

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin I  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gregor

# **Molekularbiologische und durchflußzytometrische Analyse der Magenschleimhaut im operierten Magen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Alexander Braun  
aus  
Stuttgart

2002

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Porschen

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Kaiserling

Vanessa



## Zusammenfassung

**Einleitung:** Patienten nach partieller Gastrektomie (OP) besitzen nach einem postoperativem Intervall von mehr als 15 Jahren ein erhöhtes Karzinomrisiko. Da die histopathologische Identifikation von prämaligen Veränderungen schwierig ist, untersuchte diese Studie die Prävalenz von p53 und k-ras Mutationen, sowie der Zellproliferation und der DNA-Ploidie im Restmagen.

**Patienten, Material, Methoden:** 87 magenteilresezierte und 11 Kontrollpatienten wurden eingeschlossen (14 Billroth (B) I, 43 B II, 13 B II mit Roux-Y und 17 B II mit Braun-Fußpunktanastomose). Es wurden endoskopisch 495 Biopsien gewonnen (3 Karzinome, 2 low grade intraepitheliale Neoplasien (Dysplasien), ansonsten entzündliches bzw. normales Gewebe). Das mediane postoperative Intervall lag bei 18 Jahren (1 bis 55 Jahre). Die Zellproliferation und die DNA-Ploidie wurden durchflußzytometrisch bestimmt. Nach Mutationen im p53 und k-ras wurde mittels PCR-SSCP gefahndet.

**Ergebnisse:** Bei 5% (4/87) der Patienten war eine DNA-Aneuploidie nachzuweisen. Alle fanden sich in der Anastomose und nach B II OP. Eine DNA-Aneuploidie wurde in einem Karzinom detektiert. Die DNA-Aneuploidie wurde im Median nach 20 Jahren gefunden. Hinweise auf unterschiedliche Zellproliferationsaktivität konnten innerhalb der einzelnen Untersuchungsgruppen und im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht festgestellt werden. 10,3% (9/87) aller Patienten zeigten eine p53-Mutation, alle waren nach B II operiert worden. P53 Mutationen wurden im Median erstmalig nach 25 Jahren gefunden. Mutationen wurden ausschließlich in der Anastomose nachgewiesen. K-ras-Mutationen konnte in keiner Biopsie nachgewiesen werden.

**Schlußfolgerung:** Bei Patienten nach B II OP werden im späten postoperativen Verlauf in der Anastomose DNA-Aneuploidien und p53 Mutationen detektiert. Diese Veränderungen deuten auf eine Beteiligung an der Entstehung des Magenstumpfkarcinoms hin und könnten somit als zusätzliche Überwachungsparameter neben der Histologie dienen. Eine Beteiligung von k-ras konnte nicht nachgewiesen werden.



**Inhalt**

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1 Einführung	9
1.2 Magenstumpfkarcinom – das Krankheitsbild	10
1.3 Karzinogenese des Magenstumpfkarcinoms und Karzinomprävention	12
1.3.1 Vorläuferläsionen, Gastritis und intestinale Metaplasie	13
<b>2 Fragestellung / Ziele</b>	<b>17</b>
<b>3 Patienten, Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1 Patientenkollektiv	18
3.2 Histopathologie	19
3.3 DNA-Durchflußzytometrie	20
3.4 Tumorsuppressorgen p53 / Mutationsscreening	21
3.5 Onkogen k-ras / Mutationsscreening	23
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>24</b>
4.1 DNA-Durchflußzytometrie	24
4.1.1 Meßqualität	24
4.1.2 DNA-Aneuploidie	24
4.1.3 Zellproliferation	25
4.2 Mutationsscreening	28
4.2.1 Tumorsuppressorgen p53	28
4.2.2 Onkogen k-ras	30
4.3 Zusammenfassung	31
<b>5 Diskussion</b>	<b>32</b>
5.1 DNA-Durchflußzytometrie	32
5.2 Helicobacter pylori und das Magenstumpfkarcinom	34
5.3 Molekularbiologischer Hintergrund der Karzinogenese	36
5.3.1 Tumorsuppressorgen p53	40
5.3.2 Onkogen k-ras	42
5.4 Schlußfolgerung und Perspektiven	44

