenschleimhaut, dem Stroma und dem Epithel, unterschiedlich exprimiert wird. Um von einer Funktion als Tumorsuppressor sprechen zu können, muß ein Expressionsverlust in Karzinomen beobachtbar sein. Besonderes Augenmerk lag daher auf der Frage, ob der Transkriptionsfaktor im Magenepithel exprimiert und in malignen Epithelzellen herunterreguliert wird. Auf diesem Wege sollte geklärt werden, ob RUNX3 in der Karzinogenese des Magens die Rolle eines epithelialen Tumorsuppressors spielt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Biopsiematerial, Probengewinnung und Aufbereitung

#### 2.1.1 Patienten

Die Patientenpopulation bestand zum einen aus 105 Patienten des Klinikums Rechts der Isar, die in den Jahren 2003 bis 2005 rekrutiert wurden. Dabei handelte es sich entweder um Patienten, welche sich einer Gastroskopie in der endoskopischen Abteilung der II. Medizinischen Klinik unterzogen oder — im Falle der Patienten mit Magenkarzinom — um solche, bei denen eine Gastrektomie in der Chirurgischen Klinik des Hauses erfolgte. Zum anderen wurden in den Jahren 1996 bis 2002 weitere 114 Patienten im Rahmen der endoskopischen Routinediagnostik rekrutiert. Es wurden zu diagnostischen Zwecken Gewebeproben entnommen und dem Institut für Pathologie zur histologischen Evaluation zugeführt. Diese Proben wurden außerdem von uns für die vorliegende Arbeit herangezogen. Alle Patienten wurden vor der Entnahme von biopsischem Material über die zusätzliche Verwendung zu Forschungszwecken aufgeklärt und stimmten dem zu. Die Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München stimmte dem Forschungsvorhaben mit der Projektnummer 938/03 am 27.08.2003 zu.

#### 2.1.2 Proben zur Mikrodissektion

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben sollten sowohl histopathologisch evaluiert als auch mittels Laser Capture Microdissection (LCM) in unterschiedliche Gewebekompartimente separiert werden. Außerdem sollten die Biopsien mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht werden. Zur verlässlichen Durchführung dieser Experimente ist es notwendig, das meist nur in geringen Mengen — bei endoskopisch gewonnenen Proben meist nur Stecknadelkopfgröße — vorhandene Material zu konservieren. Dabei muss einerseits seine histologische Struktur weitestgehend erhalten bleibt und eine Autolyse und damit eine Degradation der enthaltenen Nukleinsäuren vermieden werden. Andererseits ist es wünschenswert, eben diese Nukleinsäuren trotz Konservierung möglichst wenig chemisch zu modifizieren, um die nachfolgende Untersuchung mittels PCR nicht zu beeinflussen. Die hier verwendete Formalinfixierung mit Einbettung in Paraffin wird diesen Punkten weitestgehend gerecht. Lediglich chemische Modifikationen und konsekutive



Strangbrüche der Nukleinsäuren sind unvermeidlich. Der resultierenden Beeinträchtigung der Experimente kann jedoch durch geeignete Nukleinsäure-Extraktions-Methoden und Anpassung der PCR ausreichend entgegengewirkt werden.

### **Materialeinbettung**

Zur Vermeidung von Autolyse und dem Erhalt der feingeweblichen Struktur wurde das biotisch gewonnene Material unmittelbar dem Fixierungs- und Einbettungsprozess unterzogen. Dazu wurde das Gewebe zunächst in einer Formalinlösung fixiert. Dann wurde ihm mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe Wasser entzogen und über ein Zwischenmedium (Xylol) durch Paraffin ersetzt. Folgende Stufen wurden hierfür durchlaufen:

- Formalin 4% (40 °C)
- Ethanol 70% (40 °C)
- Ethanol 96% (40 °C)
- Isopropanol (40 °C)
- Xylol (40 °C)
- Paraffin (60 °C)

Die einzelnen Arbeitsschritte führte ein Fixierungsautomat (Pathcentre, Fa. Shandon) über Nacht automatisch durch. Die solchermaßen paraffinisierten Gewebeproben wurde dann auf Kunststoffträgern in einen zur Schnittanfertigung geeigneten Paraffinblock eingegossen.

### **Anfertigung histologischer Schnittpräparate**

Die Paraffinblöcke wurden mit Hilfe eines HM 355 S Rotationsmikrotoms (MIKROM, Walldorf) geschnitten. Zu histologischen Zwecken wurden Schnitte mit 2 µm Stärke hergestellt. Für die Mikrodissektion wurde eine Schnittstärke von 10 µm gewählt. Da aus den Mikrodissektaten zudem RNA gewonnen werden sollte, wurde besonders darauf geachtet, sämtliche Arbeitsgeräte RNasefrei zu halten. Daher wurden Einweghandschuhe, Schneidmesser und Wasserbad regelmäßig gewechselt, Objektträger (SuperFrost, Menzel-Gläser, Braunschweig) einer frisch geöffneten Verpackung entnommen und Arbeitsflächen und das Mikrotom mit RNaseZap<sup>®</sup> RNase Dekontaminationslösung (Ambion, Huntingdon, UK) gereinigt.

Zur histopathologischen Evaluation wurden die Schnitte sowohl mit HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbt zur Beurteilung der Morphologie als auch mit PAS (Periodic Acid

PCR-Produkt	T <sub>m</sub>	Sequenz	
UreB (685 bp)	58 °C	FP	5'-TTCACCCCAACAAATCCCTACAG-3'
		RP	5'-ACGGCCCATCGCTTGAGAGT-3'
VacAs (259/284 bp)	56 °C	FP	5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'
		RP	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'

**Tabelle 2.1:** Primer für den *H. pylori*-Nachweis mittels PCR; die unterschiedliche Länge des Amplicons für VacAs liegt in Variationen zwischen zwei möglichen Allelen für VacAs begründet

Schiff) gefärbt zum Nachweis von Muzinen, beispielsweise in Becherzellen bei intestinaler Metaplasie. Um gleichbleibende Qualität zu gewährleisten, wurde hierfür ein Färbeautomat (MEDITE Medizintechnik, Burgdorf) eingesetzt.

### 2.1.3 Frische Magenbiopsien

Die zur Validierung der Ergebnisse aus formalinfixierten Gewebeproben herangezogenen frischen Magenbiopsien wurden endoskopisch der Antrumregion des Magens entnommen und unmittelbar nach der endoskopischen Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um eine Degradation der enthaltenen Nukleinsäuren zu verhindern. Die Gewebeproben wurden dann in gefrorenem Zustand gemörsert und der weiteren Verarbeitung zugeführt. Die RNA-Extraktion hieraus wurde analog der in Abschnitt 2.3 auf Seite 28 beschriebenen Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

### 2.1.4 Helicobacterstatus

Die Infektion mit *H. pylori* wurde sowohl histopathologisch als auch durch PCR beurteilt. Zum Nachweis mittels PCR wurden die *H. pylori*-Gene für Vakuolisierendes Zytotoxin (VacAs) und Urease B (UreB) amplifiziert. Tabelle 2.1 listet die verwendeten Primer und Annealingtemperaturen auf. Die PCR wurde analog zur Beschreibung im Abschnitt 2.4.2 auf Seite 32 durchgeführt. Der Nachweis der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese wird im Abschnitt 2.5 auf Seite 33 dargelegt.

## 2.2 Laser Capture Mikrodisektion

Mikrodisektion ist eine relativ neue Methode zur selektiven Gewinnung von Materialproben aus histologischen Schnitten im mikroskopischen Maßstab. Im Idealfall ist es möglich, einzelne Zellen beziehungsweise deren Zellmaterial selektiv aus dem umgebenden Gewebe herauszulösen und weiteren Untersuchungen zu unterziehen. Verschiedene technische Systeme, basierend auf mechanischen und/oder laseroptischen Prinzipien,

sind kommerziell verfügbar. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Laser Capture Microdissection (LCM) arbeitet gemischt laseroptisch und mechanisch. Dabei werden histologische Schnittpräparate auf herkömmlichen Objektträgern unter einem modifizierten Mikroskop bearbeitet. Ein durchsichtiger, mit einer Spezialfolie beschichteter Träger (Cap) wird auf das auf dem Objektträger haftende Zielgewebe aufgelegt. Durch gezieltes Erhitzen der Folie mit Hilfe eines Nahe-Infrarot-Lasers verschmilzt diese punktuell mit dem darunterliegenden Gewebe. Das auf diese Weise fixierte Gewebematerial kann nun gemeinsam mit dem Folienträger abgehoben werden.

### 2.2.1 Vorbereitung der Präparate

Zur besseren Differenzierung des Gewebes unter dem LCM-Mikroskop ist eine einfache histologische Färbung hilfreich. Die in dieser Arbeit untersuchten histologischen Präparate des humanen Magens wurden mit Hämatoxylin-Eosin nach Ehrlich (Sigma-Aldrich, München) gefärbt. Hierzu mussten die Schnitte entparaffiniert und mittels absteigender Alkoholreihe ins wässrige Milieu überführt werden.

Da aus den Präparaten RNA gewonnen werden sollte, war eine RNase-freie Arbeitsweise unabdinglich. Hierzu wurden alle Arbeitsflächen und -geräte, Färbebecken und Objektträgerhalter vor Benutzung mit RNaseZap<sup>®</sup> RNase Dekontaminationslösung (Ambion, Huntingdon, UK) gereinigt. Einweghandschuhe wurden regelmäßig gewechselt und alle verwendeten Reagenzien wurden aliquotiert, ausschließlich für diesen Zweck verwandt und nach Benutzung verworfen. Im Folgenden soll das Arbeitsprotokoll dargelegt werden:

- Entparaffinieren im Xylolbad für 2 x 20 min
- Überführen ins wässrige Milieu mit absteigender Alkoholreihe:
  - 100% Ethanol für 5 min
  - 90% Ethanol für 5 min
  - 70% Ethanol für 5 min
  - H<sub>2</sub>O 5 min
- Färbung durch Auftropfen von HE-Gebrauchslösung, Einwirkzeit 15–45 s
- Abspülen mit H<sub>2</sub>O
- Entwässern durch aufsteigende Alkoholreihe
- Lufttrocknen und zügige Weiterverarbeitung

Da die Schichtdicke der histologischen Präparate mit 10 µm relativ stark gewählt ist, muss die HE-Färbung dezent eingesetzt werden. Zu lange und damit starke Färbung

Tris-HCl		10 mmol/l
	pH	8,0
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)		0,1 mmol/l
	pH	8,0
SDS (Natriumdodecylsulfat)		2%
	pH	7,3
Proteinase K		2,5 g/l

**Tabelle 2.2:** Zusammensetzung des Lysepuffers zur RNA-Extraktion

kann die Erkennbarkeit des luftgetrockneten, nicht eingedeckten Gewebes während der Mikrodissektion deutlich beeinträchtigen.

### 2.2.2 Mikrodissektion der Materialproben

Die Mikrodissektion wurde mit Hilfe eines PixCell<sup>®</sup> IIE Laser Capture Microdissection Systems (Arcturus, Sunnyvale, CA, USA) durchgeführt. Dabei wurden von jeder Probe zwei konsekutive Schnitte herangezogen und jeweils Epithelzellen und Stroma disseziert. Auf die Gewinnung beider Zellpopulationen von nur einem Schnitt wurde zugunsten geringerer Kreuzkontamination verzichtet. Es wurden je nach vorhandener Probenmenge zwischen 1000 und 2000 Zellen gewonnen. Diese wurden unmittelbar nach der Mikrodissektion der weiteren Verwendung zugeführt.

### 2.2.3 Lyse der Mikrodissektate

Zur Weiterverarbeitung wurden die Mikrodissektate über Nacht bei 60 °C in 200 µl eines Lysepuffers inkubiert. Tabelle 2.2 zeigt dessen Zusammensetzung. Nach vollständiger Lyse am nächsten Tag wurde aus den Zellysaten die enthaltene RNA isoliert.

## 2.3 Ribonukleinsäureextraktion

Die Gewinnung von RNA aus biotisch gewonnenem Gewebematerial ist im Regelfall einfach zu bewerkstelligen, da verschiedenste Hersteller fertige Kits zur Nukleinsäureextraktion anbieten. Diese funktionieren meist nach dem Prinzip der Adsorption der Nukleinsäuren an eine Silicamembran in salzhaltigen Puffern und sind dafür ausgelegt, mittlere bis lange Fragmente aufzureinigen, kurze jedoch zu verwerfen. Die zur histologischen Einbettung von Biopsien nötige Behandlung mit Formaldehyd und Hitze bedingt jedoch eine Fragmentierung der Nukleinsäuren, wodurch RNA-Extraktionsmethoden nötig werden, die auch kurze Fragmente zuverlässig aufreinigen, insbesondere wenn ohnehin nur sehr geringe Materialmengen eingesetzt werden können. Daher wurde für die vorliegende Arbeit

Fällungssalz	Natriumacetat ( $C_2H_3NaO_2$ )	2 mol/l
	pH	4,5
Phenol	UltraPure Phenol:Wasser (Gibco)	3,75:1
Chloroform	Chloroform:Isoamylalkohol (Sigma)	24:1
Glycogen (Roche)		20 mg/ml
Isopropanol (Roth)		reinst
Ethanol (Roth)		70%

**Tabelle 2.3:** Reagenzien für die RNA-Extraktion

die klassische Phenol-Chloroform-Methode gefolgt von einer Isopropanol-Präzipitation für die Extraktion gewählt. Außerdem war aufgrund der im Abschnitt 3.1.1 auf Seite 48 erläuterten Problematik ein DNase-Verdau der isolierten RNA notwendig. Im Folgenden werden alle Arbeitsschritte dargelegt.

### 2.3.1 RNA-Extraktion aus Zelllysaten

Die im Abschnitt 2.2.3 auf der vorherigen Seite beschriebenen Zelllysate wurden zur RNA-Aufreinigung unmittelbar weiterverarbeitet. Tabelle 2.3 listet alle benötigten Reagenzien auf. Um die Handhabung zu erleichtern, wurde Glycogen als Co-Präzipitans für die RNA gewählt, wodurch trotz geringer Nukleinsäuremengen in allen manuellen Arbeitsschritten ein sichtbares Pellet vorzufinden war und Pipettierfehler minimiert wurden. Um die Kontamination mit RNAsen und damit die unerwünschte Degradation der RNA zu vermeiden, wurden ausschließlich RNase-freie Einwegartikel und Pipettenspitzen mit Aerosolfilter benutzt. Einweghandschuhe wurden regelmäßig gewechselt, Arbeitsflächen und -geräte mit RNaseZap<sup>®</sup> RNase Dekontaminationslösung (Ambion, Huntingdon, UK) gesäubert und sämtliche Reagenzien ausschließlich für dieses Experiment verwendet und gesondert aufbewahrt. Folgendes Arbeitsprotokoll wurde befolgt:

- gründliches Mischen von 200 µl Zelllysate, 20 µl Natriumacetat, 200 µl Phenol und 100 µl Chloroform-Isoamylalkohol in einem Reaktionsgefäß
- Zentrifugation für 5 min bei höchster Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zur Phasentrennung
- Abnehmen des wässrigen Überstands ohne die Trennschicht zu verletzen und Überführen in ein neues Reaktionsgefäß
- Zugabe von 2 µl Glycogen, 220 µl Isopropanol und Inkubation für 60 min bei -20 °C
- Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf) bei 20.800 g und 4 °C für 30 min

- Verwerfen des Überstands und Zugabe von 300 µl Ethanol (70%) unter Schonung des gebildeten Pellets, erneute Zentrifugation bei 20.800 g und 4 °C für 15 min
- Verwerfen des Überstands und Lufttrocknen des Pellets für 10 min
- Resuspension des Pellets in 20 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O

Die isolierte RNA wurde entweder bei -80 °C oder im Falle zeitnaher Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 2.3.2 DNase-Verdau

Zum DNase-Verdau der RNA-Proben wurde das Enzymkit DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Karlsruhe) verwandt. Alle benötigten Reagenzien sind in Tabelle 2.4 aufgelistet. Zur Durchführung des DNase-Verdaus wurde folgendes Arbeitsprotokoll angewandt:

- Herstellen folgenden Ansatzes auf Eis
  - 8 µl RNA-Lösung
  - 1 µl 10x Reaktionspuffer
  - 1 µl DNase I
- Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur
- Zugabe von 1 µl EDTA-Lösung
- Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65 °C

Wichtig ist, eine Degradation der eingesetzten RNA zu verhindern. MgCl<sub>2</sub> fördert die Hydrolyse des RNA-Stranges, weswegen vor der Hitzeinaktivierung EDTA als Komplexbildner zugesetzt wird. Zusätzlich empfiehlt der Hersteller des Enzymkits eine DNase-Inkubation von nicht mehr als 15 min. Nach dem Vorversuch, der im Abschnitt 3.1.1 auf Seite 49 beschrieben ist, wurde diese Inkubation jedoch über 30 min durchgeführt.

10x Reaktionspuffer	Tris-HCl	200 mmol/l
	pH	8,4
	KCl	500 mmol/l
	MgCl <sub>2</sub>	20 mmol/l
DNase I, Amplification Grade		1 U/µl
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)		25 mmol/l

**Tabelle 2.4:** Reagenzien für den DNase-Verdau

## 2.4 Polymerase–Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase–Kettenreaktion (PCR, Polymerase-chain-reaction) ist eine molekularbiologische Methode, die es erlaubt, *in vitro* geringste Mengen DNA zu vervielfältigen. Dies geschieht — wie im lebenden Organismus auch — mittels einer DNA–abhängigen DNA–Polymerase, also einem Enzym, dass zu einem als Matrize dienenden DNA–Strang einen Komplementärstrang synthetisiert. Da die DNA–Polymerase zur Initiation der DNA–Replikation das 3′–OH–Ende eines vorhandenen Stranges benötigt, um daran anzuknüpfen, kann man durch Zugabe von sequenzspezifischen DNA–Oligonucleotiden, sog. Primern, den Start- und Endpunkt der DNA–Replikation bestimmen.

Das Prinzip der PCR besteht nun darin, dass die Replikation eines zusammen mit Primern und DNA–Polymerase in Lösung befindlichen DNA–Strangs durch Veränderung der Temperatur gesteuert werden kann: Zunächst wird der gelöste DNA–Doppelstrang durch Erhitzen auf ca. 94 °C denaturiert, d.h. in zwei Einzelstränge getrennt. Durch Abkühlen der Lösung wird den zugegebenen Primern die Möglichkeit gegeben, an ihre Komplementärsequenz in der DNA zu binden, auch *Annealing* genannt. Bei welchen Temperaturen dies in optimaler Weise geschieht, richtet sich nach der Schmelztemperatur  $T_m$  und damit hauptsächlich nach der Länge und der Basenzusammensetzung der Primer (i.d.R. zwischen 55 °C und 65 °C). Zur Elongation, d.h. Polymerisation eines Komplementärstrangs, muss nun die DNA–Polymerase am Primer an den DNA–Strang binden. Dazu wird eine Temperatur eingestellt, bei der die DNA–Polymerase optimale Aktivität zeigt, je nach Polymerase meist zwischen 68 °C und 72 °C. Seit der Entdeckung thermophiler Bakterien, die bei Temperaturen von bis zu 110 °C in Tiefseeschloten und Geysiren überleben, stehen DNA–Polymerasen zur Verfügung, die thermostabil sind, d.h. während der Denaturierung der DNA nicht dauerhaft inaktiviert werden. Das am weitesten verbreitete dieser Enzyme wurde aus *Thermus aquaticus* isoliert und daher *Taq* genannt. Der Vorteil dieser Enzyme ist, dass man ein komplettes Reaktionsgemisch aus DNA, Substraten und *Taq*–Polymerase herstellen kann, um dieses dann zyklisch und vollautomatisch in einem sog. *Thermocycler* immer wieder einer Denaturierung, einer Annealing- und einer Elongationphase zu unterziehen. Dabei behält die Polymerase ihre Aktivität und verdoppelt (theoretisch) mit jedem Zyklus (in den meisten Anwendungen 20 bis 35) die durch die Primer selektierte Zielsequenz. Dadurch ergibt sich ein exponentieller Anstieg der Anzahl der gewünschten DNA–Stücke und damit die einfache Möglichkeit auch geringste DNA–Mengen zu vervielfältigen.

### 2.4.1 Primer

Die in der vorliegenden Arbeit für konventionelle PCR verwendeten Primer für das Housekeeping–Gen Glyceraldehyd–3–Phosphat–Dehydrogenase (GAPDH) sollten nur

PCR-Produkt	T <sub>m</sub>	Sequenz	
GAPDH-DNA (73 bp)	59 °C	FP	5'-GGCAGCCCCTTCATACCCT-3'
		RP	5'-GAATTTGCCATGGGTGGAATC-3'
Mastermix			
20x Reaktionspuffer		Tris-HCl, KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
		MgCl <sub>2</sub>	3 mmol/l
		pH	8,7
Desoxyribonukleotid-Mischung		dATP	400 mmol/l
		dTTP	400 mmol/l
		dGTP	400 mmol/l
		dCTP	400 mmol/l
Taq-Polymerase			5 U/μl

**Tabelle 2.5:** DNA-spezifische Primer für die konventionelle PCR und Inhaltsstoffe des verwendeten Mastermix

an genomische DNA binden können, um eine Amplifikation von aus mRNA generierter cDNA zu verhindern. Daher wurden die Primer (siehe Tabelle 2.5) so gewählt, dass sie eine Sequenz, bestehend aus dem Anfang des dritten Exons des GAPDH-Gens und dem davorliegenden Intron, binden. Da Introns nach der Transkription durch Splicing aus der mRNA entfernt werden, können die hier verwendeten Primer auf einer cDNA-Matrize nicht mehr zu einer exponentiellen Polymerase-Kettenreaktion führen. Die Primer wurden durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Sie wurden in lyophilisierter Form geliefert, mit H<sub>2</sub>O nach Herstelleranweisung auf eine Konzentration von 100 μmol/l rekonstituiert und bei -20 °C gelagert. Zum Gebrauch wurden Aliquots auf eine Konzentration von 25 μmol/l verdünnt.

#### 2.4.2 Praktische Durchführung

Für die konventionelle PCR wurde das Taq PCR Master Mix Kit (Quiagen, Hilden) verwandt. Dieses enthält einen zweifach konzentrierten Ready-to-use PCR-Mastermix mit den in Tabelle 2.5 aufgeführten Inhaltsstoffen. Zur Durchführung der PCR wurde dieser Mastermix mit Primern, H<sub>2</sub>O und einer DNA-Probe wie folgt zu einem Reaktionsansatz à 25 μl gemischt:

- 12,5 μl Taq PCR Master Mix
- je 0,5 μl Primer (25 μM)
- 2 μl DNA-Lösung



- 9,5 µl H<sub>2</sub>O

Die Amplifikation wurde mit Hilfe eines *TGRADIENT* Thermocycler (Biometra, Göttingen) nach folgendem Programm durchgeführt:

Initialzyklus	Denaturierung	5 min	95 °C
	Annealing	1 min	57 °C
	Elongation	1 min	72 °C
35 Zyklen	Denaturierung	45 s	95 °C
	Annealing	30 s	57 °C
	Elongation	30 s	72 °C
Abschluss	Elongation	10 min	72 °C

Anschließend wurden die Proben entweder umgehend weiterverarbeitet oder bei -20 °C aufbewahrt.

## 2.5 Agarose–Gelelektrophorese

Die Agarose–Gelelektrophorese dient zur Trennung und zum Nachweis von Nukleinsäurefragmenten, beispielsweise den Produkten einer PCR. Dabei erfüllt das Agarosegel die Funktion eines molekularen Siebs, durch das die DNA–Stücke im elektrischen Feld je nach Größe unterschiedlich rasch wandern und dadurch räumlich aufgetrennt werden. Nach Anfärbung der DNA — meist mit Ethidiumbromid unter UV–Licht — wird diese als Bande sichtbar. Durch Vergleich mit einem bekannten Standard kann dann die ungefähre Größe der wandernden Fragmente abgeschätzt und damit z.B. eine Erfolgskontrolle für die PCR durchgeführt werden.

### 2.5.1 Praktische Durchführung

In der vorliegenden Arbeit sollten mittels Agarose–Gelelektrophorese PCR–Amplifikate in einer Größenordnung von ca. 100 bp und von ca. 250–700 bp nachgewiesen werden. Für lange DNA–Fragmente wurde als Agarose Roti<sup>®</sup>garose MEEO Ultra Qualität (Roth, Karlsruhe) verwandt. Für kurze Amplicons wurde mit der Roti<sup>®</sup>garose High Resolution (Roth, Karlsruhe) eine Agarose ausgewählt, die besonders für geringe Fragmentlängen gute Trenneigenschaften aufweist. Tabelle 2.6 auf der nächsten Seite listet alle benötigten Reagenzien auf.

Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 2 g respektive 4 g Agarose in 100 ml Laufpuffer eingerührt, im Mikrowellenherd aufgeköcht und unter Rühren langsam auf 60 °C abgekühlt. Dann wurden 10 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und homogen vermischt.

Agarose (je nach Anwendung)	Roti <sup>®</sup> garose MEEEO Ultra Qualität	2%
	Roti <sup>®</sup> garose High Resolution	4%
1x Laufpuffer TAE	Tris	40 mmol/l
	Acetat	20 mmol/l
	EDTA	1 mmol/l
Ethidiumbromid (Merck)		1%
6x Auftragspuffer	Tris-HCl	10 mmol/l
	pH	7,6
	EDTA	60 mmol/l
	Bromphenolblau	0,03%
	Xylencyanol	0,03%
	Glycerin	60%
Standard	GeneRuler™ 100 bp (Fermentas)	0,5 µg

**Tabelle 2.6:** Reagenzien für die Agarose-Gelelektrophorese

Anschließend wurde das heiße Gel in einem horizontalen Gel-Gießstand mit Kamm in seine Gebrauchsform gegossen. Nach dem Erstarren wurde der Kamm entfernt, das Gel in eine horizontale Elektrophoresewanne (Sub-Cell GT DNA Electrophoresis Cell, BioRad, München) eingelegt und mit Laufpuffer überschichtet. Die DNA-Proben und der Standard à 15 µl wurden jeweils mit 3 µl 6x Auftragspuffer vermischt und auf das Gel aufgebracht. Die Elektrophorese wurde bei 80 V über 1 h durchgeführt. Fertige Gele wurden mit dem Molecular Imager Gel Doc XR Bilddokumentationssystem (BioRad, München) ausgewertet.

## 2.6 Klonierung von PCR-Produkten

In der vorliegenden Arbeit sollte die mRNA-Expression für die Gene RUNX1, RUNX3 und GAPDH mittels quantitativer PCR ermittelt werden. Um die Quantifizierung in Kopienzahlen angeben zu können, war es notwendig, für die zu untersuchenden mRNAs jeweils eine Standardreihe mit bekannter Kopienzahl zu erstellen und bei jeder Messung mitzubestimmen. Eine praktikable Methode, um die nötige Menge Standard-DNA zu erhalten, ist die Herstellung eines Vektor-Plasmids, das die gewünschte DNA-Sequenz enthält, und dessen massenhafte Vervielfältigung mittels *Escherichia coli*. Dieser sogenannten Klonierung liegt folgendes Prinzip zugrunde:

- Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz mittels PCR

- Einbau des PCR-Produkts (Insert) in ein Vektor-Plasmid
- Einführung (Transformation) des Plasmid-Insert-Konstrukts in *E. coli*
- Kultivierung der Bakterien und Selektion eines erfolgreich transformierten Klons
- Kultivierung dieses Klons und massenhafte Vervielfältigung des Plasmids
- Extraktion und Aufreinigung des Plasmids

Mit Kenntnis des Molekulargewichts des Plasmids kann nach photometrischer Bestimmung des DNA-Gehalts der gereinigten Plasmidlösung die Kopienzahl berechnet und eine Verdünnungsreihe hergestellt werden.

### 2.6.1 Durchführung der Klonierung

Zur Klonierung der PCR-Produkte wurde das Topo TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, Karlsruhe) und der chemisch-kompetente *E. coli* – Stamm DH5 $\alpha$  verwandt. Die benötigten Reagenzien sind in Tabelle 2.7 auf der nächsten Seite aufgeführt. Die zur Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz benutzte Taq-Polymerase fügt am 3'-Ende des PCR-Produkts einen einzelnen Desoxyadenosinrest an. Der verwendete TOPO-Vektor nutzt diesen Umstand aus und trägt an beiden Enden seiner Insertionsstelle je einen 3'-Thymidin-Überhang zur Bindung des PCR-Produkts. Zusätzlich ist eine T1-Topoisomerase kovalent an beide Thymidinreste gebunden. Nach Anlagerung des Inserts vollzieht dieses Enzym die Ligation, d.h. die kovalente Bindung an das Phosphodiester-Rückgrat des Vektors, und wird dabei selbst abgespalten. Das Vektor-Insert-Konstrukt wurde nach folgender Arbeitsanleitung hergestellt:

- 2  $\mu$ l PCR-Produkt und 1  $\mu$ l Salzlösung mischen und mit H<sub>2</sub>O auf 5  $\mu$ l auffüllen
- 1  $\mu$ l pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> Vektor hinzugeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Ligationsansatz bis zum nächsten Arbeitsschritt auf Eis lagern

Zur Transformation der chemisch-kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  waren folgende Arbeitsschritte notwendig:

- 2  $\mu$ l Ligationsansatz zu 50  $\mu$ l *E. coli* DH5 $\alpha$  – Lösung geben und durch vorsichtiges Umschwenken mischen
- Inkubation auf Eis für 15 min
- Hitze-Schock der Bakterien für 30 s bei 42 °C

Vektor-Plasmid	pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	10 ng/μl
Salzlösung f. chemisch-kompetente <i>E. coli</i>	NaCl	1,2 mol/l
	MgCl <sub>2</sub>	0,06 mol/l
S.O.C. – Medium	Trypton	2%
	Hefeextrakt	0,5%
	KCl	2,5 mmol/l
	NaCl, MgCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub>	10 mmol/l
	Glucose	20 mmol/l
LB – Medium	Trypton	1%
	Hefeextrakt	0,5%
	NaCl	1%
X-Gal		40 mg/ml
Ampicillin		50 μg/ml

**Tabelle 2.7:** Reagenzien für die Klonierung von PCR-Produkten

- sofortiges Abkühlen auf Eis
- Zugabe von 250 μl S.O.C. – Medium
- Inkubation im Schüttler bei 200 rpm und 37 °C für 1 h

Zur Selektion erfolgreich transformierter *E. coli* wurden jeweils 20 μl Bakterienlösung fraktioniert auf ampicillin- und *x-gal*-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Prinzip der Selektion beruht auf einem Ampicillin-Resistenzgen des verwendeten Vektors. Bakterienzellen, die das Plasmid aufgenommen haben, können auf den ampicillinhaltigen Nährböden wachsen, alle anderen gehen zugrunde. Ferner enthält der TOPO-Vektor ein Gen für β-Galaktosidase, das bei erfolgreicher Ligation des Inserts zerstört wird. Daher können Bakterienzellen, die wie erwünscht ein Plasmid-Insert-Konstrukt aufgenommen haben, das chromogene Substrat X-Gal nicht verstoffwechseln und verändern ihre Farbe nicht. *E. coli*, die Plasmide ohne Insert aufgenommen haben, können X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid) verwerten, verfärben sich blau und können dadurch ausgesondert werden. Die selektierten Einzelklone wurden wiederum über Nacht in 5 ml LB – Medium kultiviert, um die nötige Vermehrung der Plasmide zu erreichen.

### 2.6.2 Plasmidisolation

Die Plasmidisolation wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach folgender Arbeitsanleitung durchgeführt:

- Zentrifugation der Bakterienkultur bei 10000 g für 5 min

- Verwerfen des Überstands und Resuspension des Pellets mit mit 250 µl Puffer P1
- Zugabe von 250 µl Lysispuffer P2, vorsichtiges Mischen durch 6-maliges Umschwenken
- Zugabe von 350 µl Puffer P3, Mischen durch 6-maliges Umschwenken und Zentrifugation für 10 min bei 16000 g
- Abnehmen des Überstands, Transfer auf eine QIAprep Zentrifugations-Säule und Zentrifugation für 1 min bei 16000 g
- Waschen der Säule mit 750 µl Waschpuffer PE
- Elution der Plasmide durch Zugabe von 50 µl H<sub>2</sub>O auf die Säule, Inkubation für 1 min und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 16000 g

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Plasmid-Lösungen bei -20 °C aufbewahrt.

## 2.7 Reverse Transkription

Reverse Transkription bedeutet in Umkehrung des Vorgangs der Transkription die Synthese eines komplementären DNA-Strangs (cDNA, complementary DNA) unter Benutzung eines RNA-Strangs als Vorlage. In der Natur hat dieser Vorgang große Bedeutung bei RNA-Viren wie HIV oder HTLV, deren Genom als RNA (jedoch nicht als mRNA) vorliegt und zunächst in DNA umgeschrieben werden muss, bevor die Replikationsmechanismen der Wirtszelle genutzt werden können. Dazu enthalten diese Viren das Enzym Reverse Transkriptase (RT), auch als RNA-abhängige DNA-Polymerase bezeichnet.

Um in einer Zelle mittels PCR die Expression von mRNA messen zu können, muss diese zunächst in cDNA umgeschrieben werden, da Taq-Polymerase nur DNA amplifizieren kann. Die hierzu verwendete RT stammt ebenfalls aus RNA-Viren, im Falle der SuperScript II Reversen Transkriptase aus dem Moloney-Maus-Leukämievirus (MMLV). Das Enzym benötigt einen Primer zur Initiation der DNA-Synthese. Hier können genspezifische Primer oder unspezifische wie Oligo-d(T)-Primer (als Komplementärstrang zum Poly-A-Ende der mRNA) und Random Hexamere (sechs-Basenpaar-Oligonucleotide, die zufällig verteilt binden) zum Einsatz kommen.

### 2.7.1 Reagenzien

In der vorliegenden Studie wurden im Rahmen der Etablierung der Methoden zunächst zwei RT-Systeme miteinander verglichen: SuperScript™ II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) und MultiScribe™ Reverse Transkriptase (Applied Biosystems, Foster City,

Primer	Random Hexamers	100 mg/l
Desoxyribonukleotid-Mischung	dATP	10 mmol/l
	dTTP	10 mmol/l
	dGTP	10 mmol/l
	dCTP	10 mmol/l
5x Reaktionspuffer	Tris-HCL	250 mmol/l
	KCl	375 mmol/l
	MgCl <sub>2</sub>	15 mmol/l
	pH	8,3
Dithiothreitol (DTT)		0,1 mol/l
RNase Inhibitor	RNase OUT™	40 U/μl
Reverse Transkriptase	SuperScript™ II	200 U/μl

**Tabelle 2.8:** Reagenzien für SuperScript™ II Reverse Transkriptase

CA, USA). Tabelle 2.8 listet alle benötigten Reagenzien für die Reverse Transkription mittels SuperScript™ II auf, Tabelle 2.9 auf der nächsten Seite für MultiScribe™.

### 2.7.2 Praktische Durchführung

Für die beiden untersuchten RT-Systeme wurden die in Tabelle 2.10 auf der nächsten Seite gezeigten Reagenzienansätze pipettiert.

Für SuperScript™ II wurde folgendes Arbeitsprotokoll befolgt: Ansatz 1 wurde für 5 min im Heizblock bei 65 °C inkubiert und dann sofort auf Eis gekühlt, um die Bindung der Random Hexamere an die RNA zu begünstigen. Danach wurde Ansatz 2 ohne die Reverse Transkriptase hinzugefügt, gemischt und für 2 min bei 25 °C inkubiert. Nach Zugabe der Reversen Transkriptase wurde der Ansatz erneut gemischt und im Thermocycler 10 min bei 25 °C, 50 min bei 42 °C und 15 min bei 72 °C inkubiert. Die hieraus entstandenen 20 μl cDNA-Lösung wurden dann mit H<sub>2</sub>O auf 100 μl verdünnt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Für MultiScribe™ wurde folgendes Arbeitsprotokoll befolgt: Der Reaktionsansatz wurde gemäß Tabelle 2.10 auf der nächsten Seite pipettiert und danach im Thermocycler 10 min bei 25 °C, 30 min bei 48 °C und 5 min bei 95 °C inkubiert. Bis zum Gebrauch wurden die cDNA-Proben bei -20 °C aufbewahrt.

Primer	Random Hexamers	100 mg/l
Desoxyribonukleotid-Mischung	dATP	10 mmol/l
	dTTP	10 mmol/l
	dGTP	10 mmol/l
	dCTP	10 mmol/l
10x TaqMan™ puffer	Tris-HCL	100 mmol/l
	KCl	500 mmol/l
	pH	8,3
MgCl <sub>2</sub>		25 mmol/l
RNAse Inhibitor		20 U/μl
Reverse Transkriptase	MultiScribe™	50 U/μl

**Tabelle 2.9:** Reagenzien für MultiScribe™ Reverse Transkriptase

SuperScript™ II		MultiScribe™	
Ansatz 1		Gesamtansatz	
Random Hexamer	1 μl	Random Hexamer	5 μl
RNA	10 μl	RNA	10 μl
Desoxyribonucleotid-Mischung	1 μl	Desoxyribonucleotid-Mischung	20 μl
Ansatz 2		H <sub>2</sub> O	30 μl
5x Reaktionspuffer	4 μl	10x Reaktionspuffer	10 μl
DTT	2 μl	MgCl <sub>2</sub>	22 μl
RNAse-Inhibitor	1 μl	RNAse-Inhibitor	2 μl
SuperScript™ II	1 μl	MultiScribe™	1 μl
Endvolumen	20 μl	Endvolumen	100 μl

**Tabelle 2.10:** Reagenzienansätze für beide RT-Systeme

## 2.8 Quantitative Real Time PCR (QRT-PCR)

Die konventionelle PCR erlaubt die nahezu beliebige Vervielfältigung auch geringster DNA-Mengen und mittels Gelelektrophorese auch die semiquantitative Mengenbestimmung. Über den Umweg einer Reversen Transkription kann so auch semiquantitativ die mRNA-Menge gemessen werden, die in einer gegebenen Probe enthalten ist. Dies erlaubt jedoch nur eine mehr oder minder grobe Abschätzung und erfordert für höhere Präzision eine densitometrische Messung eines Elektrophoresegels. Genauer, aber nur mit genügend großen Materialmengen durchführbar, ist die Technik des Northern Blotting. Um exakte Genexpressions-Messungen mit geringsten Mengen Ausgangsmaterial durchführen zu können, nutzt man eine Modifikation der PCR, die sogenannte Quantitative Echtzeit-PCR. Diese basiert auf dem Prinzip, während eines PCR-Laufs den exponentiellen Anstieg des Amplifikates kontinuierlich mitzuverfolgen, um dann aus den beobachteten Werten zu extrapolieren, welche Menge Ausgangsmaterial vorhanden gewesen sein muss.

### 2.8.1 Methodische Grundlagen

Um die Vervielfältigung der DNA während des Thermocyclings ohne Unterbrechung messen zu können, nutzt man meist Fluoreszenzfarbstoffe, deren Intensität fluorometrisch gemessen und automatisch aufgezeichnet wird. Bei der in dieser Arbeit angewandten TaqMan<sup>®</sup> PCR werden Fluorochrome eingesetzt, die den sogenannten FRET (Förster/Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) nutzen: Bei bestimmten Fluoreszenzfarbstoff-Paaren, dann Donor-Akzeptor-Paare genannt, wird beobachtet, dass bei unmittelbarer räumlicher Nähe (wenige Nanometer) der beiden Fluorochrome der Donor nach Anregung durch eingestrahktes Licht passender Wellenlänge die erhaltene Energie nicht als Fluoreszenz abgibt. Stattdessen wird diese strahlungsfrei (als Dipol-Dipol-Wechselwirkung) auf den Akzeptorfarbstoff übertragen wird. Dieser wiederum gibt die erhaltene Energie als Fluoreszenz bei seiner charakteristischen Wellenlänge ab. Entfernen sich Donor und Akzeptor zu weit voneinander, bricht die Energieübertragung ab und der Donor gibt die Anregungsenergie nun selbst bei seiner spezifischen Fluoreszenzwellenlänge ab. Dieser Wechsel von Akzeptorfluoreszenz zu Donorfluoreszenz kann detektiert werden und stellt ein Maß für die räumliche Entfernung der beiden Fluorochrome dar.

Bei der TaqMan<sup>®</sup> PCR wird neben den üblichen PCR-Primern ein Sonden-Oligonucleotid eingesetzt, welches auf dem DNA-Strang zwischen den beiden Primern bindet. Diese Sonde trägt am 5'-Ende einen Donor-Farbstoff (auch „Reporter“ genannt, hier FAM, 6-Carbofluorescein) und am 3'-Ende einen Akzeptor-Farbstoff („Quencher“, hier TAMRA, 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin). Ist die Sonde in Lösung und nicht an die DNA gebunden, bewirkt der Quencher-Farbstoff über den FRET eine Unterdrückung der Reporter-Fluoreszenz und gibt stattdessen Fluoreszenzlicht der eigenen Wellenlänge



ab. Bindet die Sonde während eines PCR-Zyklus an ihre Komplementärsequenz, so wird sie von der Taq-Polymerase, die auch eine Exonucleaseaktivität besitzt, während der Elongation am 5'-Ende beginnend abgebaut. Hierdurch wird der Reporterfarbstoff von der restlichen Sonde abgetrennt, die räumliche Entfernung zum Quencher steigt zu stark und der FRET kann nicht aufrechterhalten werden. Es kommt zum Absinken der Quencher-Fluoreszenz und zum Ansteigen der Reporter-Fluoreszenz, was spektrophotometrisch erfasst wird.

Zu Beginn eines QRT-PCR-Laufes unterschreitet der Anstieg der Reporterfluoreszenz aufgrund zu geringer Mengen DNA zunächst die Messempfindlichkeit des Spektrophotometers. Sobald diese ausreicht, kann eine Phase des exponentiellen Anstiegs beobachtet werden, in der die PCR im Reaktionsoptimum verläuft. Im weiteren Verlauf werden Substrate mehr und mehr aufgebraucht und die Polymerase verliert an Aktivität, was zur einer Abnahme des Anstiegs und in eine Plateauphase führt. Diese gemessene Reporter-Fluoreszenz wird gespeichert und in einer Kurve gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Zur Angabe eines Messwertes wählt man nun willkürlich einen Fluoreszenz-Schwellenwert (meist die 10-fache Standardabweichung über der Hintergrundfluoreszenz), ab dem die Fluoreszenz als „positiv“ gewertet wird. Die zugehörige Zyklenzahl wird als  $C_T$  - Wert (Threshold Cycle) bezeichnet und lässt nun Vergleiche zwischen allen beim gleichen Fluoreszenz-Schwellenwert gemessenen Proben zu. Je niedriger der  $C_T$  - Wert, umso größer war die ursprünglich in der untersuchten Probe enthaltene Menge Zielsequenz, da weniger PCR-Zyklen durchlaufen werden mussten, um den Fluoreszenz-Schwellenwert zu erreichen.

## 2.8.2 Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Messergebnisse nach der Standard-Verdünnungs-Methode unter Angabe von Kopienzahlen wurden Plasmid-Verdünnungsreihen der jeweils untersuchten DNA-Sequenzen hergestellt. Nach der Klonierung des jeweiligen PCR-Produkts (siehe Abschnitt 2.6 auf Seite 34) wurde die DNA-Konzentration der Plasmidlösung photometrisch bestimmt (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg). Mit Kenntnis des Molekulargewichts des Vektor-Insert-Konstrukts konnte die Kopienzahl berechnet und eine Verdünnungsreihe bekannter Kopienzahlen erstellt werden. Wird bei der Messung der mRNA eines Zielgens auch die entsprechende Verdünnungsreihe mitbestimmt, kann aus diesen  $C_T$  - Werten und den bekannten Kopienzahlen eine Standardkurve konstruiert werden. Durch Projektion der für die unbekanntes Proben ermittelten  $C_T$  - Werte auf die Standardkurve kann so die jeweilige Kopienzahl ermittelt werden.

Da methodisch bedingt jeweils unterschiedliche Materialmengen untersucht werden, sind die ermittelten Kopienzahlen für RUNX1 und RUNX3 in verschiedenen Materialproben

PCR-Produkt	T <sub>m</sub>	Sequenz	
GAPDH (73 bp)	58 °C	FP	5'-GGGAAGCTTGTCATCAATGGA-3'
		RP	5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'
		PR	5'-ATCCCATCACCATCTTCCAGGAGCG-3'
RUNX1 (81 bp)	58 °C	FP	5'-CTCAGCCTCAGAGTCAGATGCA-3'
		RP	5'-GGTATTGGTAGGACTGATCGTAGGA-3'
		PR	5'-ACAAGGCAGATCCAACCATCCCCAC-3'
RUNX3 (75 bp)	58 °C	FP	5'-GCCGTCTCATCCCATACTTCTG-3'
		RP	5'-TAGCTGGAGACAGTGAGGTCCTT-3'
		PR	5'-AGCCTCCTGCCACCCCCC-3'

**Tabelle 2.11:** Primer und Probes für die quantitative RT-PCR

zunächst nicht vergleichbar. Daher wurde zusätzlich für jede Probe die enthaltene Menge GAPDH-mRNA bestimmt. Da es sich um ein sog. Housekeeping-Gen handelt, das für jede Zelle essentielle Grundfunktionen erfüllt, kann man näherungsweise davon ausgehen, dass es in jeder Probe gleich stark exprimiert wird. Daher eignet es sich als Maß für die eingesetzte Materialmenge und damit zur Normalisierung der Messwerte für die zu untersuchenden Zielgene. In dieser Arbeit wurden alle für RUNX1/3 ermittelten Kopienzahlen auf  $10^4$  Kopien GAPDH-mRNA der jeweiligen Probe bezogen.

### 2.8.3 Primer und Probes

Die verwendeten Primer und Probes wurden mit Hilfe der Software Primer Express™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) designed und durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. In Tabelle 2.11 sind alle Sequenzen aufgeführt. Die Primer wurden in lyophilisierter Form geliefert, mit H<sub>2</sub>O nach Herstelleranweisung auf eine Konzentration von 100 µmol/l rekonstituiert und bei -20 °C gelagert. Zum Gebrauch wurden Aliquots auf eine Konzentration von 25 µmol/l verdünnt. Die Probes wurden auf eine Gebrauchskonzentration von 10 µmol/l verdünnt und bei -20 °C in lichtgeschützten Behältern gelagert.

### 2.8.4 Praktische Durchführung

Für die quantitative TaqMan® PCR wurde der gebrauchsfertige Absolute™ QPCR ROX Mix (ABgene, Hamburg) eingesetzt. Dieser Mastermix unterscheidet sich von herkömmlichen Reagenzien für die konventionelle PCR hauptsächlich durch den enthaltenen Farbstoff ROX (6-Carboxy-X-rhodamin), der als passiver Referenzfarbstoff dient. Außerdem ist die enthaltene DNA-Polymerase Hot-Start-modifiziert, d.h. liegt zunächst inaktiv vor und wird erst durch Inkubation für 15 min bei 95 °C aktiviert. Dadurch kann die unspezifische

Elongation bei Raumtemperatur vermieden werden. Zur Durchführung der PCR wurde dieser Mastermix mit Primern, Probe, H<sub>2</sub>O und einer cDNA–Probe wie folgt zu einem Reaktionsansatz à 25 µl gemischt:

- 12,5 µl Absolute™ QPCR ROX Mix
- je 0,5 µl Primer (25 µM)
- 0,5 µl Probe (10 µM)
- 5 µl cDNA–Lösung
- 6 µl H<sub>2</sub>O

Um Kontaminationen jeglicher Art zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeitsschritte in einer exklusiv hierfür genutzten Sterilbank mit eigenen Arbeitsgeräten vollzogen. Einweghandschuhe wurden regelmäßig gewechselt, alle Plastikwaren und Reagenzien wurden erst unmittelbar vor Benutzung der Herstellerverpackung entnommen und alle verwendeten Pipettenspitzen verfügten über Aerosolfilter.

Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe eines ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nach folgendem Temperaturprofil:

Initialzyklus	Inkubation	2 min	50 °C
	Aktivierung	15 min	95 °C
40 Zyklen	Denaturierung	15 s	95 °C
	Annealing	20 s	58 °C
	Elongation	30 s	72 °C

Die Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der ABI PRISM® Sequence Detection Software Version 1.9.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

## 2.9 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine verbreitete Methode zum Nachweis spezifischer molekularer Strukturen auf histologischen Gewebeschnitten. Voraussetzung ist, dass die nachzuweisenden Strukturen — in der Regel Proteine — antigen wirksam sind und in Versuchstieren wie Mäusen oder Kaninchen die Antikörperproduktion induzieren können. Diese Antikörper können dem Tier in dessen Serum entnommen, aufgereinigt und mit den gesuchten Zielstrukturen auf dem histologischen Schnitt zur Reaktion gebracht werden. Nach erfolgter spezifischer Bindung kann der Antikörper und mit ihm seine spezifische Zielstruktur

detektiert werden, sofern der Antikörper in geeigneter Weise markiert wurde. Entsprechende Marker dürfen die Bindungseigenschaften des Antikörpers nicht beeinflussen und müssen einfach zu detektieren sein. Häufige Anwendung finden enzymatische Systeme, die ein chromogenes Substrat umsetzen und daher unter dem Mikroskop eine charakteristische Farbänderung beobachten lassen. Aus wirtschaftlichen und praktischen Gründen werden in der Regel nicht die zur Detektion der Zielstruktur genutzten Antikörper (Primärantikörper) direkt markiert. Stattdessen nutzt man Sekundärantikörper, die gegen die Primärantikörper gerichtet sind, als Träger der Markersubstanz. Da derartige Sekundärantikörper in der Regel gegen eine ganze Antikörperklasse einer Wirtstierspezies gerichtet sind, lassen sie sich universell einsetzen und sind entsprechend wirtschaftlicher zu produzieren. Außerdem können mehrere verschiedene Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Markern ausprobiert werden, um optimale Ergebnisse zu erhalten.

Da mit sehr geringen Stoffmengen gearbeitet wird, müssen Maßnahmen zur Signalverstärkung ergriffen werden, um unter dem Mikroskop eine sichtbare Markierung erkennen zu können. Werden enzymatische Farbreaktionen genutzt, kann durch entsprechende Inkubationsdauer eine deutliche Verstärkung des Signals erzielt werden. Häufig werden biotinylierte Sekundärantikörper genutzt, an die dann mit Avidin konjugierte Markersysteme gebunden werden. Dies eröffnet eine weitere Möglichkeit zur Signalverstärkung nach der sogenannten ABC-Methode (Avidin–Biotin–Complex): Aus avidin–konjugiertem Enzym und Biotin wird ein hochmolekularer Komplex gebildet, der dann auf dem zu untersuchenden histologischen Schnitt mit dem bereits gebundenen, biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert wird. Dadurch wird mit dem ABC eine große Menge Enzym pro Antikörper gebunden und die Markerreaktion läuft entsprechend verstärkt ab.