<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>45</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>59</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>61</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Einführung

Die Karzinomerkrankungen des Gastrointestinaltraktes bilden eine der größten Gruppen bösartiger Neubildungen beim Menschen überhaupt. Die Inzidenz des Adenokarzinoms des Magens ist weltweit rückläufig. In einigen westlichen Ländern, sank die Erkrankungsrate um fast ein Drittel innerhalb einer Generation. In anderen Ländern mit einer traditionell hohen Inzidenzrate, z.B. Japan und Korea, ist ebenfalls ein signifikanter Rückgang der Erkrankung zu verzeichnen, allerdings ist hier ein größerer Zeitraum notwendig, um ähnliche Daten zu erreichen. Das Magenkarzinom nahm 1990 den zweiten Platz in der Häufigkeitsreihenfolge der Neoplasien ein. Weltweit wurden 800.000 Neuerkrankungen und 650.000 Todesfälle, davon 60% in den Entwicklungsländern, pro Jahr geschätzt (Parkin et al. 1999). Trotz verbesserter diagnostischer und therapeutischer Strategien hat sich die Prognose des Magenkarzinoms in den vergangenen Jahrzehnten nur geringfügig verbessert und bleibt vor allem im fortgeschrittenem Stadium schlecht. Vor dem Hintergrund dieser Erfahrung richtet sich das Augenmerk der klinischen Forschung verstärkt auf Möglichkeiten der Prävention. Allerdings bleibt der Erfolg dieser Bemühungen bislang durch die häufig ungeklärte Ätiologie der Tumoren beschränkt. Präkanzerosen als primär gutartige Erkrankungen mit einem bekannten Potential der neoplastischen Transformation stellen dagegen für medizinische Maßnahmen der Früherkennung und Prävention relativ geeignete Veränderungen dar. Im Gastrointestinaltrakt ist die partielle Gastrektomie eine wichtige präkanzeröse Kondition für die Entstehung eines Magenstumpfkarcinoms. Jedoch werden die heute zur Verfügung stehenden Möglichkeiten der Überwachung von Präkanzerosen des Gastrointestinaltraktes hinsichtlich ihrer Effizienz kritisch diskutiert (Greene 1990, Heilmann 1990). Maßgeblich liegt dies an unbefriedigenden Kriterien der Beurteilung eines individuellen Entartungsrisikos.

Präkanzerosen stellen für die Grundlagenforschung wichtige Modellsysteme der Karzinogenese dar, deren Untersuchung möglicherweise allgemeingültige Prinzipien der Krebsentstehung aufzuzeigen vermag. Von der Aufklärung des molekularen Hintergrunds der Karzinogenese ist die Ableitung neuer therapeutischer Zielstrukturen und diagnostischer Markerveränderungen zu erwarten.

## 1.2 Magenstumpfkarcinom – das Krankheitsbild

Nach operativen Eingriffen am Magen, wie Resektionen oder Vagotomieverfahren werden einige grundlegende Veränderungen in der oberen gastrointestinalen Physiologie verursacht. Durch Resektion oder Teilresektion wird die Reservoirfunktion des Magens erheblich reduziert (Goebell 1978, Kelly et al. 1981, Fuchs et al. 1995). Die physiologischen Verbindungen im oberen Gastrointestinalbereich zwischen Magen und Duodenum, Gallenblase und Pankreas werden unterbrochen. Der Pylorus als funktioneller Sphinkter zwischen saurem Magenmilieu und dem alkalischen Milieu des Dünndarms geht verloren. Dies lässt einen unphysiologischen Austausch von Flüssigkeiten zwischen Restmagenumilieu und Duodenum oder Jejunallumen zu. Aber nicht nur die Feinkoordination zwischen Magen- und Duodenomotilität, sondern auch hormonelle Steuerungssysteme werden unterbrochen oder verändert. Dies führt bei einer Reihe von Patienten zu postoperativen Problemen nach Mageneingriffen, die man pauschal unter dem Begriff „Postgastrektomiesyndrom“ oder „Postvagotomiesyndrom“ zusammenfassen kann (Wells et al. 1951, Goebell 1978). Im einzelnen versteht man darunter das frühe und späte Dumpingsyndrom, das Schlingensyndrom, die Refluxgastritis und das Magenstumpfkarcinom.

Das Magenstumpfkarcinom wurde 1920 erstmals beschrieben (Balfour 1922). Es ist definiert als ein Tumor im Restmagen, der frühestens 5 Jahre nach vorausgegangener Magenteilresektion wegen einer gutartigen Erkrankung auftritt (Logan und Langmann 1983). Die Magenteilresektion war über viele Jahrzehnte ein operatives Verfahren zur Behandlung der gastroduodenalen Ulkuserkrankung. Bis in die 50er Jahre wurde das Magenstumpfkarcinom nur als Rarität in einzelnen Fallberichten beschrieben. Erst Kühlmayer und Rokitansky berichteten 1954 bei einer retrospektiven Analyse von 50.000 Sektionen über 363 Fälle von Magenteilresektionen wegen einer gastroduodenalen Ulkuserkrankung, von denen bei 40 Patienten ein Karcinom gefunden wurde (Kühlmayer und Rokitansky 1954). Weitere Studien mit großen Patientenkollektiven zeigten für die Entwicklung eines Magenstumpfkarcinoms ein relatives Entartungsrisiko von 2,1 bis 4,7 nach partieller Gastrektomie im Vergleich zur Normalbevölkerung (Viste et al. 1986, Caygill et al. 1986, Offerhaus et al. 1988, Toftgaard 1989). Die Prognose wird mit einer 3-Jahres-Überlebensrate von ca. 21% bei einer mittleren Überlebensrate von 6,5 Monaten angegeben (Kujath et al. 1995).

Es wurden Risikofaktoren für die Entstehung eines Magenstumpfkarcinoms erarbeitet. Auffallend ist ein erhöhtes Risiko für das Auftreten des Magenstumpfkarcinoms an der Anastomose zwischen Restmagen und hochgezogener Jejunumschlinge (Kujath et al. 1995, Kaminishi et al. 1995), sowie nach einem postoperativem Intervall von 15 Jahren (Viste et al. 1986, Caygill et al. 1986, Offerhaus et al. 1988, Toftgaard 1989). Ferner werden besonders Karzinome des Magenstumpfes bei Patienten beobachtet, die zum einen wegen eines Magenulkus operiert wurden (Caygill et al. 1986, Toftgaard 1989, Ovaska et al. 1985), oder zum anderen mit einem operativen Rekonstruktionsverfahren nach Billroth II versorgt wurden (Caygill et al. 1986, Kujath et al. 1995). Das männliche Geschlecht ist zudem häufiger betroffen als das weibliche (Caygill et al, Toftgaard 1989, Kujath et al. 1995).

---

---

### **Risikofaktoren für die Entstehung eines Magenstumpfkarcinoms**

- Ulkus ventriculi als Operationsindikation
- Billroth II Operation
- Postoperatives Zeitintervall über 15 Jahre
- Männliches Geschlecht