### 2.9.1 Reagenzien und Methoden

Es wurden polyklonale Kaninchen–anti–human–RUNX1–Antikörper bzw. Kaninchen–anti–human–RUNX3–Antikörper als Primärantikörper benutzt [87]. Als Nachweisreaktion wurde die ABC–Methode in Verbindung mit Horse–Radish–Peroxidase (HRP) gewählt. Sekundärantikörper war der im VECTASTAIN ABC Kit (Vector, Burlingame, CA, USA) enthaltene biotinylierte Ziege–anti–Kaninchen–IgG–Antikörper. [Tabelle 2.12 auf der nächsten Seite](#) listet alle benötigten Reagenzien und Kit–Inhalte auf.

Antikörper können manchmal durch Wasserstoffbrückenbindungen unspezifisch an Gewebestrukturen gebunden werden. Um diese möglichen Bindungsstellen zuvor mit Proteinen abzusättigen, inkubiert man das zu untersuchende Gewebe mit Serum. Wählt man dieses als Serum der Spezies, aus der auch der Sekundärantikörper stammt, ist sichergestellt, dass der Sekundärantikörper keines der Blocking–Proteine als Zielstruktur erkennt. Bei Verwendung von Peroxidase–Nachweisreaktionen muss die eventuell

Primärantikörper-Puffer	Phosphate-Buffered-Saline (PBS)	
	pH	7,4
	Triton X-100	0,1%
Sekundärantikörper-Kit	Normal-Ziegenserum	3%
	VECTASTAIN ABC Kit (Rabbit IgG):	
	Blocking-Serum Ziege	3%
	Sekundärantikörper	1%
	Avidin DH Lösung	
chromogenes Substrat	HRP biotinyliert	
	DAB Substrate Kit (Vector):	
	Pufferlösung	
	DAB-Lösung	
Gegenfärbung	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	
	Hämalaun nach Mayer (Merck)	
Blocking-Lösungen	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	5%
	Normal-Ziegenserum	3%
	Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector):	
	Avidin D-Lösung	
	Biotin-Lösung	
Waschpuffer	Tris-Puffer:	1000 ml
	Trizma Base (Fluka)	6,05 g
	NaCl	9 g
	pH	7,6
Eindeckmedium	VectaMount Permanent Mounting Medium	

**Tabelle 2.12:** Reagenzien für die immunhistochemische Färbung von Paraffin-Schnitten

vorhandene endogene Peroxidaseaktivität des untersuchten Gewebes blockiert werden. Dies geschieht durch Inkubation mit Wasserstoffperoxidlösung. Außerdem kann Gewebe manchmal — beispielsweise über endogenes Biotin oder Biotinrezeptoren — Avidin und Biotin binden. Da dies bei späterer Zugabe des biotinylierten Sekundärantikörpers oder des avidin-konjugierten Enzyms zu unerwünschten Färbungen führen würde, müssen diese Bindungsstellen ebenfalls abgesättigt werden. Da Avidin vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin besitzt, Biotin aber nur an ein Avidinmolekül binden kann, muss dem Gewebe zuerst eine Avidin-Lösung zugesetzt werden. Nachdem diese endogenes Biotin geblockt hat, können alle endogenen und durch das zugesetzte Avidin entstandene Biotin-Bindungsstellen mit Biotin-Lösung geblockt werden.

### 2.9.2 Praktische Durchführung

Während der teilweise lang andauernden Inkubationsphasen dürfen die mit den jeweiligen Lösungen benetzten Schnitte nicht austrocknen. Daher empfiehlt sich die Verwendung einer Inkubationskammer, die leicht aus einem Gefäß mit Deckel, welches mit feuchten Papiertüchern ausgelegt wurde, hergestellt werden kann. Um nicht den gesamten Objektträger mit den teilweise recht kostspieligen Gebrauchslösungen bedecken zu müssen, können die Gewebestücke mit einem Fettstift umrandet werden. Durch diese hydrophobe Barriere genügen oft 100–200 µl Gebrauchslösung zum vollständigen Benetzen des gewünschten Gewebes. Die für die Avidin-Biotin-Enzymkomplex und die Peroxidase-Reaktion nötigen Gebrauchslösungen wurden unmittelbar vor Benutzung nach den Herstellerangaben hergestellt.

- Entparaffinierung der Gewebeschnitte (siehe Abschnitt 2.2.1 auf Seite 27)
- Waschen (in Waschpuffer für 3 x 1 min)
- Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung 5% für 10 min
- Waschen
- Biotin-Block mit Avidin-Lösung für 15 min, danach kurzes Abspülen mit Waschpuffer
- Avidin-Block mit Biotin-Lösung für 15 min, danach kurzes Abspülen mit Waschpuffer
- Blocken unspezifischer Bindungen mit Normal-Ziegenserum für 30 min, danach lediglich Abschütteln der Blocking-Lösung

- Inkubation mit Primärantikörper bei Raumtemperatur für 60 min, Verdünnungsfaktor 1:100 für anti-RUNX1 und 1:1000 für anti-RUNX3 in Verdünnungslösung mit Blocking-Serum
- Waschen
- Inkubation mit Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 30 min
- Waschen
- Inkubation mit ABC-Reagenz bei Raumtemperatur für 30 min
- Waschen
- Inkubation mit DAB-Lösung bei Raumtemperatur bis zur Entwicklung einer hinreichenden Färbung (ca. 2–5 min)
- Waschen
- Gegenfärbung mit Hämalaun für ca. 1 min
- Spülen in Leitungswasser
- Entwässerung mit ansteigender Alkoholreihe (siehe Abschnitt 2.2.1 auf Seite 27)
- Eindecken mit Eindeckmedium

## 2.10 Statistik und Abbildungen

Sofern nicht im Text anders angegeben, wurden Patientengruppen mittels des Mann-Whitney – Rank-Sum-Tests verglichen, um statistisch signifikante Unterschiede festzustellen. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% ( $P \leq 0,05$ ) festgelegt. Messungen wurden — sofern nicht anders vermerkt — mindestens dreifach durchgeführt und die Mittelwerte für weitere Berechnungen herangezogen. In den Box-Plots entsprechen die Boxen dem Median bzw. der 25./75. Perzentile, die Whiskers der 10./90. Perzentile und die gefüllten Kreise der 5./95. Perzentile.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung der quantitativen PCR aus Mikrodissektaten

Genexpressionsanalysen mit Hilfe quantitativer PCR sind seit der ersten Echtzeitbeobachtung der Kinetik einer Polymerase-Kettenreaktion durch Higuchi et al. 1992 [54] zu einem weit verbreiteten Routinewerkzeug der Labordiagnostik geworden. Ausschlaggebend dafür ist sicherlich auch die Verfügbarkeit kommerzieller Kits und Assays, die diese Methode einfach und in großem Maßstab anwendbar machen. In der Routinediagnostik werden jedoch zum überwiegenden Teil Gewebe untersucht, die in ausreichender Menge und Qualität vorliegen. Sollen hingegen Genexpressionsanalysen in formalinfixierten und paraffineingebetteten Zellen, die mittels Mikrodissektion gewonnen wurden, durchgeführt werden, so stoßen kommerzielle Kits an ihre Grenzen. Ein Hauptproblem ist dabei die Fragmentierung der Nukleinsäuren durch den Fixierungs- und Einbettungsprozess, dem die Gewebeproben unterzogen werden. So ist die Auswahl möglicher Primer und Probes durch die maximal mögliche Ampliconlänge von ca. 100–300 bp eingeschränkt [86, 146]. Außerdem sind viele kommerzielle RNA-Extraktions-Kits nicht für sehr kurze Fragmentlängen konzipiert.

Probleme können auch Methoden wie DNase-Verdau oder Reverse Transkription bereiten: Bei den äußerst geringen Materialmengen, die durch die Mikrodissektion gewonnen werden, ist nicht sichergestellt, dass diese notwendigen Arbeitsschritte keine negativen Auswirkungen auf die teils sehr aufwendig isolierte RNA haben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es daher notwendig, den Einfluss eines DNase-Verdaus auf die verwendeten RNA-Proben zu untersuchen. Außerdem sollten die aus den Mikrodissektaten gewonnenen Kleinstmengen RNA natürlich möglichst effizient in cDNA umgeschrieben werden, damit zuverlässigere Ergebnisse aus den Experimenten abgeleitet werden können. Daher wurden außerdem zwei verbreitete Reverse-Transkriptions-Systeme bezüglich ihrer Effizienz evaluiert.

#### 3.1.1 Auswirkungen des DNase-Verdaus auf die RNA-Qualität

Bei der Extraktion der RNA aus den Gewebeproben werden im Regelfall auch geringe Mengen genomische DNA aufgereinigt, welche über die Reverse Transkription hinaus erhalten bleiben. Mit der quantitativen PCR soll aber nur cDNA gemessen werden, um eine Aussage über die ursprünglich in den Proben enthaltene Menge mRNA treffen zu



können. Um dies zu erreichen und Verfälschungen durch die zusätzliche genomische DNA zu vermeiden, müssen Methoden zum Einsatz kommen, die eine Amplifikation der cDNA ohne gleichzeitige Amplifikation der genomischen DNA ermöglichen.

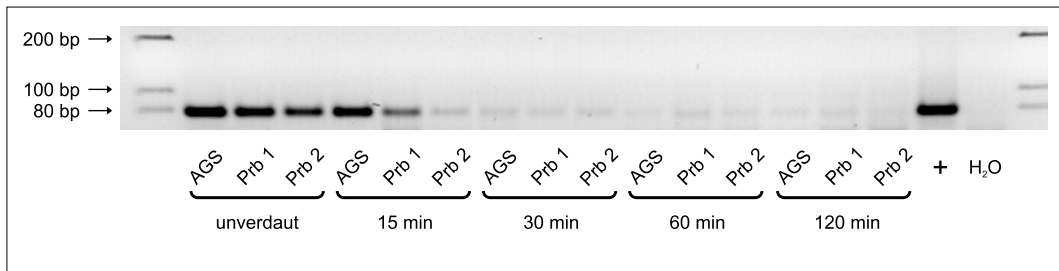
Eine praktikable Möglichkeit ist, Primerpaare zu verwenden, die die Exongrenzen der mRNA überspannen, d.h. deren Amplicon aus dem Ende eines Exons und dem Anfang des folgenden Exons bestehen. Aus der genomischen DNA transkribierte Introns werden durch Splicing aus der mRNA entfernt. Daher ist das Amplicon in der mRNA bzw. cDNA deutlich kürzer als das Amplicon der korrespondierenden genomischen DNA. DNA-Polymerasen besitzen bei PCR-Bedingungen üblicherweise eine Aktivität von einigen tausend verknüpften Basen pro Minute. Ist diese Aktivität bekannt, ist es zur selektiven Amplifikation der cDNA ausreichend, die Zykluszeiten für die Elongationsphase der quantitativen PCR so kurz zu wählen, dass ausschließlich die kürzeren cDNA-Amplicons von der Taq-Polymerase exponentiell repliziert werden können, nicht jedoch die langen DNA-Amplicons.

Eine weitere Möglichkeit zur Elimination der DNA-Verunreinigung ist der DNase-Verdau der frisch aufgereinigten RNA-Proben. Das Enzym DNase spaltet selektiv DNA-Stränge und lässt RNA intakt. Dadurch kann die genomische DNA vor der Reversen Transkription aus der RNA-Probe entfernt werden. Wichtig ist dabei, dass die DNase-Aktivität entweder durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion oder durch Hitzeinaktivierung vollständig aus der RNA-Probe entfernt werden kann. Bleibt eine Restaktivität bis zur Reversen Transkription erhalten, droht die Gefahr der unerwünschten Degradation der cDNA.

In dieser Arbeit wurden die Primer für die quantitative PCR von GAPDH und RUNX1 so gewählt, dass Exongrenzen überspannt werden. Dies war aufgrund ungeeigneter Sequenzen für die RUNX3-Primer nicht möglich, daher wurde auf den DNase-Verdau der RNA-Proben zurückgegriffen. Hierfür wurde eine DNase (DNase I, Amplification Grade, Invitrogen, Karlsruhe) ausgewählt, deren Aktivität durch Hitzeinaktivierung aus den Reaktionsansätzen entfernt werden kann und deren Pufferreagenzien nicht störend auf nachfolgende PCR-Reaktionen wirken. So konnte eine erneute Phenol-Chloroform-Extraktion und der damit verbundene Materialverlust vermieden werden. Im Folgenden wurden die Auswirkungen des zusätzlichen Arbeitsschritts auf die quantitative Bestimmung der cDNA untersucht.

### **Ermittlung der optimalen DNase-Inkubationszeit**

Die Dauer des DNase-Verdaus kann für die Qualität der RNA-Proben maßgebend sein: Einerseits soll sichergestellt werden, dass genomische DNA möglichst vollständig eliminiert wird, andererseits führen zu lange Inkubationszeiten möglicherweise zu unspezifischem

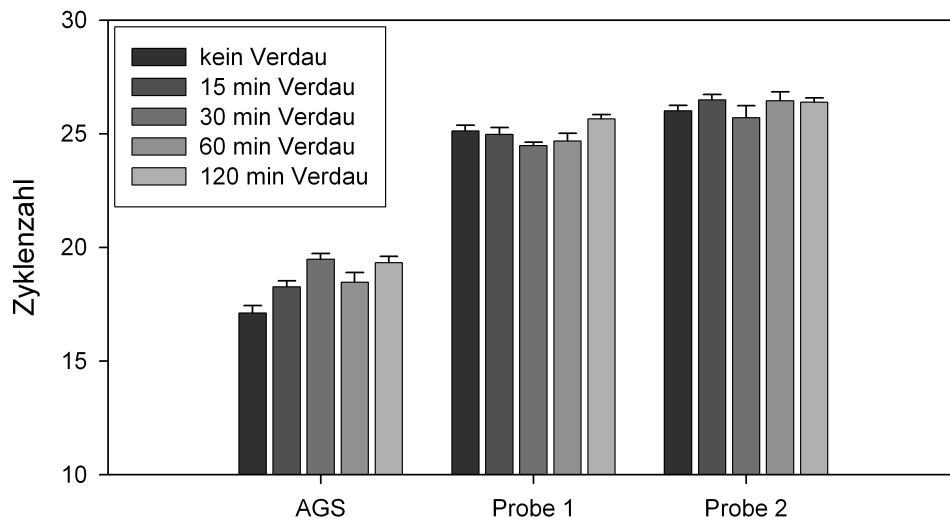


**Abbildung 3.1:** Agarosegel-Elektrophorese dreier RNA-Proben nach DNA-GAPDH-PCR und verschieden langem DNase-Verdau; Magenkarzinom-Zelllinie AGS und 2 zufällig ausgewählte Patientenproben

Verdau und Hydrolyse der RNA. Im Folgenden sollte also ermittelt werden, welche Inkubationszeit ausreicht, um die genomische DNA weitestgehend abzubauen, ohne gleichzeitig die RNA anzugreifen.

Zunächst wurde RNA aus Zellen der Magenkarzinom-Zelllinie AGS und aus paraffin-eingebetteten histologischen Schnitten des Magens zweier zufällig ausgewählter Patienten isoliert. Diese Proben wurden dann direkt in cDNA transkribiert oder zuvor für 15, 30, 60 oder 120 min mit DNase inkubiert. Um zu ermitteln, welche Inkubationsdauer ausreicht, genomische DNA zu eliminieren, wurden die Proben nun mittels konventioneller PCR und Agarose-Gelelektrophorese auf das Vorhandensein von genomischer GAPDH-DNA untersucht. Abbildung 3.1 zeigt, dass bei der vom Hersteller empfohlenen Inkubation von 15 min Dauer genomische DNA weiterhin problemlos nachweisbar ist. Erst nach 30 min ist diese weitestgehend abgebaut, eine längere Inkubation führt zu keiner weiteren Änderung.

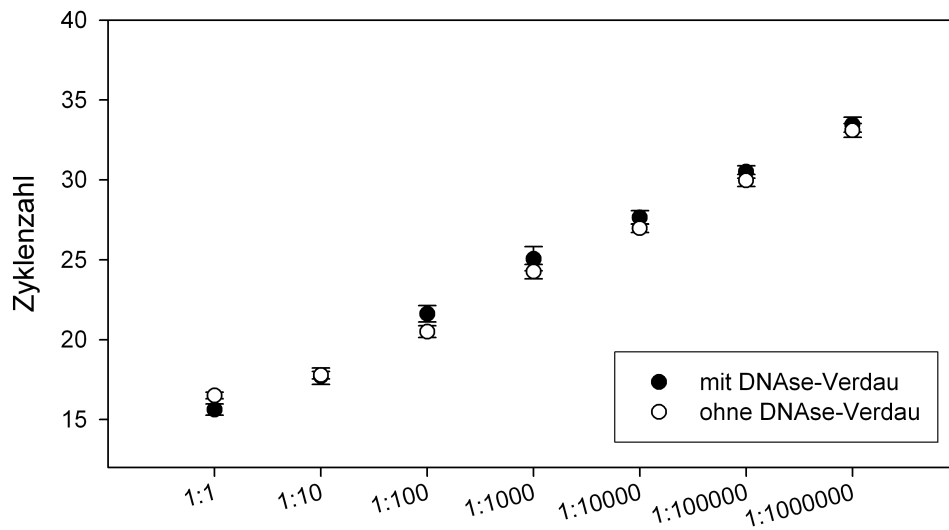
Zum Nachweis eines möglichen negativen Einflusses einer zu langen DNase-Inkubation auf die RNA-Proben wurde nach dem Verdau deren GAPDH-mRNA-Gehalt mit Hilfe von quantitativer PCR bestimmt. Abbildung 3.2 auf der nächsten Seite zeigt die benötigten Zyklenzahlen zum Erreichen der Nachweisschwelle für jede der drei Proben in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Insbesondere bei den Patientenproben, deren mRNA-Konzentration geringer ist, lässt sich kein negativer Einfluss der DNase-Inkubation erkennen. Auch langandauernder Verdau bis 120 min hat im Rahmen des Standardfehlers keine signifikant negativen Auswirkungen auf die Menge der mRNA. Für alle weiteren Experimente wurde daher eine DNase-Inkubation über 30 min als optimale Kombination aus Effizienz und Schonung des wertvollen Probenmaterials gewählt.



**Abbildung 3.2:** *Verschiedene DNase-Verdau-Zeiten dreier RNA-Proben: Magenkarzinom-Zelllinie AGS und 2 zufällig ausgewählte Patientenproben (jeweils Mittelwert aus 3 Bestimmungen mit Standardfehler)*

### **Einfluss des DNase-Verdau auf die quantitative Bestimmung in Abhängigkeit der eingesetzten RNA-Menge**

Um den Einfluss des DNase-Verdau auf geringe RNA-Mengen, wie sie bei der Extraktion aus Mikrodissektaten zu erwarten sind, zu untersuchen, wurde aus Zelllinien (KATO III) gewonnene RNA in einer Verdünnungsreihe von 1:1 bis 1:1.000.000 verdünnt. Ein Teil wurde direkt in cDNA transkribiert, während ein anderer zuvor mit DNase behandelt wurde. Dann wurde die cDNA für GAPDH mittels quantitativer PCR amplifiziert und die benötigten Zyklen für verdaute und unverdaute Proben miteinander verglichen. Da die Primer für GAPDH Exongrenzen überspannen, kann man davon ausgehen, dass etwaige beobachtete Unterschiede zwischen verdauten und unverdauten Proben nicht auf die mögliche Koamplifikation von genomischer DNA zurückzuführen sind, sondern Ausdruck methodischer Einflüsse des DNase-Verdau auf die RNA-Proben sind (beispielsweise unspezifischer Verdau von RNA durch DNase). [Abbildung 3.3 auf der nächsten Seite](#) zeigt einen nahezu identischen Verlauf der quantitativen PCR für verdaute und unverdaute RNA-Proben über den gesamten Verdünnungsbereich. Die Abweichungen zwischen beiden Gruppen bewegen sich in einem Bereich zwischen 0,1 und 1,1 Zyklen bei Standardfehlern von 0,1 bis 0,75 Zyklen. Daher kann man davon ausgehen, dass der DNase-Verdau keinen signifikanten Einfluss auf die RNA-Proben hat.

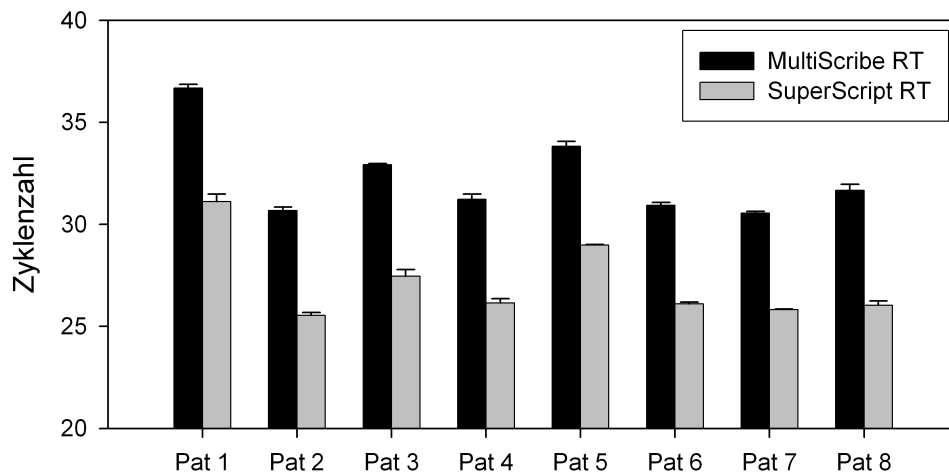


**Abbildung 3.3:** DNase-Verdau von RNA-Proben unterschiedlicher Verdünnung aus der Magenkarzinom-Zelllinie KATO III (jeweils Mittelwert aus 4 Bestimmungen mit Standardfehler)

### 3.1.2 Vergleich zweier Reverse Transkriptions-Systeme

Da aus Mikrodisektaten nur äußerst geringe Mengen RNA extrahiert werden können, gleichzeitig aber möglichst viele verschiedene Gene in mehreren Versuchswiederholungen untersucht werden sollen, muss die Probenaufbereitung (wie z.B. der DNase-Verdau) und die Weiterverarbeitung sparsam und effizient mit dem verfügbaren Material umgehen. Daher wurden für diese Studie zwei verbreitete Reverse Transkriptions-Systeme hinsichtlich ihrer Effizienz bei geringen RNA-Mengen untersucht: SuperScript™ II der Firma Invitrogen (Karlsruhe) und MultiScribe™ der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Hierzu wurden von 8 zufällig ausgewählten Patientenproben Mikrodisektionen des Magenepithels angefertigt und die RNA wie beschrieben extrahiert. Mit diesen RNA-Proben wurden dann die im Abschnitt 2.7 auf Seite 37 beschriebenen Arbeitsschritte zur Reversen Transkription vollzogen. Die resultierenden cDNA-Proben wurden dann mittels quantitativer PCR vermessen. Um unnötige Variablen auszuschließen, wurden hierfür die Primer für GAPDH gewählt, da diese Exongrenzen überspannen und daher keinen DNase-Verdau benötigen. Abbildung 3.4 auf der nächsten Seite zeigt, dass bei Reverser Transkription mittels SuperScript™ II Reverser Transkriptase im Mittel 5,1 PCR-Zyklen weniger zum Erreichen derselben Nachweisgrenze erforderlich sind wie bei Einsatz von



**Abbildung 3.4:** Reverse Transkription von RNA-Proben mit zwei verschiedenen RT-Systemen; 8 zufällig ausgewählte Patientenproben wurden untersucht (jeweils Mittelwert aus 3 Bestimmungen mit Standardfehler)

MultiScribe™ RT, d.h. SuperScript™ II deutlich effizienter arbeitet. Daher wurde diese Reverse Transkriptase für alle weiteren Experimente benutzt.

## 3.2 Quantitative Bestimmung der RUNX3-Expression in der Magenmucosa

### 3.2.1 Patientenkollektiv, Auswahlkriterien und histologische Evaluation

Zur Untersuchung der RUNX3-mRNA-Expression in der Magenschleimhaut wurde ein Kollektiv aus 105 Patienten rekrutiert: Als gesunde Kontrollgruppe (N) wurden 24 Patienten ausgewählt, die endoskopisch und histologisch keine Auffälligkeiten der Magenschleimhaut zeigten. Weiterhin wurden je 10 Patienten mit der Diagnose einer Gastritis mit geringer (L0/L1) beziehungsweise starker (L2/L3) lymphozytärer Infiltration der Mucosa untersucht. Hinzu kamen 25 Patienten, die zusätzlich zur Gastritis die feingeweblichen Veränderungen Atrophie oder intestinale Metaplasie zeigten (AT/IM). Zur Beurteilung der RUNX3-Expression in maligne entartetem Gewebe wurden außerdem 36 Patienten mit Magenkarzinomen vom intestinalen Typ rekrutiert (CA).

Patienten, die nichtsteroidale Antiphlogistika einnahmen oder unter antisekretorischer Therapie mittels Protonenpumpen-Inhibitoren oder H<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten standen, wurden ausgeschlossen. Karzinompatienten unter neoadjuvanter Chemotherapie wurden ebenfalls ausgeschlossen. Um die Zahl der Variablen klein zu halten, wurden ausschließlich

Patienten mit positivem *H. pylori*-Befund untersucht — ausgenommen die Patienten, bei denen keine Magen-Pathologie nachgewiesen werden konnte und die daher als gesundes Kontrollkollektiv herangezogen wurden. Die Gewebeproben wurden zur histologischen Evaluation formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Aus diesem Material wurde dann mittels quantitativer PCR der RUNX3-mRNA-Gehalt der Magenschleimhaut aller Patienten bestimmt. Des Weiteren wurde wie im Abschnitt 2.1.4 auf Seite 26 beschrieben der Helicobacterstatus durch PCR evaluiert.