---

---

Abbildung 1 Nachgewiesene Risikofaktoren des Magenstumpfkarcinoms

### 1.3 Karzinogenese des Magenstumpfkarcinoms und Karzinomprävention

Eine große Bedeutung kommt dem duodenogastralen Reflux zu, der je nach Anastomosenverfahren unterschiedliche Ausmaße annimmt (Lorusso et al. 2000). Am geringsten ist der Reflux bei der Billroth II Rekonstruktion mit Roux-Y-Anastomose, während er bei der einfachen Billroth II Rekonstruktion durch die neuen anatomischen Passagereverhältnisse am größten ist. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen dem Ausmaß des duodenogastralen Refluxes und der Karzinomentstehung im Tiermodell (Langhans et al. 1981). Ähnliche Ergebnisse wurden durch klinische Untersuchungen bestätigt. So ist die Gallensäurekonzentration im Restmagen bei Patienten, die nach Billroth II operiert wurden, signifikant höher als bei Patienten mit Billroth I Rekonstruktion (Langhans et al. 1981). Bei Patienten mit Magenteilresektion haben histologische Untersuchungen sehr oft die Zeichen einer Entzündung der Magenschleimhaut an der Anastomosenregion gezeigt. Diese chronische Gastritis war bei älteren Patienten häufiger zu finden als bei jüngeren (Bechi et al. 1987, Lygidakis 1986). Ferner konnte bei einem vermehrtem duodenogastralen Reflux ein hyperplastischer foveolärer Zustand des Magenepithels im Bereich der Anastomose beobachtet werden. Im weiteren Verlauf wurde eine atrophische Gastritis detektiert, die Grundlage für eine intestinale Metaplasie mit späteren intraepithelialen Neoplasien (Dysplasien) war (Lygidakis 1986, Bechi et al. 1987, Stanley et al. 2000). Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Karzinogenese ist die Bakterienbesiedlung des resezierten Magens. Bei der Billroth I oder II Operation werden die distalen 2/3 des Magens entfernt, und somit auch die gastrinbildenden Zellen des Magenanspruchs. Es fehlt nun auch der Sekretionsreiz für die Belegzellen um bei Nahrungsaufnahme einen Abfall des pH im Magen zu bewirken. Dies hat insgesamt zur Folge, daß der pH im Magen ansteigt, was mit einem Wachstum von anaeroben Bakterien verbunden ist. Diese Bakterien, zu denen auch der *Helicobacter pylori* zählen, sind in der Lage, mit der Nahrung aufgenommenes Nitrat in Nitrit umzuwandeln. Diese Nitrite werden durch die Präsenz von Gallensäuren und Mangel an Antioxidantien in mutagene und kanzerogene Nitrosamine verstoffwechselt (Abbildung 2) (Brenes und Correa 1993). Eine Studie von Greene konnte bei 24 Patienten mit intraepithelialer Neoplasie oder Adenokarzinom im Restmagen kein *Helicobacter pylori* nachweisen (Greene 1995).