### Histologische Evaluation

Das den Patienten gastroscopisch oder operativ entnommene Gewebe wurde im Institut für Pathologie von Herrn Dr. med Rupert Langer untersucht. Dabei wurden die Merkmale Gastritis, Atrophie und intestinale Metaplasie nach der Updated Sidney Klassifikation [24] beurteilt. So wurde die Chronizität der Gastritis nach dem Grad der lymphozytären Infiltration der Magenmucosa in vier Stufen von keine (L0), über geringe und mäßige (L1 und L2) bis starke (L3) Infiltration eingeteilt. Anhand dieses Kriteriums wurden Patienten mit *H. pylori*-positiven Gastritiden zwei Gruppen mit niedriger bzw. hoher Chronizität zugewiesen, um deren Auswirkung auf die RUNX3-Expression beurteilen zu können. Ferner wurde bei der histologischen Evaluation auch die Aktivität der Entzündungsreaktion anhand der granulozytären Infiltration ebenfalls in vier Stufen von G0 bis G3 festgelegt. Da die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten jedoch unmittelbar von einer floriden *H. pylori*-Infektion abhängig ist und nach Eradikation innerhalb weniger Tage vollständig zurückgeht [165], erscheint die Chronizität der Entzündung als ein geeigneterer Parameter als die Aktivität zur Beurteilung von Langzeiteffekten im Rahmen der Karzinogenese. Zur Beurteilung der RUNX3-Expression in mit dem intestinalen Magenkarzinom assoziierten Schleimhautläsionen wurden 25 Patienten mit histologisch nachgewiesener atrophischer Gastritis oder intestinaler Metaplasie rekrutiert. Tabelle 3.1 stellt die Zusammensetzung dieser Patientengruppen dar.

	<b>L0</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>G0</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>AT</b>	<b>IM</b>
	(n=2)	(n=13)	(n=25)	(n=5)	(n=4)	(n=19)	(n=20)	(n=2)	(n=14)	(n=11)
<b>L0/L1</b>	2	8	-	-	-	10	-	-	-	-
(n=10)	(20)	(80)				(10)				
<b>L2/L3</b>	-	-	5	5	-	-	8	2	-	-
(n=10)			(50)	(50)			(80)	(20)		
<b>AT/IM</b>	-	5	20	-	4	9	12	-	14	11
(n=25)		(20)	(80)		(16)	(36)	(48)		(56)	(44)

**Tabelle 3.1:** Überblick über die histologische Einteilung der Patientengruppen mit Gastritis, Atrophie, intestinaler Metaplasie; Werte in Klammern sind — falls nicht anders angegeben — prozentuale Anteile an der gesamten Patientengruppe

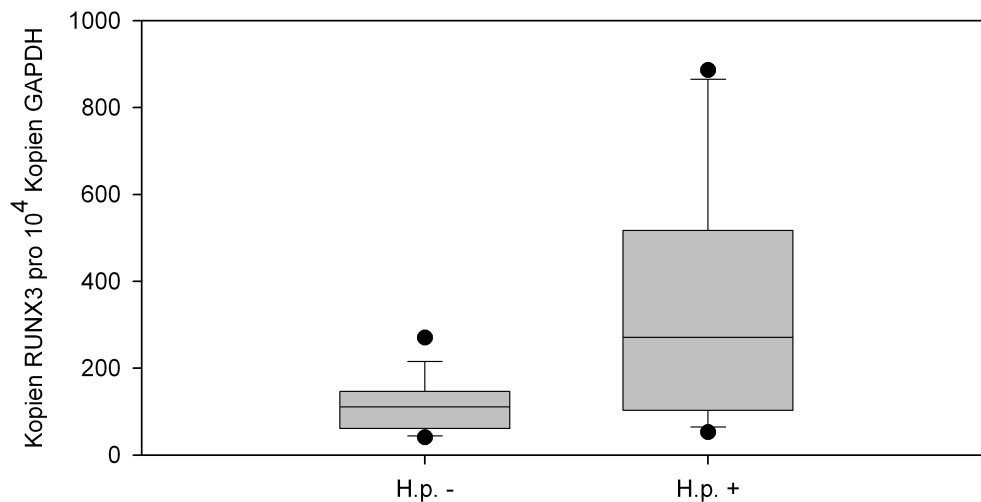
	<b>N0</b> (n=19)	<b>N1</b> (n=11)	<b>N2</b> (n=5)	<b>N3</b> (n=1)	<b>M1</b> (n=2)	<b>G1</b> (n=4)	<b>G2</b> (n=12)	<b>G3</b> (n=20)
<b>T1</b> (n=13)	13 (100)	-	-	-	-	3 (23)	8 (62)	2 (15)
<b>T2</b> (n=18)	5 (28)	10 (56)	2 (1)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	3 (17)	14 (78)
<b>T3</b> (n=4)	-	1 (25)	3 (75)	-	-	-	1 (25)	3 (75)
<b>T4</b> (n=1)	1 (100)	-	-	-	1 (100)	-	-	1 (100)

**Tabelle 3.2:** Histopathologisches Staging und Grading der Patienten mit Magenkarzinom; Werte in Klammern sind — falls nicht anders angegeben — prozentuale Anteile am jeweiligen T-Stadium; M-Stadium zum Zeitpunkt der histologischen Evaluation

Um die Expression von RUNX3 in maligne entarteten Magenepithelien untersuchen zu können, wurden 36 Patienten mit intestinalem Magenkarzinom ausgewählt. Patienten mit diffusum Magenkarzinom wurden nicht untersucht, da eine saubere Mikrodisektion diffus infiltrierender Zellen mit der zur Verfügung stehenden Methode äußerst anfällig für Kreuzkontamination und daher wenig zuverlässig gewesen wäre. Die Ergebnisse des histologischen Stagings und Gradings fasst Tabelle 3.2 zusammen.

### 3.2.2 Erhöhte RUNX3-Expression in *H. pylori*-induzierter Gastritis

Die chronische, *H. pylori*-induzierte Gastritis ist die früheste mit dem Magenkarzinom assoziierte histologische Veränderung der Magenschleimhaut. Es stellt sich die Frage, ob RUNX3 als möglicher Tumorsuppressor im Rahmen der Entzündungsreaktion herunterreguliert wird. Es wurde daher die RUNX3-mRNA-Expression von 20 Patienten mit *H. pylori*-positiver Gastritis ohne zusätzliche histologische Veränderungen wie Atrophie oder intestinale Metaplasie bestimmt und mit derjenigen von 24 gesunden Patienten verglichen. Abbildung 3.5 auf der nächsten Seite zeigt, dass im Vergleich mit gesunden Patienten die RUNX3-Expression signifikant höher ist, wenn eine *H. pylori*-positive Gastritis vorliegt ( $P \leq 0,001$ ). Nur ungefähr 1% aller Patienten mit *H. pylori*-positiver chronischer Gastritis entwickeln im Laufe ihres Lebens ein Magenkarzinom [31]. Grundsätzlich ist daher wenig verwunderlich, dass in diesem Stadium, insbesondere bei vergleichsweise geringen Fallzahlen, keine Verminderung der RUNX3-Expression zu beobachten ist. Auffällig ist jedoch, dass die Expression in entzündeter Magenschleimhaut keineswegs unverändert, sondern entgegen der Erwartung deutlich erhöht ist.



**Abbildung 3.5:** *RUNX3*-mRNA-Expression in *H. pylori*-infizierter, formalinfixierter Magenschleimhaut ohne schwere histologische Veränderungen (*H.p.* +,  $n=20$ ) verglichen mit gesunder, *H. pylori*-negativer Mucosa (*H.p.* -,  $n=24$ ); der gemessene Unterschied ist signifikant mit  $P \leq 0,001$

### 3.2.3 Validierung der Methodik anhand frischer Magenbiopsien

Die Verwendung formalinfixierten Gewebes (FFPE, formalin fixed paraffin embedded) zur Extraktion von RNA und deren quantitative Messung mittels PCR birgt aufgrund der formalinbedingten Fragmentierung der Nukleinsäuren die Gefahr systematischer Messfehler. Um sicherzustellen, dass die bei Vorliegen einer *H. pylori*-induzierten Gastritis wieder Erwarten erhöhte *RUNX3*-Expression nicht auf einen solchen methodischen Fehler zurückzuführen ist, wurden die ermittelten Ergebnisse anhand einer zweiten Magen-Biopsiebank validiert. Das dort enthaltene Biopsiematerial wurde zur Fixierung unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren (FF, fresh frozen) und mit dem Ziel geringstmöglicher Degradation weiterverarbeitet.

#### Patientenkollektiv, Auswahlkriterien und histologische Evaluation

Es wurden 69 Patienten mit *H. pylori*-positiver Gastritis und 45 Patienten ohne *H. pylori*-Infektion als gesundes Kontrollkollektiv untersucht. Patienten, die mit Protonenpumpeninhibitoren,  $H_2$ -Rezeptorantagonisten oder nichtsteroidalen Antiphlogistika behandelt wurden, wurden ausgeschlossen, ebenso wie Patienten mit Ulcus ventriculi oder Magenkarzinom. Die histologische Beurteilung und die Evaluation des Helicobacterstatus erfolgte entsprechend der in den Abschnitten [3.2.1 auf Seite 54](#) und [2.1.4 auf Seite 26](#)



	<b>L0</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>	<b>G0</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>
<b>Gesamt</b>	1	14	44	10	2	14	38	15
(n=69)	(1)	(20)	(64)	(14)	(3)	(20)	(55)	(22)
<b>IM–</b>	1	10	33	4	1	12	25	10
(n=48)	(2)	(21)	(69)	(8)	(2)	(25)	(52)	(21)
<b>IM+</b>	0	4	11	6	1	2	13	5
(n=21)	(0)	(19)	(52)	(29)	(5)	(10)	(62)	(24)
<b>AT–</b>	1	10	33	6	1	9	32	8
(n=50)	(2)	(20)	(66)	(12)	(2)	(18)	(64)	(16)
<b>AT+</b>	0	4	1	4	1	5	6	7
(n=19)	(0)	(21)	(58)	(21)	(5)	(26)	(32)	(37)

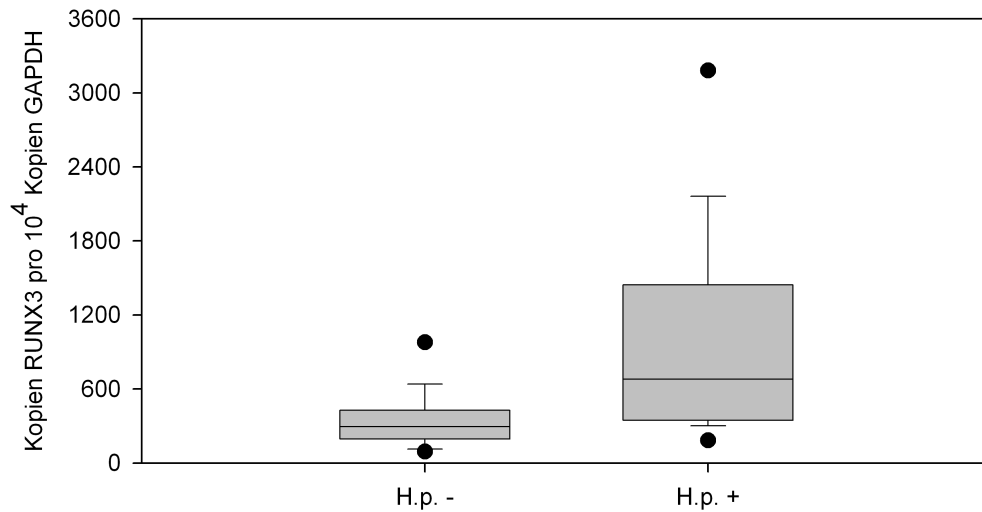
**Tabelle 3.3:** Überblick über die histologische Einteilung der Patienten mit *H. pylori*-assoziierter Gastritis; Werte in Klammern sind — falls nicht anders angegeben — prozentuale Anteile an der gesamten Patientengruppe

beschriebenen Methodik. Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht über die histologische Einteilung aller *H. pylori*-positiven Patienten und der daraus gebildeten Gruppen.

### **RUNX3-Expression in Abhängigkeit des Helicobacterstatus**

Aus dem Kollektiv von 69 Patienten mit *H. pylori*-positiver Gastritis wurden diejenigen ausgewählt, deren Magenschleimhaut noch keine fortgeschrittenen histologischen Veränderungen wie Atrophie oder intestinale Metaplasie aufwies. Mittels quantitativer RT-PCR wurde nun in den Magenbiopsien dieser 42 Patienten die RUNX3-mRNA-Expression bestimmt und mit der Expression in Biopsien von 45 gesunden Kontrollpatienten verglichen. Abbildung 3.6 auf der nächsten Seite zeigt, dass auch in dieser Patientenpopulation die RUNX3-Expression in der erkrankten Magenmucosa signifikant *höher* ist als in gesunder Schleimhaut ( $P \leq 0,001$ ).

Dies bestätigt zum einen die aus formalinfixierten Geweben gewonnenen Messergebnisse und zeigt zum anderen, dass die Art der Fixierung durchaus einen zu berücksichtigenden Einfluss auf die quantitative PCR hat: Vergleicht man die Kopienzahlen für RUNX3 aus FFPE-Gewebe mit denen aus „fresh-frozen“ Biopsien, fällt auf, dass erstere im Median circa um das 2,5-fache niedriger liegen, obwohl beide Werte auf GAPDH normalisiert sind. Dieser Effekt ist vermutlich auf die Degradation der Nukleinsäuren durch Formaldehyd zurückzuführen: Ein in geringerer Menge exprimiertes Gen sollte während der ersten Zyklen der PCR durch ein schlechteres Enzym-Substrat-Verhältnis stärker benachteiligt werden als ein Housekeeping-Gen wie GAPDH. Die Signifikanz zwischen den innerhalb eines Kollektivs verglichenen Gruppen bleibt indes gleich groß.

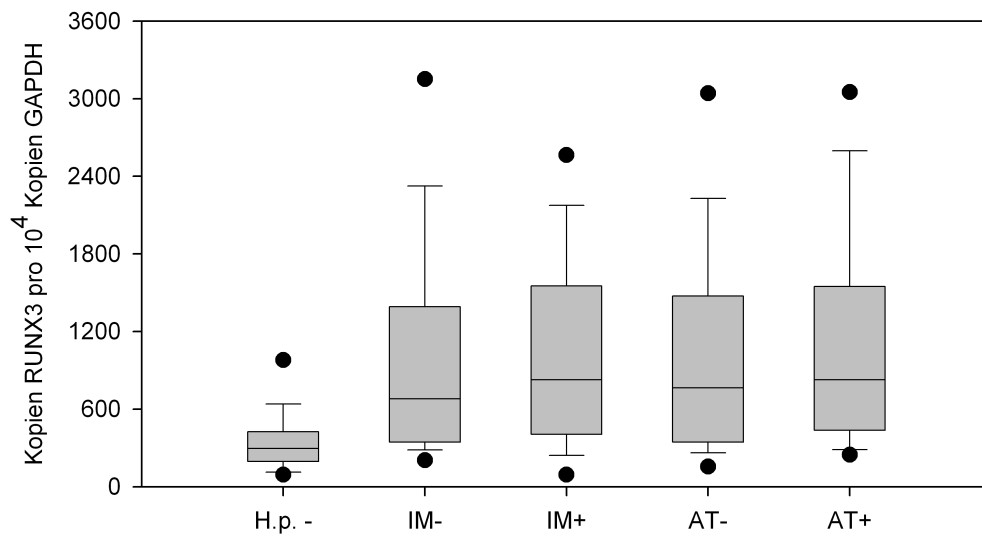


**Abbildung 3.6:** *RUNX3*-mRNA-Expression in *H. pylori*-infizierter, durch Schockgefrierung fixierter Magenschleimhaut ohne schwere histologische Veränderungen (*H.p.* +,  $n=42$ ) verglichen mit gesunder, *H. pylori*-negativer Mucosa (*H.p.* -,  $n=45$ ); der gemessene Unterschied ist signifikant mit  $P \leq 0,001$

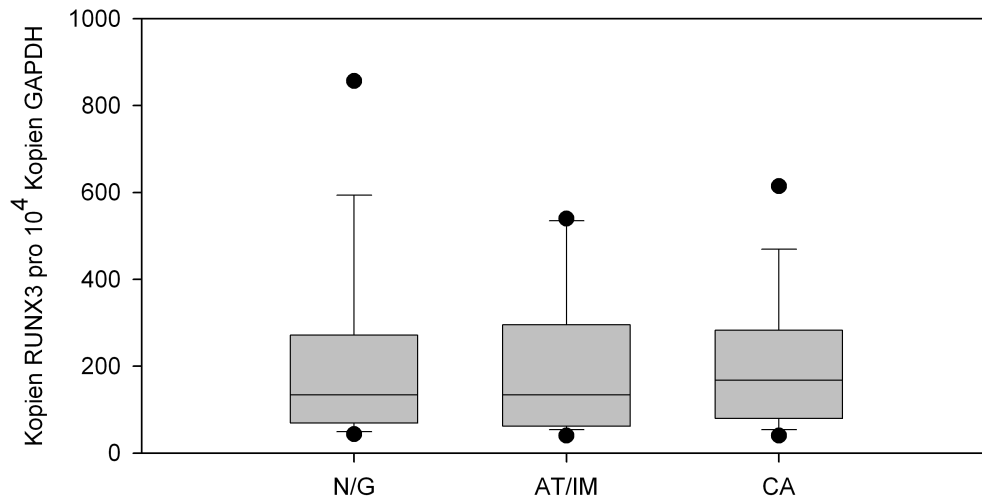
### RUNX3-Expression in Abhängigkeit von histologischen Veränderungen

Angesichts der obigen Erkenntnisse stellt sich die Frage, ob in den späteren Stadien der Karzinogenese eine Verminderung der RUNX3-Expression zu beobachten ist. Histologische Veränderungen wie intestinale Metaplasie und Atrophie als Spätfolge einer chronischen Gastritis gelten als fakultative Präkanzerosen und könnten daher mit einer erniedrigten RUNX3-Expression assoziiert sein. Hierzu wurden aus den 69 Patienten des oben erwähnten Kollektivs diejenigen Patienten ohne bzw. mit intestinaler Metaplasie (IM-/IM+) und ohne bzw. mit Atrophie (AT-/AT+) der Mucosa ausgewählt. Dann wurde die RUNX3-Expression mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. [Abbildung 3.7 auf der nächsten Seite](#) zeigt, dass Atrophie und intestinale Metaplasie im Vergleich mit gesunder Magenmucosa mit einer signifikanten Erhöhung der RUNX3-Expression assoziiert sind ( $P \leq 0,001$ ). Vergleicht man jedoch *H. pylori*-positive Biopsien mit oder ohne fortgeschrittene histologische Veränderungen untereinander, so finden sich keine signifikanten Unterschiede in der RUNX3-mRNA-Expression ( $P > 0,05$ ).

Demnach ist die *H. pylori*-positive Gastritis sowohl mit als auch ohne fakultativ präkanzeröse histologische Veränderungen mit einer *Erhöhung* der RUNX3-Expression in der Magenmucosa assoziiert. Eine Herunterregulation tritt auch in atrophischer und metaplastischer Schleimhaut nicht auf. Darüberhinaus unterscheidet sich die Expression der RUNX3-mRNA in *H. pylori*-infizierter Mucosa mit Atrophie und Metaplasie nicht von



**Abbildung 3.7:** *RUNX3*-mRNA-Expression in *H. pylori*-infizierter, durch Schockgefrierung fixierter Magenschleimhaut mit und ohne schwere histologische Veränderungen wie Atrophie (AT-/AT+, n=50/19) und intestinale Metaplasie (IM-/IM+, n=48/21) verglichen mit gesunder, *H. pylori*-negativer Mucosa (H.p. -, n=45); die gemessenen Unterschiede zwischen gesundem Gewebe und allen anderen Gruppen sind signifikant mit  $P \leq 0,001$ ; die Unterschiede zwischen den Gruppen AT-/AT+/IM-/IM+ sind nicht statistisch signifikant ( $P > 0,05$ )

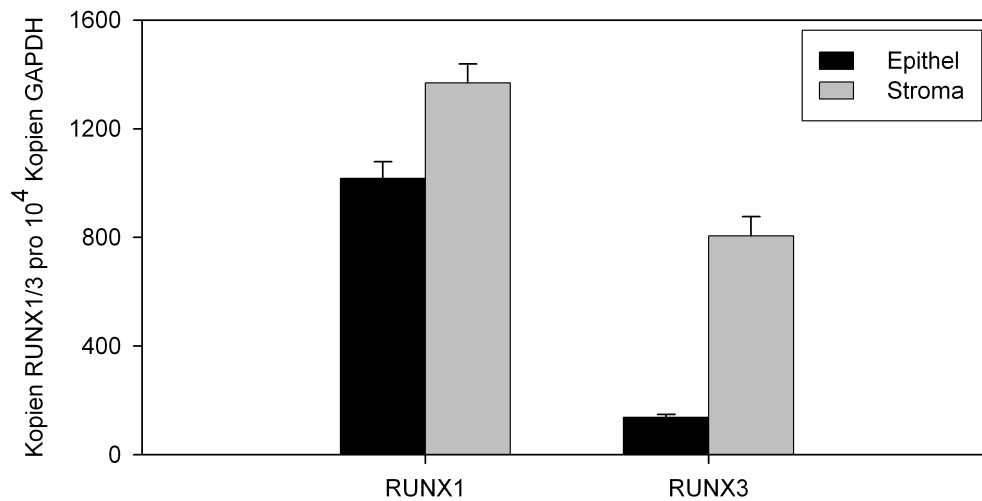


**Abbildung 3.8:** *RUNX3*-mRNA-Expression in Magenschleimhaut mit verschiedenen histologischen Veränderungen: Mucosa ohne schwere histologische Veränderungen (N/G,  $n=44$ ), Mucosa mit Atrophie oder intestinaler Metaplasie (AT/IM,  $n=25$ ), Magenkarzinom vom intestinalen Typ (CA,  $n=36$ ); es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen werden ( $P > 0,05$ )

der Expression in *H. pylori*-infizierter Mucosa ohne diese Veränderungen. Eine mögliche Erklärung für diese Befunde könnte sein, dass die im Rahmen der Entzündungsreaktion einwandernden Leukozyten für die erhöhte RUNX3-Expression im untersuchten Gewebe verantwortlich sind.

### 3.2.4 Keine Assoziation der RUNX3-Expression mit Karzinomen

Die fehlende Assoziation der RUNX3-Expression mit präkanzerösen histologischen Veränderungen kann auch in den formalinfixierten Gewebeproben des ursprünglichen Patientenkollektivs nachvollzogen werden. Abbildung 3.8 vergleicht die RUNX3-Expression atrophischer oder metaplastischer Mucosa mit derjenigen in Magenschleimhaut ohne derartige Veränderungen der Gewebestruktur. Es zeigt sich, dass wie zuvor keine Veränderung der RUNX3-Expression in Abhängigkeit der histologischen Präsentation nachweisbar ist. Darüberhinaus weist auch maligne entartetes Gewebe keine Herunterregulation des Transkriptionsfaktors auf. Dies steht im Widerspruch zu Daten anderer Autoren [109, 114, 139] und wirft die Frage auf, worin diese unterschiedlichen Ergebnisse begründet sind.



**Abbildung 3.9:** *RUNX3- und RUNX1-mRNA-Expression in mikrodisssezierter Magenschleimhaut von 105 Patienten: Vergleich der Expression beider Transkriptionsfaktoren sowohl im Epithel als auch im umgebenden Stroma; für beide sind die Unterschiede zwischen Epithel und Stroma statistisch signifikant mit  $P \leq 0,001$*

### 3.3 RUNX3-Expression in mikrodisssezierter Magenmucosa

Die eindeutige Assoziation der RUNX3-Expression mit dem Inflammationsstatus des Magens lässt vermuten, dass in das Magenstroma infiltrierende Immunzellen die Messergebnisse beeinflussen. Um dies zu verifizieren, muss man sich verfeinerter Untersuchungstechniken bedienen. Eine praktikable Methode stellt hierfür die Mikrodisssektion dar, die es erlaubt, histologischen Gewebeschnitten unter dem Mikroskop gewünschte Zellverbände zu entnehmen und von unerwünschten Teilen zu trennen. In dieser Arbeit wurde laserassistierte Mikrodisssektion genutzt, um aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeproben von 105 Patienten selektiv das Epithel und das Stroma der Magenschleimhaut zu entnehmen und getrennt hinsichtlich der RUNX3-mRNA-Expression zu untersuchen.

#### 3.3.1 RUNX3 wird überwiegend im Stroma exprimiert

Zunächst wurde die Expression von RUNX3-mRNA für das Epithel und das Stroma aller 105 Patienten insgesamt betrachtet. Abbildung 3.9 zeigt, dass die Expression im Stroma wesentlich höher ist als im Epithel ( $P \leq 0,001$ ). Zum Vergleich ist die Expression für den verwandten Transkriptionsfaktor RUNX1 gezeigt, der nicht mit der Karzinogenese im Magen in Verbindung gebracht wird: Hier ist die Expression zwar ebenfalls im Stroma

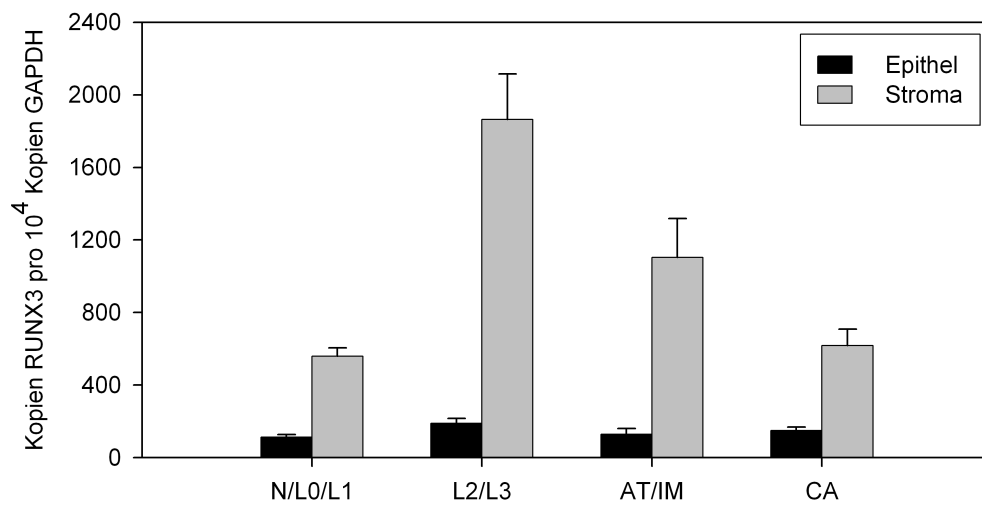
höher ( $P \leq 0,001$ ), jedoch ist die Differenz zwischen beiden Werten deutlich geringer und die Expression im Epithel bewegt sich in etwa in der gleichen Größenordnung.

Diese ungleiche Verteilung der RUNX3-Expression zwischen Stroma und Epithel gilt es bei der Interpretation von Messergebnissen nicht mikrodisezierter Magenschleimhautbiopsien zu beachten: Aussagen zu Expressionveränderungen im Epithel können vor dem um ein Vielfaches höheren Expressionshintergrund des Stromas nicht ohne Weiteres getroffen werden.

### **3.3.2 Die RUNX3-Expression wird im atrophischen, metaplastischen und neoplastischen Epithel nicht herunterreguliert**

Die im Vergleich zum Stroma niedrige Expression von RUNX3 im Magenepithel legt die Vermutung nahe, dass die von anderen Autoren beobachtete Herunterregulation der RUNX3-mRNA in Biopsien der Magenschleimhaut hauptsächlich ein Effekt des Stromas, nicht jedoch durch Regulationsmechanismen des Epithels bedingt ist. Um diese Vermutung zu verifizieren, muss die RUNX3-Expression sowohl im Stroma als auch im Epithel in Abhängigkeit der Histologie der Mucosa untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die 105 Patienten des Kollektivs je nach Histologie der Magenschleimhaut in vier Gruppen eingeteilt und die RUNX3-Expression bestimmt. [Abbildung 3.10 auf der nächsten Seite](#) zeigt, dass die Expression im Epithel von der Histologie unabhängig ist ( $P > 0,05$ ). Die gemessene Menge mRNA bleibt in allen betrachteten Gruppen unverändert niedrig und insbesondere in atrophischem/metaplastischem und malignem Epithel kann keine Herunterregulation oder sonstige Veränderung beobachtet werden ( $P > 0,05$ ). Gänzlich anders stellt sich die Situation im Stroma dar: Hier ist die RUNX3-Expression eindeutig mit dem histologischen Befund korreliert. Deutlich zeigt sich der Zusammenhang zwischen der Expression und der Chronizität der Entzündung gemessen am Grad der lymphozytären Infiltration: Stroma der Gruppen L2/L3 und AT/IM (zu 80% Grad L2, siehe [Tabelle 3.1 auf Seite 54](#)) zeigt signifikant ( $P \leq 0,001$ ) höhere RUNX3-Werte als Stroma aus gesunder oder geringgradig entzündeter Mucosa (N/L0/L1).

Je nach Histologie der Magenschleimhaut findet man in der Magenschleimhaut also deutliche Unterschiede der RUNX3-mRNA-Expression. Diese werden jedoch ausschließlich von Veränderungen im Stroma verursacht und sind nicht auf Regulationsvorgänge in der Epithelschicht zurückzuführen. Vermutlich müssen somit auch von anderen Autoren beobachtete Veränderungen von RUNX3 in nicht mikrodisezierten Biopsien von Magenkarzinomen auf Effekte im Stroma zurückgeführt werden.



**Abbildung 3.10:** *RUNX3*-mRNA-Expression in mikrodissezierter Magenschleimhaut von 105 Patienten: Vergleich der Expression im Epithel und im umgebenden Stroma in Abhängigkeit der histopathologischen Präsentation; (N/L0/L1) keine oder geringgradige Gastritis, (L2/L3) mittel- bis hochgradige Gastritis, (AT/IM) Atrophie und intestinale Metaplasie, (CA) intestinales Magenkarzinom; Expressionsunterschiede im Epithel nicht statistisch signifikant mit  $P > 0,05$ ; Expressionsunterschiede im Stroma statistisch signifikant ( $P \leq 0,01$ ), lediglich Differenz zwischen (N/L0/L1) und (CA) nicht signifikant ( $P > 0,05$ )

## 3.4 Immunhistochemische Untersuchung der RUNX3-Expression

Die Menge an mRNA, die in einer Zelle produziert wird, korreliert in der Regel direkt mit der Menge an produziertem Protein. Die Messung der mRNA-Menge, die in einer Zelle vorhanden ist, lässt sich zudem mittels PCR sehr präzise durchführen. Die Methode berücksichtigt jedoch nur die Ebene der Transkription vom Gen zur mRNA. Deren Translation zum Protein und dessen mögliche Modifikationen zum endgültigen aktiven Genprodukt werden nicht erfasst. Auch die Inaktivierung, die — beispielsweise über das Ubiquitin-Proteasom-System — erheblichen regulatorischen Einfluss nehmen kann, wird nicht berücksichtigt. Daher können Bestimmungen der mRNA-Menge zwar Aufschluss über regulatorische Veränderungen im Bereich der Transkription geben, müssen aber durch weitere Untersuchungen auf Proteinebene gestützt werden, um Einflüsse aus den Bereichen der Translation und des Proteinabbaus nicht zu vernachlässigen.

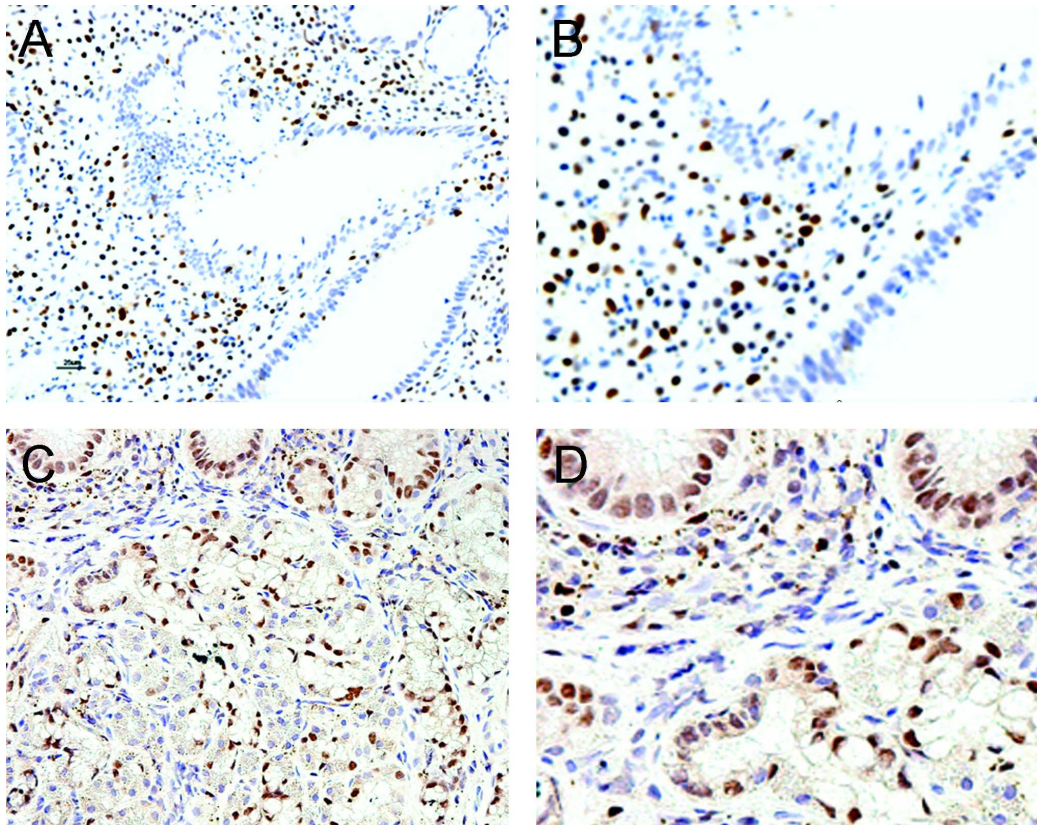
Eine verbreitete Methode zum Nachweis und zur semiquantitativen Abschätzung der Proteinexpression ist die Immunhistochemie. Dabei werden Antikörper, die für das Zielprotein spezifisch sind, auf einen histologischen Gewebeschnitt aufgebracht. Nach erfolgter Bindung an das Protein kann ein geeignet markierter, gegen den ersten Antikörper gerichteter Sekundärantikörper zur indirekten Detektion eingesetzt werden.

### 3.4.1 RUNX3-Protein-Expression in der Magenmucosa

Zur Überprüfung des mittels quantitativer PCR ermittelten Expressionsmusters von RUNX3 in Stroma und Epithel der Magenschleimhaut wurde die RUNX3-Proteinexpression durch Immunhistochemie untersucht. Hierzu wurden histologische Gewebeschnitte der zuvor untersuchten Patienten herangezogen. Als Primärantikörper diente ein polyklonaler Kaninchen-anti-human-RUNX3-Antikörper [87], der freundlicherweise von Dr. Ditsa Levanon und Dr. Yoram Groner (Weizman Institute, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt wurde. [Abbildung 3.11 auf der nächsten Seite](#) zeigt für die untersuchten Patienten repräsentative Schnitte durch entzündete Magenmucosa: RUNX3-Protein (A/B) ist nahezu ausnahmslos im Bindegewebe zwischen den Drüsenanschnitten lokalisiert, wo es als Transkriptionsfaktor in den Zellkernen von eingewanderten Leukozyten exprimiert wird. In der Epithelzellschicht ist hingegen keine Färbung nachweisbar. Dort finden sich lediglich wenige angefärbte Zellkerne von intraepithelialen Lymphozyten. Dieses Expressionsmuster bestätigt die mittels mRNA-Expressionsanalyse erhaltenen Ergebnisse.

Zum Vergleich zeigt [Abbildung 3.11 \(C/D\)](#) die Expression des verwandten Transkriptionsfaktors RUNX1: Im Gegensatz zu RUNX3 ist RUNX1 sowohl im Stroma als auch im Epithel immunhistochemisch nachweisbar und bestätigt damit ebenfalls die per





**Abbildung 3.11:** Immunhistochemischer Nachweis von RUNX3-Protein (A/B) und RUNX1-Protein (C/D) in entzündlich veränderter Magenschleimhaut; schwarz-braune Färbung zeigt das Vorhandensein von RUNX1/3, normale Zellkerne in zartblau durch Hämalaun-Gegenfärbung; Vergrößerung 200-fach (A/C) bzw. 400-fach (B/D)

quantitativer PCR für diesen Transkriptionsfaktor erhaltenen Ergebnisse. Die mittels Immunhistochemie nicht nachweisbare Expression von RUNX3 in Epithelzellen ist schwer mit der Theorie vereinbar, RUNX3-Regulation in Magenepithelien spiele eine wichtige Rolle in der Karzinogenese. Wäre dies der Fall, sollte man für RUNX3 ein ähnliches Expressionsmuster erwarten dürfen wie hier für RUNX1 gezeigt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einleitung

Die Gene der Runt-Familie kodieren in Säugetieren für eine Gruppe aus drei phylogenetisch alten und hochkonservierten Transkriptionsfaktoren. Diese erfüllen essentielle Aufgaben im Rahmen der Hämatopoiese [112], Osteogenese [115], Neurogenese [62, 89] und Thymopoiese [167]. Beim Menschen sind Mutationen und Haploinsuffizienz des RUNX2-Gens verantwortlich für Cleidocraniale Dysplasie [108], während RUNX1 für ca. 30% aller akuten Leukämien verantwortlich gemacht wird [95]. In jüngerer Zeit wurde RUNX3, das phylogenetisch älteste Mitglied der Familie, ebenfalls als Krankheitsursache ins Gespräch gebracht: Auf der Grundlage von Experimenten mit RUNX3-Knockout-Mäusen, welche eine deutliche Hyperplasie der Magenschleimhaut aufweisen, wurde die Hypothese formuliert, es könne sich bei RUNX3 um einen epithelialen Tumorsuppressor handeln, der möglicherweise kausal an der Entstehung des Magenkarzinoms beteiligt sei [94]. Die Ursache für die Hyperplasie wurde der Beteiligung von RUNX3 am TGF $\beta$ -Signalweg [33, 65, 163] zugeschrieben: Die Magenepithelzellen der RUNX3<sup>-/-</sup>-Mäuse sind für den wachstumshemmenden und Apoptose-induzierenden Effekt von TGF $\beta$  weniger empfindlich [94]. Leider kann bei diesen RUNX3<sup>-/-</sup>-Mäusen die Entwicklung von Magenkarzinomen nicht direkt beobachtet werden, weil die Tiere meist am ersten Lebensstag versterben. Unterstützt wird die These jedoch von Beobachtungen am Menschen, wonach RUNX3 in Magenkarzinomen im Vergleich zu Kontrollgewebe geringer exprimiert wird [94, 109, 114, 139].

Durch eine andere Arbeitsgruppe wurde allerdings eine weitere RUNX3-Knockout-Maus generiert [89], deren Phänotyp wichtige Unterschiede aufweist: Die Tiere überleben bis zu zwei Jahre, entwickeln erst nach frühestens acht Lebensmonaten eine Hyperplasie der Magenmucosa und zeigen nie Magenkarzinome [9]. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen RUNX3-Knockouts lassen sich wohl darauf zurückführen, dass der Transkriptionsfaktor im Magenepithel derjenigen Mäuse mit früher Hyperplasie deutlich exprimiert wird, in dem der Mäuse mit später Hyperplasie jedoch mit den gleichen Nachweismethoden nicht gefunden wird [87, 90].

Die beobachtete Diskrepanz zwischen den Phänotypen ist höchstwahrscheinlich auf die unterschiedliche Methodik und die verschiedenen genetischen Hintergründe der verwendete-

ten Mausstämme zurückzuführen [2, 90]. Jedenfalls müssen die genetischen Unterschiede zwischen beiden Knockouts vergleichsweise subtil sein, da die beobachtete Pathologie des Magens und deren Auswirkung auf die Lebenserwartung der einzige wesentliche Unterschied zwischen beiden Knockouts ist: Hinsichtlich der Auswirkungen der RUNX3-Defizienz auf die Thymopoese [152, 167] und Rückenmarks-Neurogenese [62, 89] zeigen beide Mausmodelle identische Phänotypen.

Interessanterweise sind RUNX3-Knockout-Mäuse nicht der einzige Punkt, an dem die Thematik kontrovers diskutiert wird: Bei der Untersuchung der RUNX3-Protein-Expression in menschlicher Magenschleimhaut kamen Autoren ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen. Einerseits berichten einige über den immunhistochemischen Nachweis von RUNX3-Protein in menschlicher Magenschleimhaut [63, 113, 162], andererseits können diese Ergebnisse von anderen Autoren nicht nachvollzogen werden [14]. Bei diesen Experimenten kamen jeweils unterschiedliche, selbst hergestellte RUNX3-spezifische Antikörper zum Einsatz, die jedoch — wie bei derartigen Studien üblich — von den Autoren entsprechend validiert wurden.

Aufgrund dieser diskrepanten Beobachtungen ist die Beteiligung von RUNX3 an der Karzinogenese des Magens ungeklärt. Ob der Transkriptionsfaktor, wie von Li et al. vorgeschlagen [94], als epithelialer Tumorsuppressor wirkt, hängt maßgeblich von dessen kontrovers diskutierter Expression im Magenepithel ab. Indizien wie die verminderte RUNX3-Expression in menschlichen Magenkarzinomen [94, 109, 114, 139] lassen diesbezüglich keine definitive Aussage zu. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie stark RUNX3 in der Magenschleimhaut des Menschen exprimiert wird, inwieweit diese Expression von pathologischen Zuständen der Mucosa abhängig ist und ob diesbezüglich Unterschiede zwischen den beiden histologischen Kompartimenten der Schleimhaut bestehen.

## 4.2 RUNX3 und das Magenkarzinom des Menschen

### 4.2.1 Gesteigerte RUNX3-Expression in entzündeter Magenschleimhaut

Andere Autoren haben gezeigt, dass RUNX3 in Magenkarzinomen geringer exprimiert wird und interpretierten dies als Hinweis auf eine Wirkung als epithelialer Tumorsuppressor [94, 109, 114, 139]. Zur Ergänzung dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit die RUNX3-Expression in Magenmucosa evaluiert, die mit dem Magenkarzinom assoziierte histologische Veränderungen aufwies: Magenschleimhaut mit *H. pylori*-positiver Gastritis, Atrophie und intestinaler Metaplasie wurde mittels PCR-basierter Expressionsanalyse auf die Expression von RUNX3 untersucht und mit der Magenschleimhaut von gesunden Kontrollpatienten verglichen. Interessanterweise konnte dabei eine deutliche Assoziation

der RUNX3-Expression mit dem *H. pylori*-Status und der damit vorliegenden Inflammation beobachtet werden (Abbildung 3.6 auf Seite 58): In entzündeter Schleimhaut war der Transkriptionsfaktor generell hochreguliert, unabhängig davon, ob präkanzeröse Läsionen wie Atrophie und Metaplasie vorhanden waren oder nicht (Abbildung 3.7 auf Seite 59).

Ein Expressionsverlust in Magenschleimhaut, die mit der Karzinogenese assoziierte Vorläuferläsionen aufweist, wäre ein weiteres Indiz für eine Wirkung von RUNX3 als epithelialer Tumorsuppressor. Dies konnte hier jedoch nicht beobachtet werden. Die im Gegenteil bei Vorliegen einer *H. pylori*-assoziierten Gastritis sogar gesteigerte Expression wirft die Frage auf, ob die Entzündungsreaktion eine wesentliche Ursache hierfür darstellt.

#### 4.2.2 Expressionsmuster in der Magenmucosa

RUNX3 spielt als Transkriptionsfaktor eine bedeutende Rolle in verschiedenen Zellen des Immunsystems — unter anderem auch in Lymphozyten [26, 33, 87, 152, 167]. Die deutliche Korrelation der RUNX3-Expression der Magenschleimhaut mit der Inflammation deutet darauf hin, dass infiltrierende, RUNX3-exprimierende Immunzellen verantwortlich für die gesteigerte Expression sind.

Die Bestimmung der RUNX3-Expression in mittels Mikrodissektion getrenntem Stroma und Epithel bestätigte diese Annahme: Die Expression des Transkriptionsfaktors im Epithel war vergleichsweise gering, im Stroma hingegen deutlich höher (Abbildung 3.9 auf Seite 61). Zum Vergleich ist die Expression von RUNX1 dargestellt, die in beiden Gewebekompartimenten ähnlich war. Wie bei nicht-mikrodissezierter Schleimhaut war die RUNX3-Expression im Stroma positiv mit dem Grad der Inflammation korreliert (Abbildung 3.10 auf Seite 63). In der Tat zeigte die immunhistochemische Färbung RUNX3-Proteinexpression in Lymphozyten des Stromas, während die Epithelzellen nicht angefärbt wurden (Abbildung 3.11 auf Seite 65). Lediglich vereinzelt fanden sich RUNX3-positive intraepitheliale Lymphozyten. RUNX1 konnte hingegen sowohl im Epithel als auch im Stroma nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen decken sich mit denen von Carvalho et al., die immunhistochemisch ebenfalls keine epitheliale RUNX3-Aktivität in der Magenmucosa nachweisen konnten [14].

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigen, dass zumindest in entzündeter Magenschleimhaut der Großteil der messbaren RUNX3-mRNA-Expression im Stroma lokalisiert ist. Begnügt man sich mit der Bestimmung der RUNX3-Expression in der gesamten Mucosa, anstatt Stroma und Epithel getrennt zu betrachten, sind mögliche Veränderungen durch Regulationsvorgänge in den Epithelzellen vor der Hintergrundexpression im Stroma schwer nachweisbar. Außerdem kann diese die Messergebnisse deutlich verfälschen und möglicherweise zu fehlerhaften Schlussfolgerungen führen: Nach gängiger Vorstellung ist die *H. pylori*-Gastritis die wesentliche Ursache der Karzinomentstehung im Magen. Somit

kann man davon ausgehen, dass zur Untersuchung der Karzinogenese in der Regel von Immunzellen infiltrierte Magenmucosa untersucht wird. Wird dabei auf Mikrodissektion verzichtet, können die beobachteten Expressionsveränderungen fälschlicherweise dem Epithel zugeordnet werden. Da der Grad der Infiltration dabei unter anderem mit den verschiedenen histologischen Parametern korreliert ist, werden zwischen Histologie und RUNX3-Regulation Zusammenhänge hergestellt, die gar nicht existieren.

#### 4.2.3 Kein Expressionsverlust in intestinalen Magenkarzinomen

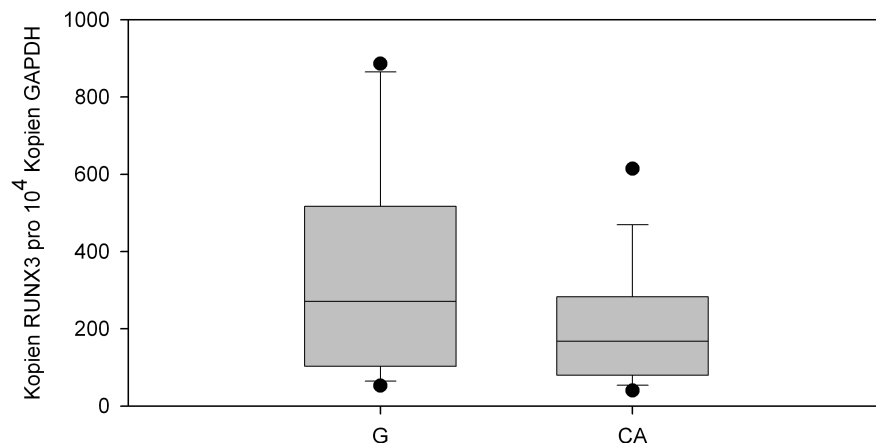
Wie bereits erwähnt kam es in nicht-maligner Mucosa abhängig vom Grad der Inflammation zu einer Steigerung der RUNX3-Expression. Auch die fakultativ präkanzerösen Läsionen Atrophie und intestinale Metaplasie waren mit einer gegenüber gesunder Schleimhaut vermehrten Expression assoziiert. Obwohl Beobachtungen anderer Autoren zufolge die RUNX3-Expression in Magenkarzinomen abnimmt [94, 109, 114, 139], konnte dies hier nicht bestätigt werden: Zwischen der mRNA-Expression in intestinalen Magenkarzinomen und derjenigen in Atrophie und Metaplasie wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Abbildung 3.8 auf Seite 60).

Bei der Bestimmung der RUNX3-Expression in mikrodissezierten Epithelzellen fiel auf, dass diese unverändert blieb, unabhängig davon, ob es sich um gesundes, histologisch verändertes oder malignes Gewebe handelte (Abbildung 3.10 auf Seite 63). Zusammen mit der Expression im Stroma wird damit deutlich, dass Veränderungen des RUNX3-mRNA-Profiles der gesamten Magenschleimhaut ausschließlich auf das Entzündungsinfiltrat zurückzuführen sind. In Epithelzellen war der Transkriptionsfaktor weder in prämaligen Stadien der Mucosa herunterreguliert, noch ging seine Expression in maligner Schleimhaut verloren, sondern blieb auf äußerst niedrigem Niveau unverändert. Das Fehlen einer Herunterregulation der RUNX3-Expression sowohl in malignen als auch nicht-malignen Epithelzellen spricht nicht für eine Funktion als epithelialer Tumorsuppressor.

### 4.3 RUNX3 und Karzinogenese — eine Kontroverse

Untersuchungen anderer Autoren zur RUNX3-Expression in Magenkarzinomen haben ergeben, dass der Transkriptionsfaktor in maligner Schleimhaut deutlich geringer exprimiert wird als in gesundem Kontrollgewebe [94, 109, 114, 139]. In scheinbarem Widerspruch hierzu kommt die vorliegende Arbeit zu dem Schluss, dass die RUNX3-mRNA-Expression in den Epithelzellen unverändert bleibt, unabhängig von der Histopathologie der Schleimhaut. Weder präkanzeröse Läsionen noch maligne entartete Epithelien unterscheiden sich in der Expression des Transkriptionsfaktors von gesunden Kontrollen.

Die Ursache, weshalb die von anderen festgestellte Herunterregulation sich bei genauerer



**Abbildung 4.1:** *RUNX3-Expression der Magenmucosa: Vergleich entzündeter, ansonsten histologisch unveränderter Schleimhaut (G, n=20) mit maligner Schleimhaut (CA, n=36)*

Untersuchung nicht bestätigen läßt, liegt in der verwendeten Methodik: Jeder der vier genannten Autoren verzichtete zur Messung der RUNX3-Expression auf die Trennung von Epithel und Stroma, beispielsweise mittels Mikrodisektion. Wie bereits dargelegt, hat jedoch der weitaus größte Teil der nachgewiesenen RUNX3-mRNA seinen Ursprung im Stroma, wodurch verlässliche Aussagen zu Expressionsänderungen im Epithel nur bei getrennter Untersuchung beider Kompartimente möglich sind.

Häufig wird bei Expressionsanalysen nicht-malignes Gewebe aus der Umgebung eines Tumors als „gesundes“ Kontrollgewebe herangezogen. Ohne Mikrodisektion ist dies jedoch aufgrund der deutlichen Abhängigkeit der RUNX3-Expression von der Inflammation im Stroma problematisch: So könnte beispielweise eine beobachtete Minderung der RUNX3-Expression in Magenkarzinomen damit erklärt werden, dass in den verwendeten Kontrollen mehr Immunzellen-reiches Stroma enthalten war als in den untersuchten Tumorzellen. Angesichts der unbestrittenen Bedeutung der Inflammation in der gastralen Karzinogenese ist diese Annahme legitim. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 4.1 eine Gegenüberstellung der RUNX3-Expression in intestinalen Magenkarzinomen und in entzündeter, ansonsten jedoch histologisch unveränderter Schleimhaut: Es wird deutlich, dass entzündete Mucosa tendenziell eine höhere RUNX3-Expression aufweist und damit kein geeignetes Kontrollgewebe darstellt. In der Tat haben drei der erwähnten Autoren, die mittels quantitativer PCR die RUNX3-Expression in Magenkarzinomen analysiert haben, die den Karzinomen benachbarte Mucosa als Kontrollgewebe genutzt und damit einen systematischen Fehler im Versuchsaufbau verursacht [94, 114, 139]. Ein weiterer Autor nutzte zwar die endoskopisch gewonnene normale Mucosa von Patienten einer

Kontrollgruppe, verzichtete jedoch ebenfalls auf eine Mikrodissektion des Gewebes [109]. Dies erklärt, wieso die Autoren eine Herunterregulation vermuteten, obwohl bei genauerer Betrachtung mikrodissezierten Epithels keine Expressionsveränderungen festzustellen sind.

Unterschiedliche Ergebnisse erbrachte auch der immunhistochemische Nachweis von RUNX3-Protein in der Magenschleimhaut durch verschiedene Autoren. In dieser Arbeit konnte die von Carvalho et al. [14] und von Levanon et al. [87] gemachte Beobachtung nachvollzogen werden, dass RUNX3-Protein in menschlichen Magenepithelzellen nicht nachweisbar ist. Andere Autoren hingegen konnten mit unterschiedlichen RUNX3-spezifischen Antikörpern eine positive Färbung im Magenepithel erkennen [63], wenngleich diese, wie Carvalho et al. feststellen [14], in einem Fall [113] für einen Tumorsuppressor uncharakteristisch im Cytoplasma, und nicht im Kern, lokalisiert ist und damit möglicherweise unspezifisch zustande kam.

## 4.4 Ein mögliches Modell zu RUNX3 und gastraler Karzinogenese

### 4.4.1 RUNX3 ist kein epithelialer Tumorsuppressor

Zur Karzinogenese ist nach Knudsons „Two Hit“-Hypothese der Verlust beider Allele eines Tumorsuppressors notwendig [75]. Mögliche Mechanismen, die dies gewährleisten, sind Mutationen, Loss of Heterozygosity (LOH) und epigenetisches „Silencing“ durch Promoter-Hypermethylierung. Bisher wurden keine Mutationen identifiziert, die RUNX3 mit dem Magenkarzinom assoziieren. Li et al. führten den Verlust der RUNX3-Expression in humanen Magenkarzinomen auf häufig auftretende Promoter-Hypermethylierung zurück [94], was von anderen Autoren bestätigt wurde [109, 114, 139]. Epigenetisches Silencing durch Hypermethylierung der Promoterregion wurde für RUNX3 auch bei einer Reihe weiterer maligner Tumoren des Menschen festgestellt [69, 74, 81, 102, 107, 140, 149].

Grundsätzlich ist aberrante Promoter-Methylierung ein geeigneter Mechanismus, um den Expressionsverlust eines Tumorsuppressors zu erklären [53]. Es wurde gezeigt, dass generell Promoter-Hypermethylierung mit dem Alter zunimmt [172] — unter anderem auch in der Magenmucosa [145] — und damit eine mögliche Erklärung für die beobachtete Altersabhängigkeit bestimmter Karzinome sein könnte. Außerdem konnte für einige Gene ein Zusammenhang zwischen Karzinogenese und Hypermethylierung des Promoters aufgezeigt werden — als Beispiele sollen BRCA [97], CDH1/E-Cadherin [96] und MLH1 [52] genannt sein.

Allerdings ist nicht geklärt, in welchem Stadium der Karzinogenese vermehrte Methylierung eine wesentliche Rolle spielt: Kann sie die Ursache der malignen Transformation



sein, oder ist sie eher eine Folge derselben [32] und erlangt ihre Bedeutung durch Modifikation der Eigenschaften eines bereits bestehenden Tumors, wie beispielsweise eine Steigerung des Invasions- und Metastasierungspotentials [4]. Ob die bei Magenkarzinomen beobachtete Promotermethylierung daher ursächlich für deren Entstehung oder lediglich ein Epiphänomen der Karzinogenese ist, ist bisher nicht belegt.

Auch Loss of Heterozygosity wurde mit RUNX3 und gastralere Karzinogenese in Verbindung gebracht: Der Begriff Loss of Heterozygosity (LOH) beschreibt den Verlust eines von zwei elterlichen Allelen eines Gens, beispielsweise durch Deletion oder Chromosomenverlust. Ist das verbleibende Allel defekt oder insuffizient, führt LOH eines Tumorsuppressors zur Entstehung eines Karzinoms. Li et al. zeigten, dass 30% der von ihnen untersuchten Magenkarzinome hemizygote Deletionen von RUNX3 aufwiesen [94]. Daraus folgerten die Autoren, dass LOH im Zusammenspiel mit Promoter-Hypermethylierung für den Expressionsverlust von RUNX3 verantwortlich sei, was zur Karzinogenese führe und damit für eine Tumorsuppressoraktivität des Transkriptionsfaktors spreche. Dieser Ansicht wird jedoch von Carvalho et al. widersprochen, die in Untersuchungen an Magenkarzinomen zwar bestätigen, dass einzelne RUNX3-Allele in malignen Zellen verloren gehen. Da diese Tumorzellen jedoch meist polyploid sind, verbleiben trotzdem mindestens zwei Allele in den Zellen [14] und verhindern somit einen Funktionsverlust.

Bisher ist in der Literatur daher nur der Expressionsverlust in humanen Magenkarzinomen als Indiz für eine Funktion von RUNX3 als Tumorsuppressor angeführt [94, 109, 114, 139]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entkräften dieses Indiz und zeigen, dass die beobachtete Herunterregulation in Magenkarzinomen auf einer Fehlinterpretation der mittels unzureichender Nachweismethoden erhobenen Daten beruht. Tatsächlich findet in Magenepithelien im Rahmen der Karzinogenese keine RUNX3-Regulation statt. Zusammen mit den Erkenntnissen von Carvalho et al. ermöglicht dies, RUNX3 als epithelialen Tumorsuppressor im Magen auszuschließen.

#### 4.4.2 RUNX3, TGF $\beta$ und Karzinogenese im Stroma

Eine Funktion von RUNX3 als epithelialer Tumorsuppressor im Magen kann nach aktueller Datenlage ausgeschlossen werden. Trotzdem bleibt eine interessante Frage bisher unbeantwortet: Aus welchem Grund entwickeln beide verfügbaren RUNX3-Knockout-Modelle eine Hyperplasie der Magenschleimhaut? Zwar unterscheidet sich der zeitliche Rahmen erheblich — ab Geburt bei dem einen, frühestens nach 8 Monaten bei dem anderen Mausstamm. Nichtsdestoweniger muss ergründet werden, ob, und wenn ja, wie, der RUNX3-Verlust für dieses Phänomen verantwortlich ist.

Einen vielversprechenden Ansatz bietet hier die mittlerweile gut belegte [48, 103, 163] Interaktion von RUNX3 mit den am TGF $\beta$ -Signaling beteiligten Proteinen SMAD2 und

SMAD3. TGF $\beta$  inhibiert das Zellwachstum durch Induktion der CDK-Inhibitoren p21 und p15 und durch Suppression des Proto-Oncogens c-myc [17, 99]. Außerdem fördert es die Apoptose, unter anderem durch SMAD-vermittelte Induktion von DAP-Kinase [66]. Verlust von RUNX3 beeinträchtigt diesen Signalweg und damit dessen antiproliferative Wirkung. Auf den ersten Blick ergibt sich damit eine naheliegende Erklärung, wie ein RUNX3-Verlust in Epithelzellen zu Hyperproliferation und Karzinomentstehung beitragen könnte. Daher führen Li et al. die bei der von ihnen generierten RUNX3<sup>-/-</sup>-Maus auftretende Hyperplasie der Magenmucosa auf die Beeinträchtigung des TGF $\beta$ -Signalings zurück [94]. Dass der Verlust der RUNX3-Expression Auswirkungen auf das Zellwachstum in malignen Magenepithelien hat, wird durch eine Untersuchung gestützt, die bei forcierter RUNX3-Expression in Magenkarzinomzelllinien vermindertes Wachstum und attenuierte Metastasierungsfähigkeit im Mausmodell zeigen konnte [162].

Da RUNX3 jedoch, wie hier gezeigt wurde, in Magenkarzinomen nicht herunterreguliert wird und damit eine tumorsuppressive Wirkung im Epithel unwahrscheinlich ist, müssen andere Mechanismen in Betracht gezogen werden. Bisher wurde vernachlässigt, welchen Einfluss das zelluläre „Microenvironment“ auf die Karzinogenese hat. Man versteht darunter das umgebende Gewebe und dessen Interaktion mit den Ursprungszellen des Karzinoms und es ist seit langem klar, dass Zellwachstum und Differenzierung keine ausschließliche Funktion der betroffenen Zelle ist, sondern durch Einflüsse wie Zell-Zell-Kontakt und Zytokinmuster des umgebenden Gewebes beeinflusst wird [5].

Im Lichte dieser Überlegungen sind neuere Erkenntnisse über Karzinogenese und TGF $\beta$ -Signaling *außerhalb* der gastrointestinalen Epithelschicht hochinteressant: Kim et al. konnten kürzlich verschiedene SMAD4-Knockout-Mäuse erzeugen, in denen das Protein selektiv entweder in T-Lymphozyten oder in Epithelien deletiert ist [71]. SMAD4 stellt als Ko-Faktor die gemeinsame Endstrecke des TGF $\beta$ /BMP-vermittelten Signalwegs dar und ist damit essentiell für die Signalübertragung. Der selektive Verlust der Expression in *T-Lymphozyten* führt bei diesen Tieren zu einer T<sub>H</sub>2-lastigen Zytokinproduktion und konsekutiv zu einer massiven Proliferation von IgA-produzierenden B-Lymphozyten im Stroma des gesamten Gastrointestinaltrakts. Bedeutender ist allerdings, dass nahezu alle untersuchten Tiere im Laufe ihres Lebens spontane gastrointestinale Karzinome entwickeln. Diese treten aber erstaunlicherweise nicht auf, wenn SMAD4 gezielt in *Epithelien* ausgeschaltet wird. Dies zeigt, dass epitheliale Karzinogenese in gesunden gastrointestinalen Epithelzellen durch Einflüsse des „Microenvironments“ ausgelöst werden kann.

Der zugrundeliegende Mechanismus könnte beispielsweise die erhöhte IL6-Ausschüttung der T-Lymphozyten sein: IL6 reguliert in Magenepithelzellen über seinen Rezeptor gp130 und die Downstream-Signalkaskaden STAT1/3 und Shp2/Ras/Erk unter anderem die Expression der Proteine der TFF-Familie [154]. TFF1 gilt im Magen als Tumorsuppressor [85] und wird durch überhöhtes STAT3-Signaling unterdrückt [67]. Außerdem wird

SMAD7 induziert, welches als Inhibitor der TGF $\beta$ /BMP-Signalwegs wirkt und dadurch wiederum Epithelzellen unempfindlich für dessen wachstumregulierende Wirkungen macht [67].

Angesichts der überaus deutlichen Expression von RUNX3 im Magenstroma und insbesondere in Leukozyten kann man spekulieren, ob die Beteiligung des Transkriptionsfaktors am TGF $\beta$ -Signalweg möglicherweise eine ähnliche Wirkung besitzt. Bisher wurde keine Untersuchung an konditionalen RUNX3-Knockout-Mäusen veröffentlicht, und eines der beiden existierenden RUNX3<sup>-/-</sup>-Modelle verfügt nicht über eine ausreichende Lebenserwartung, um Karzinogenese im Magen beobachten zu können. Interessant ist aber zumindest, dass die RUNX3<sup>-/-</sup>-Mäuse von Levanon et al. mit 100%iger Penetranz eine Colitits entwickeln, deren Phänotyp bezüglich vermehrter Infiltration des Stromas durch B-Lymphozyten und erhöhter IgA-Produktion deutliche Parallelen zu den SMAD4<sup>-/-</sup>-Mäusen aufweist. Diese RUNX3-Knockouts entwickeln im hohen Lebensalter auch eine Hyperplasie der Magenmucosa, deren maligne Entartung jedoch auch in sehr alten Mäusen nicht beobachtet werden konnte [9]. Da RUNX3 in die T-Zell-Entwicklung und insbesondere in die Regulation der CD4-Expression involviert ist [26, 76], eignen sich die vorhandenen Knockout-Mäuse jedoch nur eingeschränkt zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen lymphozytärem Signaling und Karzinogenese. Die Entwicklung einer konditionalen RUNX3-Knockout-Maus könnte sich im Rahmen dieser Fragestellung als fruchtbar erweisen.

## 5 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor RUNX3 wurde vor einiger Zeit mit der Karzinogenese des Magens in Verbindung gebracht und als möglicher epithelialer Tumorsuppressor vorgeschlagen [94]. Da jedoch zwei RUNX3-Knockout-Mausmodelle und mehrere Untersuchungen zur RUNX3-Expression in humaner Magenschleimhaut widersprüchliche Ergebnisse liefern [9, 14, 87, 90, 94, 109, 114, 139], wird diese Hypothese kontrovers diskutiert.

Da in der Literatur bislang lediglich eine Herunterregulation von RUNX3 in Magenkarzinomen als Indiz für eine epitheliale Tumorsuppressoraktivität beim Menschen dokumentiert war, sollte dieses Erkenntnis in der vorliegenden Arbeit ergänzt werden. Histologische Veränderungen der Magenschleimhaut wie *H. pylori*-induzierte Gastritis, Atrophie und intestinale Metaplasie sind mit dem intestinalen Magenkarzinom assoziiert. Daher sollte untersucht werden, ob die RUNX3-Expression auch bei diesen histologischen Befunden verringert ist. Hierzu wurden Magenbiopsien von 105 Patienten mittels PCR-basierter Expressionsanalyse auf ihren RUNX3-mRNA-Gehalt untersucht. Dabei ergab sich, dass die RUNX3-Expression in entzündeter, atrophischer und metaplastischer Mucosa nicht verringert, sondern wider Erwarten sogar erhöht ist. Ferner zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Expression vom Vorliegen einer Entzündung, wohingegen die schweren histologischen Veränderungen Atrophie und Metaplasie keine zusätzlichen Veränderungen bewirken. Ebenso fand sich entgegen anderslautender Berichte in der Literatur keine Verminderung der RUNX3-Expression in 36 Proben von intestinalen Magenkarzinomen. Zum Ausschluss methodischer bedingter Einflüsse aufgrund der Verwendung formalinfixierten Probenmaterials wurden die Ergebnisse an „fresh frozen“ Magenbiopsien von weiteren 114 Patienten validiert.

Die Untersuchung mittels Mikrodissektion in Epithel und Stroma separierter Magenmucosa ergab, dass die RUNX3-Expression im Magenepithel unabhängig von Histopathologie und Dignität unverändert bleibt. Im Stroma hingegen zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Expression vom Grad der Inflammation. Die an nicht mikrodissierter Mucosa beobachteten Veränderungen der RUNX3-Expression sind demnach vollständig auf Vorgänge im Stroma zurückzuführen. Mittels immunhistochemischem Nachweis von RUNX3 konnte gezeigt werden, dass das Bindegewebe infiltrierende, RUNX3 exprimierende Lymphozyten für den Inflammations-assoziierten Anstieg der Expression verantwortlich sind. In der Epithelzellschicht konnte jedoch kein RUNX3-Protein nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse sprechen gegen eine epitheliale Regulation des Transkriptionsfaktors RUNX3 als Ursache der Karzinogenese des Magens. Sie sind sehr gut vereinbar mit den Beobachtungen von Levanon et al. und Carvalho et al., die in Mageneithelien keine RUNX3-Expression nachweisen konnten [14, 87] und zeigten, daß die RUNX3-Aktivität in Magenkarzinomen nicht durch LOH vermindert wird.

Da RUNX3 eine wichtige Rolle in der Differenzierung und Funktion von Immunzellen spielt [26, 33, 76, 87, 152, 167] und Bestandteil des TGF $\beta$ -Signalwegs ist, ist eine Beteiligung an der Karzinogenese des Magens als Folge chronischer Gastritis aber durchaus denkbar: Wie kürzlich im Mausmodell gezeigt wurde, können Defekte im TGF $\beta$ -Signaling von Lymphozyten Magenkarzinome induzieren [71].

# Literaturverzeichnis

- [1] AL-SHAMAHY, H. A.: Seroprevalence of *Helicobacter pylori* among children in Sana'a, Yemen. In: *Ann Saudi Med* 25 (2005), Nr. 4, S. 299–303
- [2] BAE, S. C. ; ITO, Y. : Comment on Levanon et al., "Runx3 knockouts and stomach cancer", in EMBO reports (June 2003). In: *EMBO Rep* 4 (2003), Jun, Nr. 6, S. 538–539
- [3] BAI, Y.-Q. ; YAMAMOTO, H. ; AKIYAMA, Y. ; TANAKA, H. ; TAKIZAWA, T. ; KOIKE, M. ; YAGI, O. K. ; SAITOH, K. ; TAKESHITA, K. ; IWAI, T. ; YUASA, Y. : Ectopic expression of homeodomain protein CDX2 in intestinal metaplasia and carcinomas of the stomach. In: *Cancer Lett* 176 (2002), Feb, Nr. 1, S. 47–55
- [4] BAYLIN, S. ; BESTOR, T. H.: Altered methylation patterns in cancer cell genomes: cause or consequence? In: *Cancer Cell* 1 (2002), May, Nr. 4, S. 299–305
- [5] BISSELL, M. J. ; LABARGE, M. A.: Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? In: *Cancer Cell* 7 (2005), Jan, Nr. 1, S. 17–23
- [6] BONCRISTIANO, M. ; PACCANI, S. R. ; BARONE, S. ; ULIVIERI, C. ; PATRUSSI, L. ; ILVER, D. ; AMEDEI, A. ; D'ELIOS, M. M. ; TELFORD, J. L. ; BALDARI, C. T.: The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. In: *J Exp Med* 198 (2003), Dec, Nr. 12, S. 1887–1897
- [7] BONNET, D. ; DICK, J. E.: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. In: *Nat Med* 3 (1997), Jul, Nr. 7, S. 730–737
- [8] BRENNER, H. ; ARNDT, V. ; STEGMAIER, C. ; ZIEGLER, H. ; ROTHENBACHER, D. : Is *Helicobacter pylori* infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? In: *Am J Epidemiol* 159 (2004), Feb, Nr. 3, S. 252–258
- [9] BRENNER, O. ; LEVANON, D. ; NEGREANU, V. ; GOLUBKOV, O. ; FAINARU, O. ; WOOLF, E. ; GRONER, Y. : Loss of Runx3 function in leukocytes is associated

- with spontaneously developed colitis and gastric mucosal hyperplasia. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004), Nov, Nr. 45, S. 16016–16021
- [10] BRINK, G. R. d. ; HARDWICK, J. C. H. ; NIELSEN, C. ; XU, C. ; KATE, F. J. ; GLICKMAN, J. ; DEVENTER, S. J. H. ; ROBERTS, D. J. ; PEPPELENBOSCH, M. P.: Sonic hedgehog expression correlates with fundic gland differentiation in the adult gastrointestinal tract. In: *Gut* 51 (2002), Nov, Nr. 5, S. 628–633
- [11] BUJANDA, L. ; BEGUIRISTAIN, A. ; VILLAR, J. M. ; COSME, A. ; CASTIELLA, A. ; ARRIOLA, J. A. ; ARENAS, J. I.: [Gastric adenocarcinoma in hamartomatous polyp in Peutz-Jeghers syndrome]. In: *Gastroenterol Hepatol* 19 (1996), Nov, Nr. 9, S. 452–455
- [12] BURES, J. ; KOPÁCOVÁ, M. ; KOUPII, I. ; VORÍSEK, V. ; REJCHRT, S. ; BERÁNEK, M. ; SEIFERT, B. ; POZLER, O. ; ZIVNÝ, P. ; DOUDA, T. ; KOLESÁROVÁ, M. ; PINTÉR, M. ; PALICKA, V. ; HOLCÍK, J. ; PRIMARY CARE GASTROENTEROLOGY, E. S.: Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in the Czech Republic. In: *Helicobacter* 11 (2006), Feb, Nr. 1, S. 56–65
- [13] CARNEIRO, F. ; HUNTSMAN, D. G. ; SMYRK, T. C. ; OWEN, D. A. ; SERUCA, R. ; PHAROAH, P. ; CALDAS, C. ; SOBRINHO-SIMÕES, M. : Model of the early development of diffuse gastric cancer in E-cadherin mutation carriers and its implications for patient screening. In: *J Pathol* 203 (2004), Jun, Nr. 2, S. 681–687
- [14] CARVALHO, R. ; MILNE, A. N. A. ; POLAK, M. ; CORVER, W. E. ; OFFERHAUS, G. J. A. ; WETERMAN, M. A. J.: Exclusion of RUNX3 as a tumour-suppressor gene in early-onset gastric carcinomas. In: *Oncogene* 24 (2005), Dec, Nr. 56, S. 8252–8258
- [15] CHAWENSAKSOPHAK, K. ; JAMES, R. ; HAMMOND, V. E. ; KÖNTGEN, F. ; BECK, F. : Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. In: *Nature* 386 (1997), Mar, Nr. 6620, S. 84–87
- [16] CHENG, X.-X. ; WANG, Z.-C. ; CHEN, X.-Y. ; SUN, Y. ; KONG, Q.-Y. ; LIU, J. ; GAO, X. ; GUAN, H.-W. ; LI, H. : Frequent loss of membranous E-cadherin in gastric cancers: A cross-talk with Wnt in determining the fate of beta-catenin. In: *Clin Exp Metastasis* 22 (2005), Nr. 1, S. 85–93
- [17] CHI, X.-Z. ; YANG, J.-O. ; LEE, K.-Y. ; ITO, K. ; SAKAKURA, C. ; LI, Q.-L. ; KIM, H.-R. ; CHA, E.-J. ; LEE, Y.-H. ; KANEDA, A. ; USHIJIMA, T. ; KIM, W.-J. ; ITO, Y. ; BAE, S.-C. : RUNX3 suppresses gastric epithelial cell growth by inducing p21(WAF1/Cip1) expression in cooperation with transforming growth factor beta-activated SMAD. In: *Mol Cell Biol* 25 (2005), Sep, Nr. 18, S. 8097–8107

- [18] COGGON, D. ; OSMOND, C. ; BARKER, D. J.: Stomach cancer and migration within England and Wales. In: *Br J Cancer* 61 (1990), Apr, Nr. 4, S. 573–574
- [19] CORREA, P. : Helicobacter pylori and gastric cancer: state of the art. In: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5 (1996), Jun, Nr. 6, S. 477–481
- [20] COVER, T. L. ; KRISHNA, U. S. ; ISRAEL, D. A. ; PEEK, R. M.: Induction of gastric epithelial cell apoptosis by Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. In: *Cancer Res* 63 (2003), Mar, Nr. 5, S. 951–957
- [21] CREW, K. D. ; NEUGUT, A. I.: Epidemiology of gastric cancer. In: *World J Gastroenterol* 12 (2006), Jan, Nr. 3, S. 354–362
- [22] DAVIES, G. R. ; SIMMONDS, N. J. ; STEVENS, T. R. ; SHEAFF, M. T. ; BANATVALA, N. ; LAURENSEN, I. F. ; BLAKE, D. R. ; RAMPTON, D. S.: Helicobacter pylori stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. In: *Gut* 35 (1994), Feb, Nr. 2, S. 179–185
- [23] DERAKHSHAN, M. H. ; EL-OMAR, E. ; OIEN, K. ; GILLEN, D. ; FYFE, V. ; CRABTREE, J. E. ; MCCOLL, K. E.: Gastric histology, serological markers and age as predictors of gastric acid secretion in H.pylori infected subjects. In: *J Clin Pathol* (2006), Apr
- [24] DIXON, M. F. ; GENTA, R. M. ; YARDLEY, J. H. ; CORREA, P. : Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. In: *Am J Surg Pathol* 20 (1996), Oct, Nr. 10, S. 1161–1181
- [25] DONTU, G. ; AL-HAJJ, M. ; ABDALLAH, W. M. ; CLARKE, M. F. ; WICHA, M. S.: Stem cells in normal breast development and breast cancer. In: *Cell Prolif* 36 Suppl 1 (2003), Oct, S. 59–72
- [26] EHLERS, M. ; LAULE-KILIAN, K. ; PETTER, M. ; ALDRIAN, C. J. ; GRUETER, B. ; WÜRCH, A. ; YOSHIDA, N. ; WATANABE, T. ; SATAKE, M. ; STEIMLE, V. : Morpholino antisense oligonucleotide-mediated gene knockdown during thymocyte development reveals role for Runx3 transcription factor in CD4 silencing during development of CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> thymocytes. In: *J Immunol* 171 (2003), Oct, Nr. 7, S. 3594–3604
- [27] EKSTRÖM, A. M. ; HELD, M. ; HANSSON, L. E. ; ENGSTRAND, L. ; NYRÉN, O. : Helicobacter pylori in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. In: *Gastroenterology* 121 (2001), Oct, Nr. 4, S. 784–791



- [28] EL-OMAR, E. M.: The importance of interleukin 1beta in Helicobacter pylori associated disease. In: *Gut* 48 (2001), Jun, Nr. 6, S. 743–747
- [29] EL-OMAR, E. M. ; CARRINGTON, M. ; CHOW, W. H. ; MCCOLL, K. E. ; BREM, J. H. ; YOUNG, H. A. ; HERRERA, J. ; LISSOWSKA, J. ; YUAN, C. C. ; ROTHMAN, N. ; LANYON, G. ; MARTIN, M. ; FRAUMENI, J. F. ; RABKIN, C. S.: Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. In: *Nature* 404 (2000), Mar, Nr. 6776, S. 398–402
- [30] ERNST, P. B. ; GOLD, B. D.: The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. In: *Annu Rev Microbiol* 54 (2000), S. 615–640
- [31] ERNST, P. B. ; PEURA, D. A. ; CROWE, S. E.: The translation of Helicobacter pylori basic research to patient care. In: *Gastroenterology* 130 (2006), Jan, Nr. 1, S. 188–206; quiz 212–3
- [32] ETOH, T. ; KANAI, Y. ; USHIJIMA, S. ; NAKAGAWA, T. ; NAKANISHI, Y. ; SASAKO, M. ; KITANO, S. ; HIROHASHI, S. : Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. In: *Am J Pathol* 164 (2004), Feb, Nr. 2, S. 689–699
- [33] FAINARU, O. ; WOOLF, E. ; LOTEM, J. ; YARMUS, M. ; BRENNER, O. ; GOLDENBERG, D. ; NEGREANU, V. ; BERNSTEIN, Y. ; LEVANON, D. ; JUNG, S. ; GRONER, Y. : Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. In: *EMBO J* 23 (2004), Feb, Nr. 4, S. 969–979
- [34] FELDMAN, R. A. ; ECCERSLEY, A. J. ; HARDIE, J. M.: Epidemiology of Helicobacter pylori: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. In: *Br Med Bull* 54 (1998), Nr. 1, S. 39–53
- [35] FIALKOW, P. J.: Clonal origin of human tumors. In: *Biochim Biophys Acta* 458 (1976), Oct, Nr. 3, S. 283–321
- [36] FORMAN, D. ; NEWELL, D. G. ; FULLERTON, F. ; YARNELL, J. W. ; STACEY, A. R. ; WALD, N. ; SITAS, F. : Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. In: *BMJ* 302 (1991), Jun, Nr. 6788, S. 1302–1305
- [37] FUKUSHIMA-NAKASE, Y. ; NAOE, Y. ; TANIUCHI, I. ; HOSOI, H. ; SUGIMOTO, T. ; OKUDA, T. : Shared and distinct roles mediated through C-terminal subdomains

of acute myeloid leukemia/Runt-related transcription factor molecules in murine development. In: *Blood* 105 (2005), Jun, Nr. 11, S. 4298–4307

- [38] GAYTHER, S. A. ; GORRINGE, K. L. ; RAMUS, S. J. ; HUNTSMAN, D. ; ROVIELLO, F. ; GREHAN, N. ; MACHADO, J. C. ; PINTO, E. ; SERUCA, R. ; HALLING, K. ; MACLEOD, P. ; POWELL, S. M. ; JACKSON, C. E. ; PONDER, B. A. ; CALDAS, C. : Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. In: *Cancer Res* 58 (1998), Sep, Nr. 18, S. 4086–4089
- [39] GERHARD, M. ; LEHN, N. ; NEUMAYER, N. ; BOREN, T. ; RAD, R. ; SCHEPP, W. ; MIEHLKE, S. ; CLASSEN, M. ; PRINZ, C. : Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Oct, Nr. 22, S. 12778–12783
- [40] GLYNN, M. K. ; FRIEDMAN, C. R. ; GOLD, B. D. ; KHANNA, B. ; HUTWAGNER, L. ; IIHOSHI, N. ; REVOLLO, C. ; QUICK, R. : Seroincidence of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of rural Bolivian children: acquisition and analysis of possible risk factors. In: *Clin Infect Dis* 35 (2002), Nov, Nr. 9, S. 1059–1065
- [41] GONZALEZ, C. A. ; PERA, G. ; AGUDO, A. ; PALLI, D. ; KROGH, V. ; VINEIS, P. ; TUMINO, R. ; PANICO, S. ; BERGLUND, G. ; SIMAN, H. ; NYRAN, O. ; AGREN, A. ; MARTINEZ, C. ; DORRONSORO, M. ; BARRICARTE, A. ; TORMO, M. J. ; QUIROS, J. R. ; ALLEN, N. ; BINGHAM, S. ; DAY, N. ; MILLER, A. ; NAGEL, G. ; BOEING, H. ; OVERVAD, K. ; TJONNELAND, A. ; BUENO-DE-MESQUITA, H. B. ; BOSHIJZEN, H. C. ; PEETERS, P. ; NUMANS, M. ; CLAVEL-CHAPELON, F. ; HELEN, I. ; AGAPITOS, E. ; LUND, E. ; FAHEY, M. ; SARACCI, R. ; KAAKS, R. ; RIBOLI, E. : Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). In: *Int J Cancer* 107 (2003), Nov, Nr. 4, S. 629–634
- [42] GONZÁLEZ, C. A. ; JAKSZYN, P. ; PERA, G. ; AGUDO, A. ; BINGHAM, S. ; PALLI, D. ; FERRARI, P. ; BOEING, H. ; GIUDICE, G. del ; PLEBANI, M. ; CARNEIRO, F. ; NESI, G. ; BERRINO, F. ; SACERDOTE, C. ; TUMINO, R. ; PANICO, S. ; BERGLUND, G. ; SIMÁN, H. ; NYRÉN, O. ; HALLMANS, G. ; MARTINEZ, C. ; DORRONSORO, M. ; BARRICARTE, A. ; NAVARRO, C. ; QUIRÓS, J. R. ; ALLEN, N. ; KEY, T. J. ; DAY, N. E. ; LINSEISEN, J. ; NAGEL, G. ; BERGMANN, M. M. ; OVERVAD, K. ; JENSEN, M. K. ; TJONNELAND, A. ; OLSEN, A. ; MESQUITA, H. B. B. ; OCKE, M. ; PEETERS, P. H. M. ; NUMANS, M. E. ; CLAVEL-CHAPELON, F. ; BOUTRON-RUAULT, M.-C. ; TRICHOPOULOU, A. ; PSALTOPOULOU, T. ; ROUKOS, D. ; LUND, E. ; HEMON, B. ; KAAKS, R. ; NORAT, T. ; RIBOLI, E. : Meat intake and risk of stomach and esophageal adenocarcinoma within the European Prospective Investigation Into

Cancer and Nutrition (EPIC). In: *J Natl Cancer Inst* 98 (2006), Mar, Nr. 5, S. 345–354

- [43] GONZÁLEZ, C. A. ; PERA, G. ; AGUDO, A. ; MESQUITA, H. B. B. ; CEROTI, M. ; BOEING, H. ; SCHULZ, M. ; GIUDICE, G. D. ; PLEBANI, M. ; CARNEIRO, F. ; BERRINO, F. ; SACERDOTE, C. ; TUMINO, R. ; PANICO, S. ; BERGLUND, G. ; SIMÁN, H. ; HALLMANS, G. ; STENLING, R. ; MARTINEZ, C. ; DORRONSORO, M. ; BARRICARTE, A. ; NAVARRO, C. ; QUIROS, J. R. ; ALLEN, N. ; KEY, T. J. ; BINGHAM, S. ; DAY, N. E. ; LINSEISEN, J. ; NAGEL, G. ; OVERVAD, K. ; JENSEN, M. K. ; OLSEN, A. ; TJØNNELAND, A. ; BÜCHNER, F. L. ; PEETERS, P. H. M. ; NUMANS, M. E. ; CLAVEL-CHAPELON, F. ; BOUTRON-RUAULT, M.-C. ; ROUKOS, D. ; TRICHOPOULOU, A. ; PSALTOPOULOU, T. ; LUND, E. ; CASAGRANDE, C. ; SLIMANI, N. ; JENAB, M. ; RIBOLI, E. : Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). In: *Int J Cancer* 118 (2006), May, Nr. 10, S. 2559–2566
- [44] GROWNEY, J. D. ; SHIGEMATSU, H. ; LI, Z. ; LEE, B. H. ; ADELSPERGER, J. ; ROWAN, R. ; CURLEY, D. P. ; KUTOK, J. L. ; AKASHI, K. ; WILLIAMS, I. R. ; SPECK, N. A. ; GILLILAND, D. G.: Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. In: *Blood* 106 (2005), Jul, Nr. 2, S. 494–504
- [45] GUILFORD, P. ; HOPKINS, J. ; HARRAWAY, J. ; MCLEOD, M. ; MCLEOD, N. ; HARAWIRA, P. ; TAITE, H. ; SCOULAR, R. ; MILLER, A. ; REEVE, A. E.: E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. In: *Nature* 392 (1998), Mar, Nr. 6674, S. 402–405
- [46] HALLING, K. C. ; HARPER, J. ; MOSKALUK, C. A. ; THIBODEAU, S. N. ; PETRONI, G. R. ; YUSTEIN, A. S. ; TOSI, P. ; MINACCI, C. ; ROVIELLO, F. ; PIVA, P. ; HAMILTON, S. R. ; JACKSON, C. E. ; POWELL, S. M.: Origin of microsatellite instability in gastric cancer. In: *Am J Pathol* 155 (1999), Jul, Nr. 1, S. 205–211
- [47] HAMBURGER, A. W. ; SALMON, S. E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. In: *Science* 197 (1977), Jul, Nr. 4302, S. 461–463
- [48] HANAI, J. ; CHEN, L. F. ; KANNO, T. ; OHTANI-FUJITA, N. ; KIM, W. Y. ; GUO, W. H. ; IMAMURA, T. ; ISHIDOU, Y. ; FUKUCHI, M. ; SHI, M. J. ; STAVNEZER, J. ; KAWABATA, M. ; MIYAZONO, K. ; ITO, Y. : Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Oct, Nr. 44, S. 31577–31582

- [49] HANSSON, L. E. ; NYRÉN, O. ; HSING, A. W. ; BERGSTRÖM, R. ; JOSEFSSON, S. ; CHOW, W. H. ; FRAUMENI, J. F. ; ADAMI, H. O.: The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. In: *N Engl J Med* 335 (1996), Jul, Nr. 4, S. 242–249
- [50] HENNESSY, B. ; KÖRBLING, M. ; ESTROV, Z. : Circulating stem cells and tissue repair. In: *Panminerva Med* 46 (2004), Mar, Nr. 1, S. 1–11
- [51] HEPPNER, G. H.: Tumor heterogeneity. In: *Cancer Res* 44 (1984), Jun, Nr. 6, S. 2259–2265
- [52] HERMAN, J. G. ; UMAR, A. ; POLYAK, K. ; GRAFF, J. R. ; AHUJA, N. ; ISSA, J. P. ; MARKOWITZ, S. ; WILLSON, J. K. ; HAMILTON, S. R. ; KINZLER, K. W. ; KANE, M. F. ; KOLODNER, R. D. ; VOGELSTEIN, B. ; KUNKEL, T. A. ; BAYLIN, S. B.: Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Jun, Nr. 12, S. 6870–6875
- [53] HERMAN, J. G. ; BAYLIN, S. B.: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. In: *N Engl J Med* 349 (2003), Nov, Nr. 21, S. 2042–2054
- [54] HIGUCHI, R. ; DOLLINGER, G. ; WALSH, P. S. ; GRIFFITH, R. : Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. In: *Biotechnology (N Y)* 10 (1992), Apr, Nr. 4, S. 413–417
- [55] HOFGAERTNER, W. T. ; THORP, M. ; RAMUS, M. W. ; DELOREFICE, G. ; CHEY, W. Y. ; RYAN, C. K. ; TAKAHASHI, G. W. ; LOBITZ, J. R.: Gastric adenocarcinoma associated with fundic gland polyps in a patient with attenuated familial adenomatous polyposis. In: *Am J Gastroenterol* 94 (1999), Aug, Nr. 8, S. 2275–2281
- [56] HOUGHTON, J. ; STOICOV, C. ; NOMURA, S. ; ROGERS, A. B. ; CARLSON, J. ; LI, H. ; CAI, X. ; FOX, J. G. ; GOLDENRING, J. R. ; WANG, T. C.: Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. In: *Science* 306 (2004), Nov, Nr. 5701, S. 1568–1571
- [57] HOUGHTON, J. ; WANG, T. C.: Helicobacter pylori and gastric cancer: a new paradigm for inflammation-associated epithelial cancers. In: *Gastroenterology* 128 (2005), May, Nr. 6, S. 1567–1578
- [58] HUANG, G. ; SHIGESADA, K. ; ITO, K. ; WEE, H. J. ; YOKOMIZO, T. ; ITO, Y. : Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. In: *EMBO J* 20 (2001), Feb, Nr. 4, S. 723–733

- [59] HUANG, J. Q. ; SRIDHAR, S. ; CHEN, Y. ; HUNT, R. H.: Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. In: *Gastroenterology* 114 (1998), Jun, Nr. 6, S. 1169–1179
- [60] HUSSAIN, S. P. ; HOFSETH, L. J. ; HARRIS, C. C.: Radical causes of cancer. In: *Nat Rev Cancer* 3 (2003), Apr, Nr. 4, S. 276–285
- [61] IARC: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. In: *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 61 (1994), S. 1–241
- [62] INOUE, K. ichi ; OZAKI, S. ; SHIGA, T. ; ITO, K. ; MASUDA, T. ; OKADO, N. ; ISEDA, T. ; KAWAGUCHI, S. ; OGAWA, M. ; BAE, S.-C. ; YAMASHITA, N. ; ITOHARA, S. ; KUDO, N. ; ITO, Y. : Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. In: *Nat Neurosci* 5 (2002), Oct, Nr. 10, S. 946–954
- [63] ITO, K. ; LIU, Q. ; SALTO-TELLEZ, M. ; YANO, T. ; TADA, K. ; IDA, H. ; HUANG, C. ; SHAH, N. ; INOUE, M. ; RAJNAKOVA, A. ; HIONG, K. C. ; PEH, B. K. ; HAN, H. C. ; ITO, T. ; TEH, M. ; YEOH, K. G. ; ITO, Y. : RUNX3, a novel tumor suppressor, is frequently inactivated in gastric cancer by protein mislocalization. In: *Cancer Res* 65 (2005), Sep, Nr. 17, S. 7743–7750
- [64] ITO, Y. : Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. In: *Oncogene* 23 (2004), May, Nr. 24, S. 4198–4208
- [65] ITO, Y. ; MIYAZONO, K. : RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. In: *Curr Opin Genet Dev* 13 (2003), Feb, Nr. 1, S. 43–47
- [66] JANG, C.-W. ; CHEN, C.-H. ; CHEN, C.-C. ; CHEN, J. yun ; SU, Y.-H. ; CHEN, R.-H. : TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. In: *Nat Cell Biol* 4 (2002), Jan, Nr. 1, S. 51–58
- [67] JENKINS, B. J. ; GRAIL, D. ; NHEU, T. ; NAJDOVSKA, M. ; WANG, B. ; WARING, P. ; INGLESE, M. ; MCLOUGHLIN, R. M. ; JONES, S. A. ; TOPLEY, N. ; BAUMANN, H. ; JUDD, L. M. ; GIRAUD, A. S. ; BOUSSIOUTAS, A. ; ZHU, H.-J. ; ERNST, M. : Hyperactivation of Stat3 in gp130 mutant mice promotes gastric hyperproliferation and desensitizes TGF-beta signaling. In: *Nat Med* 11 (2005), Aug, Nr. 8, S. 845–852
- [68] KAMANGAR, F. ; DAWSEY, S. M. ; BLASER, M. J. ; PEREZ-PEREZ, G. I. ; PIETINEN, P. ; NEWSCHAFER, C. J. ; ABNET, C. C. ; ALBANES, D. ; VIRTAMO, J. ; TAYLOR, P. R.: Opposing risks of gastric cardia and noncardia gastric adenocarcinomas associated with *Helicobacter pylori* seropositivity. In: *J Natl Cancer Inst* 98 (2006), Oct, Nr. 20, S. 1445–1452

- [69] KANG, G. H. ; LEE, S. ; LEE, H. J. ; HWANG, K. S.: Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. In: *J Pathol* 202 (2004), Feb, Nr. 2, S. 233–240
- [70] KATO, M. : Trefoil factors and human gastric cancer (review). In: *Int J Mol Med* 12 (2003), Jul, Nr. 1, S. 3–9
- [71] KIM, B.-G. ; LI, C. ; QIAO, W. ; MAMURA, M. ; KASPERCZAK, B. ; ANVER, M. ; WOLFRAIM, L. ; HONG, S. ; MUSHINSKI, E. ; POTTER, M. ; KIM, S.-J. ; FU, X.-Y. ; DENG, C. ; LETTERIO, J. J.: Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer. In: *Nature* 441 (2006), Jun, Nr. 7096, S. 1015–1019
- [72] KIM, C. F. B. ; JACKSON, E. L. ; WOOLFENDEN, A. E. ; LAWRENCE, S. ; BABAR, I. ; VOGEL, S. ; CROWLEY, D. ; BRONSON, R. T. ; JACKS, T. : Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. In: *Cell* 121 (2005), Jun, Nr. 6, S. 823–835
- [73] KIM, J. H. ; TAKAHASHI, T. ; CHIBA, I. ; PARK, J. G. ; BIRNER, M. J. ; ROH, J. K. ; LEE, H. D. ; KIM, J. P. ; MINNA, J. D. ; GAZDAR, A. F.: Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumors and cell lines. In: *J Natl Cancer Inst* 83 (1991), Jul, Nr. 13, S. 938–943
- [74] KIM, W.-J. ; KIM, E.-J. ; JEONG, P. ; QUAN, C. ; KIM, J. ; LI, Q.-L. ; YANG, J.-O. ; ITO, Y. ; BAE, S.-C. : RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors. In: *Cancer Res* 65 (2005), Oct, Nr. 20, S. 9347–9354
- [75] KNUDSON, A. G.: Two genetic hits (more or less) to cancer. In: *Nat Rev Cancer* 1 (2001), Nov, Nr. 2, S. 157–162
- [76] KOHU, K. ; SATO, T. ; OHNO, S.-I. ; HAYASHI, K. ; UCHINO, R. ; ABE, N. ; NAKAZATO, M. ; YOSHIDA, N. ; KIKUCHI, T. ; IWAKURA, Y. ; INOUE, Y. ; WATANABE, T. ; HABU, S. ; SATAKE, M. : Overexpression of the Runx3 transcription factor increases the proportion of mature thymocytes of the CD8 single-positive lineage. In: *J Immunol* 174 (2005), Mar, Nr. 5, S. 2627–2636
- [77] KONNO, M. ; FUJII, N. ; YOKOTA, S. ichi ; SATO, K. ; TAKAHASHI, M. ; SATO, K. ; MINO, E. ; SUGIYAMA, T. : Five-year follow-up study of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by a random amplified polymorphic DNA fingerprinting method. In: *J Clin Microbiol* 43 (2005), May, Nr. 5, S. 2246–2250
- [78] KÖRBLING, M. ; ESTROV, Z. ; CHAMPLIN, R. : Adult stem cells and tissue repair. In: *Bone Marrow Transplant* 32 Suppl 1 (2003), Aug, S. S23–S24

- [79] KUIPERS, E. J. ; MEUWISSEN, S. G.: Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. In: *Scand J Gastroenterol Suppl* 218 (1996), S. 103–105
- [80] KUPER, H. ; ADAMI, H. O. ; TRICHOPOULOS, D. : Infections as a major preventable cause of human cancer. In: *J Intern Med* 248 (2000), Sep, Nr. 3, S. 171–183
- [81] LAU, Q. C. ; RAJA, E. ; SALTO-TELLEZ, M. ; LIU, Q. ; ITO, K. ; INOUE, M. ; PUTTI, T. C. ; LOH, M. ; KO, T. K. ; HUANG, C. ; BHALLA, K. N. ; ZHU, T. ; ITO, Y. ; SUKUMAR, S. : RUNX3 is frequently inactivated by dual mechanisms of protein mislocalization and promoter hypermethylation in breast cancer. In: *Cancer Res* 66 (2006), Jul, Nr. 13, S. 6512–6520
- [82] LAUREN, P. : The two histological main types of gastric cancer: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification. In: *Acta Pathol Microbiol Scand* 64 (1965), S. 31–49
- [83] LEE, J.-H. ; ABRAHAM, S. C. ; KIM, H.-S. ; NAM, J.-H. ; CHOI, C. ; LEE, M.-C. ; PARK, C.-S. ; JUHNG, S.-W. ; RASHID, A. ; HAMILTON, S. R. ; WU, T.-T. : Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. In: *Am J Pathol* 161 (2002), Aug, Nr. 2, S. 611–618
- [84] LEE, K. S. ; KIM, H. J. ; LI, Q. L. ; CHI, X. Z. ; UETA, C. ; KOMORI, T. ; WOZNEY, J. M. ; KIM, E. G. ; CHOI, J. Y. ; RYOO, H. M. ; BAE, S. C.: Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. In: *Mol Cell Biol* 20 (2000), Dec, Nr. 23, S. 8783–8792
- [85] LEFEBVRE, O. ; CHENARD, M. P. ; MASSON, R. ; LINARES, J. ; DIERICH, A. ; LEMEURE, M. ; WENDLING, C. ; TOMASETTO, C. ; CHAMBON, P. ; RIO, M. C.: Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. In: *Science* 274 (1996), Oct, Nr. 5285, S. 259–262
- [86] LEHMANN, U. ; KREIPE, H. : Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. In: *Methods* 25 (2001), Dec, Nr. 4, S. 409–418
- [87] LEVANON, D. ; BRENNER, O. ; NEGREANU, V. ; BETTOUN, D. ; WOOLF, E. ; EILAM, R. ; LOTEM, J. ; GAT, U. ; OTTO, F. ; SPECK, N. ; GRONER, Y. : Spatial and temporal expression pattern of Runx3 (Aml2) and Runx1 (Aml1) indicates non-redundant functions during mouse embryogenesis. In: *Mech Dev* 109 (2001), Dec, Nr. 2, S. 413–417

- [88] LEVANON, D. ; GOLDSTEIN, R. E. ; BERNSTEIN, Y. ; TANG, H. ; GOLDENBERG, D. ; STIFANI, S. ; PAROUSH, Z. ; GRONER, Y. : Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Sep, Nr. 20, S. 11590–11595
- [89] LEVANON, D. ; BETTOUN, D. ; HARRIS-CERRUTI, C. ; WOOLF, E. ; NEGREANU, V. ; EILAM, R. ; BERNSTEIN, Y. ; GOLDENBERG, D. ; XIAO, C. ; FLIEGAUF, M. ; KREMER, E. ; OTTO, F. ; BRENNER, O. ; LEV-TOV, A. ; GRONER, Y. : The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. In: *EMBO J* 21 (2002), Jul, Nr. 13, S. 3454–3463
- [90] LEVANON, D. ; BRENNER, O. ; OTTO, F. ; GRONER, Y. : Runx3 knockouts and stomach cancer. In: *EMBO Rep* 4 (2003), Jun, Nr. 6, S. 560–564
- [91] LEVANON, D. ; GLUSMAN, G. ; BETTOUN, D. ; BEN-ASHER, E. ; NEGREANU, V. ; BERNSTEIN, Y. ; HARRIS-CERRUTI, C. ; BRENNER, O. ; EILAM, R. ; LOTEM, J. ; FAINARU, O. ; GOLDENBERG, D. ; POZNER, A. ; WOOLF, E. ; XIAO, C. ; YARMUS, M. ; GRONER, Y. : Phylogenesis and regulated expression of the RUNT domain transcription factors RUNX1 and RUNX3. In: *Blood Cells Mol Dis* 30 (2003), Nr. 2, S. 161–163
- [92] LEVANON, D. ; GRONER, Y. : Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. In: *Oncogene* 23 (2004), May, Nr. 24, S. 4211–4219
- [93] LI, C. Q. ; PIGNATELLI, B. ; OHSHIMA, H. : Increased oxidative and nitrative stress in human stomach associated with cagA+ *Helicobacter pylori* infection and inflammation. In: *Dig Dis Sci* 46 (2001), Apr, Nr. 4, S. 836–844
- [94] LI, Q. L. ; ITO, K. ; SAKAKURA, C. ; FUKAMACHI, H. ; INOUE, K. ichi ; CHI, X. Z. ; LEE, K. Y. ; NOMURA, S. ; LEE, C. W. ; HAN, S. B. ; KIM, H. M. ; KIM, W. J. ; YAMAMOTO, H. ; YAMASHITA, N. ; YANO, T. ; IKEDA, T. ; ITOHARA, S. ; INAZAWA, J. ; ABE, T. ; HAGIWARA, A. ; YAMAGISHI, H. ; OOE, A. ; KANEDA, A. ; SUGIMURA, T. ; USHIJIMA, T. ; BAE, S. C. ; ITO, Y. : Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. In: *Cell* 109 (2002), Apr, Nr. 1, S. 113–124
- [95] LOOK, A. T.: Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. In: *Science* 278 (1997), Nov, Nr. 5340, S. 1059–1064
- [96] MACHADO, J. C. ; OLIVEIRA, C. ; CARVALHO, R. ; SOARES, P. ; BERX, G. ; CALDAS, C. ; SERUCA, R. ; CARNEIRO, F. ; SOBRINHO-SIMÕES, M. : E-cadherin gene (CDH1)



- promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. In: *Oncogene* 20 (2001), Mar, Nr. 12, S. 1525–1528
- [97] MAGDINIER, F. ; RIBIERAS, S. ; LENOIR, G. M. ; FRAPPART, L. ; DANTE, R. : Down-regulation of BRCA1 in human sporadic breast cancer; analysis of DNA methylation patterns of the putative promoter region. In: *Oncogene* 17 (1998), Dec, Nr. 24, S. 3169–3176
- [98] MARSHALL, B. J. ; WARREN, J. R.: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. In: *Lancet* 1 (1984), Jun, Nr. 8390, S. 1311–1315
- [99] MASSAGUÉ, J. ; BLAIN, S. W. ; LO, R. S.: TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. In: *Cell* 103 (2000), Oct, Nr. 2, S. 295–309
- [100] MCCOLL, K. E. ; OMAR, E. M. ; GILLEN, D. : The role of *H. pylori* infection in the pathophysiology of duodenal ulcer disease. In: *J Physiol Pharmacol* 48 (1997), Sep, Nr. 3, S. 287–295
- [101] MCMICHAEL, A. J. ; MCCALL, M. G. ; HARTSHORNE, J. M. ; WOODINGS, T. L.: Patterns of gastro-intestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change. In: *Int J Cancer* 25 (1980), Apr, Nr. 4, S. 431–437
- [102] MIYAGAWA, K. ; SAKAKURA, C. ; NAKASHIMA, S. ; YOSHIKAWA, T. ; KIN, S. ; NAKASE, Y. ; ITO, K. ; YAMAGISHI, H. ; IDA, H. ; YAZUMI, S. ; CHIBA, T. ; ITO, Y. ; HAGIWARA, A. : Down-regulation of RUNX1, RUNX3 and CBFbeta in hepatocellular carcinomas in an early stage of hepatocarcinogenesis. In: *Anticancer Res* 26 (2006), Nr. 5B, S. 3633–3643
- [103] MIYAZONO, K. ; MAEDA, S. ; IMAMURA, T. : Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF-beta superfamily and Runx proteins. In: *Oncogene* 23 (2004), May, Nr. 24, S. 4232–4237
- [104] MOLINARI, M. ; SALIO, M. ; GALLI, C. ; NORAIS, N. ; RAPPUOLI, R. ; LANZAVECCHIA, A. ; MONTECUCCO, C. : Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. In: *J Exp Med* 187 (1998), Jan, Nr. 1, S. 135–140
- [105] MOREIRA, E. D. ; NASSRI, V. B. ; SANTOS, R. S. ; MATOS, J. F. ; CARVALHO, W. A. ; SILVANI, C. S. ; SANT'ANA, C. S.: Association of *Helicobacter pylori* infection and giardiasis: results from a study of surrogate markers for fecal exposure among children. In: *World J Gastroenterol* 11 (2005), May, Nr. 18, S. 2759–2763

- [106] MOSS, S. F.: Review article: Cellular markers in the gastric precancerous process. In: *Aliment Pharmacol Ther* 12 Suppl 1 (1998), Feb, S. 91–109
- [107] MUELLER, W. ; NUTT, C. L. ; EHRICH, M. ; RIEMENSCHNEIDER, M. J. ; DEIMLING, A. von ; BOOM, D. van d. ; LOUIS, D. N.: Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma. In: *Oncogene* (2006), Aug
- [108] MUNDLOS, S. ; OTTO, F. ; MUNDLOS, C. ; MULLIKEN, J. B. ; AYLSWORTH, A. S. ; ALBRIGHT, S. ; LINDHOUT, D. ; COLE, W. G. ; HENN, W. ; KNOLL, J. H. ; OWEN, M. J. ; MERTELSMANN, R. ; ZABEL, B. U. ; OLSEN, B. R.: Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. In: *Cell* 89 (1997), May, Nr. 5, S. 773–779
- [109] NAKASE, Y. ; SAKAKURA, C. ; MIYAGAWA, K. ; KIN, S. ; FUKUDA, K. ; YANAGISAWA, A. ; KOIDE, K. ; MOROFUJI, N. ; HOSOKAWA, Y. ; SHIMOMURA, K. ; KATSURA, K. ; HAGIWARA, A. ; YAMAGISHI, H. ; ITO, K. ; ITO, Y. : Frequent loss of RUNX3 gene expression in remnant stomach cancer and adjacent mucosa with special reference to topography. In: *Br J Cancer* 92 (2005), Feb, Nr. 3, S. 562–569
- [110] NOMURA, A. ; STEMMERMANN, G. N. ; CHYOU, P. H. ; KATO, I. ; PEREZ-PEREZ, G. I. ; BLASER, M. J.: Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. In: *N Engl J Med* 325 (1991), Oct, Nr. 16, S. 1132–1136
- [111] NOWELL, P. C.: Mechanisms of tumor progression. In: *Cancer Res* 46 (1986), May, Nr. 5, S. 2203–2207
- [112] OKUDA, T. ; DEURSEN, J. van ; HIEBERT, S. W. ; GROSVELD, G. ; DOWNING, J. R.: AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. In: *Cell* 84 (1996), Jan, Nr. 2, S. 321–330
- [113] OSAKI, M. ; MORIYAMA, M. ; ADACHI, K. ; NAKADA, C. ; TAKEDA, A. ; INOUE, Y. ; ADACHI, H. ; SATO, K. ; OSHIMURA, M. ; ITO, H. : Expression of RUNX3 protein in human gastric mucosa, intestinal metaplasia and carcinoma. In: *Eur J Clin Invest* 34 (2004), Sep, Nr. 9, S. 605–612
- [114] OSHIMO, Y. ; OUE, N. ; MITANI, Y. ; NAKAYAMA, H. ; KITADAI, Y. ; YOSHIDA, K. ; ITO, Y. ; CHAYAMA, K. ; YASUI, W. : Frequent loss of RUNX3 expression by promoter hypermethylation in gastric carcinoma. In: *Pathobiology* 71 (2004), Nr. 3, S. 137–143

- [115] OTTO, F. ; THORNELL, A. P. ; CROMPTON, T. ; DENZEL, A. ; GILMOUR, K. C. ; ROSEWELL, I. R. ; STAMP, G. W. ; BEDDINGTON, R. S. ; MUNDLOS, S. ; OLSEN, B. R. ; SELBY, P. B. ; OWEN, M. J.: Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. In: *Cell* 89 (1997), May, Nr. 5, S. 765–771
- [116] OTTO, F. ; LÜBBERT, M. ; STOCK, M. : Upstream and downstream targets of RUNX proteins. In: *J Cell Biochem* 89 (2003), May, Nr. 1, S. 9–18
- [117] PALLI, D. : Epidemiology of gastric cancer: an evaluation of available evidence. In: *J Gastroenterol* 35 Suppl 12 (2000), S. 84–89
- [118] PARK, K. ; KIM, S. J. ; BANG, Y. J. ; PARK, J. G. ; KIM, N. K. ; ROBERTS, A. B. ; SPORN, M. B.: Genetic changes in the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor gene in human gastric cancer cells: correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF-beta. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994), Sep, Nr. 19, S. 8772–8776
- [119] PARKIN, D. M. ; PISANI, P. ; FERLAY, J. : Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. In: *Int J Cancer* 54 (1993), Jun, Nr. 4, S. 594–606
- [120] PARKIN, D. M. ; PISANI, P. ; FERLAY, J. : Global cancer statistics. In: *CA Cancer J Clin* 49 (1999), Nr. 1, S. 33–64, 1
- [121] PARKIN, D. M. ; BRAY, F. ; FERLAY, J. ; PISANI, P. : Global cancer statistics, 2002. In: *CA Cancer J Clin* 55 (2005), Nr. 2, S. 74–108
- [122] PARKIN, D. M.: The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. In: *Int J Cancer* 118 (2006), Jun, Nr. 12, S. 3030–3044
- [123] PARSONNET, J. ; FRIEDMAN, G. D. ; ORENTREICH, N. ; VOGELMAN, H. : Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. In: *Gut* 40 (1997), Mar, Nr. 3, S. 297–301
- [124] PARSONNET, J. ; FRIEDMAN, G. D. ; VANDERSTEEN, D. P. ; CHANG, Y. ; VOGELMAN, J. H. ; ORENTREICH, N. ; SIBLEY, R. K.: *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. In: *N Engl J Med* 325 (1991), Oct, Nr. 16, S. 1127–1131
- [125] PARSONNET, J. ; HANSEN, S. ; RODRIGUEZ, L. ; GELB, A. B. ; WARNKE, R. A. ; JELLUM, E. ; ORENTREICH, N. ; VOGELMAN, J. H. ; FRIEDMAN, G. D.: *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. In: *N Engl J Med* 330 (1994), May, Nr. 18, S. 1267–1271

- [126] PARSONNET, J. ; SHMUELY, H. ; HAGGERTY, T. : Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. In: *JAMA* 282 (1999), Dec, Nr. 23, S. 2240–2245
- [127] PEEK, R. M. ; BLASER, M. J.: *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. In: *Nat Rev Cancer* 2 (2002), Jan, Nr. 1, S. 28–37
- [128] PHAROAH, P. D. ; GUILFORD, P. ; CALDAS, C. ; CONSORTIUM, I. G. C. L.: Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. In: *Gastroenterology* 121 (2001), Dec, Nr. 6, S. 1348–1353
- [129] PUIG-KRÖGER, A. ; CORBÍ, A. : RUNX3: a new player in myeloid gene expression and immune response. In: *J Cell Biochem* 98 (2006), Jul, Nr. 4, S. 744–756
- [130] PUIG-KRÖGER, A. ; SANCHEZ-ELSNER, T. ; RUIZ, N. ; ANDREU, E. J. ; PROSPER, F. ; JENSEN, U. B. ; GIL, J. ; ERICKSON, P. ; DRABKIN, H. ; GRONER, Y. ; CORBI, A. L.: RUNX/AML and C/EBP factors regulate CD11a integrin expression in myeloid cells through overlapping regulatory elements. In: *Blood* 102 (2003), Nov, Nr. 9, S. 3252–3261
- [131] QUERALT, N. ; BARTOLOMÉ, R. ; ARAUJO, R. : Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. In: *J Appl Microbiol* 98 (2005), Nr. 4, S. 889–895
- [132] RAD, R. ; DOSSUMBEKOVA, A. ; NEU, B. ; LANG, R. ; BAUER, S. ; SAUR, D. ; GERHARD, M. ; PRINZ, C. : Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. In: *Gut* 53 (2004), Aug, Nr. 8, S. 1082–1089
- [133] RAD, R. ; PRINZ, C. ; NEU, B. ; NEUHOFER, M. ; ZEITNER, M. ; VOLAND, P. ; BECKER, I. ; SCHEPP, W. ; GERHARD, M. : Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa. In: *J Infect Dis* 188 (2003), Jul, Nr. 2, S. 272–281
- [134] RAMALHO-SANTOS, M. ; MELTON, D. A. ; MCMAHON, A. P.: Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. In: *Development* 127 (2000), Jun, Nr. 12, S. 2763–2772
- [135] RATAJCZAK, M. ; KUCIA, M. ; DOBROWOLSKA, H. ; WANZECK, J. ; RECA, R. ; RATAJCZAK, J. : Emerging concept of cancer as a stem cell disorder. In: *Centr Eur J Biol* 1 (2006), S. 73–87

- [136] RENNERT, J. ; COFFMAN, J. A. ; MUSHEGIAN, A. R. ; ROBERTSON, A. J.: The evolution of Runx genes I. A comparative study of sequences from phylogenetically diverse model organisms. In: *BMC Evol Biol* 3 (2003), Mar, S. 4
- [137] ROMA-GIANNIKOU, E. ; KARAMERIS, A. ; BALATSOS, B. ; PANAYIOTOU, J. ; MANIKA, Z. ; VAN-VLIET, C. ; ROKKAS, T. ; SKANDALIS, N. ; KATTAMIS, C. : Intrafamilial spread of *Helicobacter pylori*: a genetic analysis. In: *Helicobacter* 8 (2003), Feb, Nr. 1, S. 15–20
- [138] ROOSENDAAL, R. ; KUIPERS, E. J. ; BUITENWERF, J. ; UFFELEN, C. van ; MEUWISSEN, S. G. ; KAMP, G. J. ; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.: *Helicobacter pylori* and the birth cohort effect: evidence of a continuous decrease of infection rates in childhood. In: *Am J Gastroenterol* 92 (1997), Sep, Nr. 9, S. 1480–1482
- [139] SAKAKURA, C. ; HAGIWARA, A. ; MIYAGAWA, K. ; NAKASHIMA, S. ; YOSHIKAWA, T. ; KIN, S. ; NAKASE, Y. ; ITO, K. ; YAMAGISHI, H. ; YAZUMI, S. ; CHIBA, T. ; ITO, Y. : Frequent downregulation of the runt domain transcription factors RUNX1, RUNX3 and their cofactor CBFβ in gastric cancer. In: *Int J Cancer* 113 (2005), Jan, Nr. 2, S. 221–228
- [140] SATO, K. ; TOMIZAWA, Y. ; IJIMA, H. ; SAITO, R. ; ISHIZUKA, T. ; NAKAJIMA, T. ; MORI, M. : Epigenetic inactivation of the RUNX3 gene in lung cancer. In: *Oncol Rep* 15 (2006), Jan, Nr. 1, S. 129–135
- [141] SEPULVEDA, A. R.: Molecular testing of *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis and premalignant gastric lesions: clinical implications. In: *J Clin Gastroenterol* 32 (2001), Nr. 5, S. 377–382
- [142] SIAVOSHI, F. ; SALMANIAN, A. H. ; AKBARI, F. ; KBARI, F. A. ; MALEKZADEH, R. ; MASSARRAT, S. : Detection of *Helicobacter pylori*-specific genes in the oral yeast. In: *Helicobacter* 10 (2005), Aug, Nr. 4, S. 318–322
- [143] SILBERG, D. G. ; SULLIVAN, J. ; KANG, E. ; SWAIN, G. P. ; MOFFETT, J. ; SUND, N. J. ; SACKETT, S. D. ; KAESTNER, K. H.: Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. In: *Gastroenterology* 122 (2002), Mar, Nr. 3, S. 689–696
- [144] SINGH, S. K. ; HAWKINS, C. ; CLARKE, I. D. ; SQUIRE, J. A. ; BAYANI, J. ; HIDE, T. ; HENKELMAN, R. M. ; CUSIMANO, M. D. ; DIRKS, P. B.: Identification of human brain tumour initiating cells. In: *Nature* 432 (2004), Nov, Nr. 7015, S. 396–401

- [145] SO, K. ; TAMURA, G. ; HONDA, T. ; HOMMA, N. ; WAKI, T. ; TOGAWA, N. ; NISHIZUKA, S. ; MOTOYAMA, T. : Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia. In: *Cancer Sci* 97 (2006), Nov, Nr. 11, S. 1155–1158
- [146] SPECHT, K. ; RICHTER, T. ; MUELLER, U. ; WALCH, A. ; WERNER, M. ; HOEFLER, H. : Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. In: *Am J Pathol* 158 (2001), Feb, Nr. 2, S. 419–429
- [147] SUERBAUM, S. ; MICHETTI, P. : Helicobacter pylori infection. In: *N Engl J Med* 347 (2002), Oct, Nr. 15, S. 1175–1186
- [148] SUGANO, K. ; TANIGUCHI, T. ; SAEKI, M. ; TSUNEMATSU, Y. ; TOMARU, U. ; SHIMODA, T. : Germline p53 mutation in a case of Li-Fraumeni syndrome presenting gastric cancer. In: *Jpn J Clin Oncol* 29 (1999), Oct, Nr. 10, S. 513–516
- [149] SUZUKI, M. ; SHIGEMATSU, H. ; SHAMES, D. S. ; SUNAGA, N. ; TAKAHASHI, T. ; SHIVAPURKAR, N. ; IIZASA, T. ; FRENKEL, E. P. ; MINNA, J. D. ; FUJISAWA, T. ; GAZDAR, A. F.: DNA methylation-associated inactivation of TGFbeta-related genes DRM/Gremlin, RUNX3, and HPP1 in human cancers. In: *Br J Cancer* 93 (2005), Oct, Nr. 9, S. 1029–1037
- [150] TAHARA, E. : Genetic pathways of two types of gastric cancer. In: *IARC Sci Publ* (2004), Nr. 157, S. 327–349
- [151] TALLEY, N. J. ; ZINSMEISTER, A. R. ; WEAVER, A. ; DIMAGNO, E. P. ; CARPENTER, H. A. ; PEREZ-PEREZ, G. I. ; BLASER, M. J.: Gastric adenocarcinoma and Helicobacter pylori infection. In: *J Natl Cancer Inst* 83 (1991), Dec, Nr. 23, S. 1734–1739
- [152] TANIUCHI, I. ; OSATO, M. ; EGAWA, T. ; SUNSHINE, M. J. ; BAE, S. C. ; KOMORI, T. ; ITO, Y. ; LITTMAN, D. R.: Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. In: *Cell* 111 (2002), Nov, Nr. 5, S. 621–633
- [153] TAUPIN, D. ; PEDERSEN, J. ; FAMILARI, M. ; COOK, G. ; YEOMANS, N. ; GIRAUD, A. S.: Augmented intestinal trefoil factor (TFF3) and loss of pS2 (TFF1) expression precedes metaplastic differentiation of gastric epithelium. In: *Lab Invest* 81 (2001), Mar, Nr. 3, S. 397–408

- [154] TEBBUTT, N. C. ; GIRAUD, A. S. ; INGLESE, M. ; JENKINS, B. ; WARING, P. ; CLAY, F. J. ; MALKI, S. ; ALDERMAN, B. M. ; GRAIL, D. ; HOLLANDE, F. ; HEATH, J. K. ; ERNST, M. : Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice. In: *Nat Med* 8 (2002), Oct, Nr. 10, S. 1089–1097
- [155] TRIANTAFILLIDIS, J. K. ; GIKAS, A. ; HYPHANTIS, T. ; CHERACAKIS, P. ; ROKKAS, T. ; KONSTANTELOU, E. ; ANTONIOU, A. ; MALLAS, H. ; ANDROULAKIS, G. : Helicobacter pylori infection in hospital workers over a 5-year period: correlation with demographic and clinical parameters. In: *J Gastroenterol* 37 (2002), Nr. 12, S. 1005–1013
- [156] UEMURA, N. ; MUKAI, T. ; OKAMOTO, S. ; YAMAGUCHI, S. ; MASHIBA, H. ; TANIYAMA, K. ; SASAKI, N. ; HARUMA, K. ; SUMII, K. ; KAJIYAMA, G. : Effect of Helicobacter pylori eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer. In: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6 (1997), Aug, Nr. 8, S. 639–642
- [157] UEMURA, N. ; OKAMOTO, S. : Effect of Helicobacter pylori eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer in Japan. In: *Gastroenterol Clin North Am* 29 (2000), Dec, Nr. 4, S. 819–827
- [158] UEMURA, N. ; OKAMOTO, S. ; YAMAMOTO, S. ; MATSUMURA, N. ; YAMAGUCHI, S. ; YAMAKIDO, M. ; TANIYAMA, K. ; SASAKI, N. ; SCHLEMPER, R. J.: Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. In: *N Engl J Med* 345 (2001), Sep, Nr. 11, S. 784–789
- [159] VAUHKONEN, M. ; VAUHKONEN, H. ; SAJANTILA, A. ; SIPPONEN, P. : Differences in genomic instability between intestinal- and diffuse-type gastric cancer. In: *Gastric Cancer* 8 (2005), Nr. 4, S. 238–244
- [160] VIRCHOW, R. : Editorial. In: *Archive fuer pathologische Anatomie und Physiologie fuer klinische Medizin* 8 (1855), S. 23–54
- [161] VOLLAARD, A. M. ; VERSPAGET, H. W. ; ALI, S. ; VISSER, L. G. ; VEENENDAAL, R. A. ; ASTEN, H. A. G. H. V. ; WIDJAJA, S. ; SURJADI, C. ; DISSEL, J. T. V.: Helicobacter pylori infection and typhoid fever in Jakarta, Indonesia. In: *Epidemiol Infect* 134 (2006), Feb, Nr. 1, S. 163–170
- [162] WEI, D. ; GONG, W. ; OH, S. C. ; LI, Q. ; KIM, W. D. ; WANG, L. ; LE, X. ; YAO, J. ; WU, T. T. ; HUANG, S. ; XIE, K. : Loss of RUNX3 expression significantly affects the clinical outcome of gastric cancer patients and its restoration causes

- drastic suppression of tumor growth and metastasis. In: *Cancer Res* 65 (2005), Jun, Nr. 11, S. 4809–4816
- [163] WHITEMAN, H. J. ; FARRELL, P. J.: RUNX expression and function in human B cells. In: *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 16 (2006), Nr. 1, S. 31–44
- [164] WIJNEN, A. J. ; STEIN, G. S. ; GERGEN, J. P. ; GRONER, Y. ; HIEBERT, S. W. ; ITO, Y. ; LIU, P. ; NEIL, J. C. ; OHKI, M. ; SPECK, N. : Nomenclature for Runt-related (RUNX) proteins. In: *Oncogene* 23 (2004), May, Nr. 24, S. 4209–4210
- [165] WITTEMAN, E. M. ; MRAVUNAC, M. ; BECX, M. J. ; HOPMAN, W. P. ; VERSCHOOR, J. S. ; TYTGAT, G. N. ; KONING, R. W.: Improvement of gastric inflammation and resolution of epithelial damage one year after eradication of *Helicobacter pylori*. In: *J Clin Pathol* 48 (1995), Mar, Nr. 3, S. 250–256
- [166] WONG, B. C.-Y. ; LAM, S. K. ; WONG, W. M. ; CHEN, J. S. ; ZHENG, T. T. ; FENG, R. E. ; LAI, K. C. ; HU, W. H. C. ; YUEN, S. T. ; LEUNG, S. Y. ; FONG, D. Y. T. ; HO, J. ; CHING, C. K. ; CHEN, J. S. ; GROUP, C. G. C. S.: *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. In: *JAMA* 291 (2004), Jan, Nr. 2, S. 187–194
- [167] WOOLF, E. ; XIAO, C. ; FAINARU, O. ; LOTEM, J. ; ROSEN, D. ; NEGREANU, V. ; BERNSTEIN, Y. ; GOLDENBERG, D. ; BRENNER, O. ; BERKE, G. ; LEVANON, D. ; GRONER, Y. : Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Jun, Nr. 13, S. 7731–7736
- [168] XIN, L. ; LAWSON, D. A. ; WITTE, O. N.: The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), May, Nr. 19, S. 6942–6947
- [169] YAMAOKA, Y. ; KITA, M. ; KODAMA, T. ; SAWAI, N. ; IMANISHI, J. : *Helicobacter pylori* cagA gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. In: *Gastroenterology* 110 (1996), Jun, Nr. 6, S. 1744–1752
- [170] YILMAZ, E. ; DOGAN, Y. ; GURGOZE, M. K. ; UNAL, S. : Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection among children and their parents in eastern Turkey. In: *J Paediatr Child Health* 38 (2002), Apr, Nr. 2, S. 183–186
- [171] YOSHIMURA, A. : Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. In: *Cancer Sci* 97 (2006), Jun, Nr. 6, S. 439–447
- [172] YUASA, Y. : DNA methylation in cancer and ageing. In: *Mech Ageing Dev* 123 (2002), Nov, Nr. 12, S. 1649–1654



- [173] YUASA, Y. : Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis.  
In: *Nat Rev Cancer* 3 (2003), Aug, Nr. 8, S. 592–600

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christian Prinz für seine Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen. Seine Betreuung, Führung und motivierende Zuversicht waren die Grundlage dieser Arbeit.

Zutiefst dankbar bin ich Herrn Dr. Roland Rad, dessen außergewöhnliche fachliche Kompetenz zusammen mit seiner immerwährenden Hilfsbereitschaft das Gelingen meiner wissenschaftlichen Bemühungen ermöglicht hat. Seine frohe Natur, sein freundliches Wesen und seine Großzügigkeit halfen mir, auch die von Zeit zu Zeit nervenzehrenden Phasen der Entstehung dieser Arbeit zu überstehen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Petra Voland bedanken: Durch ihre Freundlichkeit, fachliche Kompetenz, Hilfsbereitschaft und ihr selbstloses Engagement war und ist sie für mich und für alle Doktoranden der Fels in der Brandung des Laboralltags.

Herrn Dr. Rupert Langer und den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie danke ich für ihre äußerst freundliche Unterstützung und die ausführliche Unterweisung in die verschiedenen fachspezifischen Methoden.

Für zahlreiche Gespräche, hilfreiche Gedanken und die überaus angenehme Atmosphäre danke ich meinen Mit-Doktoranden Sophie Besig, Lena Brenner, Dr. Anar Dossumbekova, Barbara Ladwein, Markus Sander, Dr. Christian Schmees und Dr. Susanne Schwendy.

Mehr als Dank schulde ich meinen Eltern, deren Vorbild und deren Großzügigkeit das Fundament meiner Ausbildung sind. Ihrer bedingungslosen Unterstützung und Liebe verdanke ich alles.