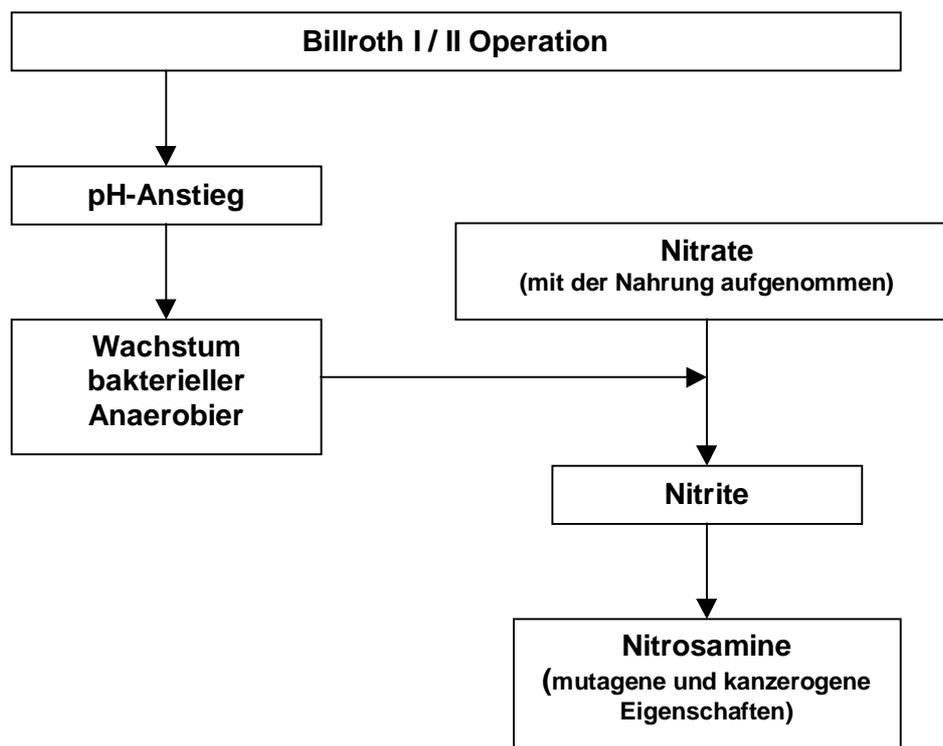


Abbildung 2 Pathogenese der Bakterienbesiedlung des resezierten Magens (Brenes und Correa 1993)

Bei nun schon bestehender atrophischen Gastritis im Bereich der Anastomose bei Patienten nach partieller Gastrektomie erfolgt durch das Vorhandensein von Nitrosaminen der Übergang in eine chronische Verlaufsform, die weiterhin in eine intestinale Metaplasie konvertiert. Die intestinale Metaplasie dient nun als Basis bei der Karzinogenese für die Transformation von der low grade intraepithelialen Neoplasie (Dysplasie) zur high grade intraepithelialen Neoplasie mit anschließender Karzinommanifestation (Greene 1995, Brenes und Correa 1993).

### 1.3.1 Vorläuferläsionen, Gastritis und intestinale Metaplasie

Die chronische atrophische Gastritis und die intestinale Metaplasie werden gewöhnlich vor oder mit dem sporadischen Adenokarzinom des Magens vom intestinalen Typ beobachtet (Imai et al. 1971). Jedoch weist die autoimmune Gastritis ebenfalls auf ein erhöhtes Karzinomrisiko hin. Bei persistierender Gastritis mit Übergang in die atrophische Form, sowie anschließender Metaplasieentwicklung beginnt eine Sequenz von

Veränderungen, die in der Neoplasie vom intestinalen Typ enden. Im Gegensatz dazu entwickelt sich das Magenkarzinom vom diffusen Typ ohne Präsenz einer atrophischen Gastritis mit Metaplasie.

Es gibt zwei Kategorien der intestinalen Metaplasie: Zum einen die komplette, auch Dünndarm-Typ oder Typ I genannt, und zum anderen die inkomplette Metaplasie, Typ II und III (Jass und Filipe 1980). Die Metaplasien werden durch unterschiedliche Muzin-Expressionmuster charakterisiert. Die komplette Metaplasie zeigt eine verminderte Expression des Magenmuzins (MUC1, MUC5A und MUC6), dafür wird ein Darmmucin (MUC2) hauptsächlich exprimiert. Bei der inkompletten Metaplasie werden die Magenmuzine mit dem MUC2 gemeinsam exprimiert. Diese Erkenntnisse weisen bei der inkompletten intestinalen Metaplasie einen gemischten Phenotyp aus Magen- und Darmanteilen nach, der ein pathologisches Differenzierungsprogramm der Epithelzellen widerspiegelt (Reis et al. 1999).

Die intraepitheliale Neoplasie (Dysplasie) entsteht entweder aus dem ursprünglichen Magenepithel oder aus einem metaplastisch veränderten intestinalen Magenepithel. In der Karzinogenese des Magenkarzinoms erscheinen die intraepithelialen Neoplasien zwischen den atrophischen metaplastischen Läsionen und den invasiven Karzinomen (Tabelle 1).

Studie	Intraepitheliale Neoplasie					
		Low-grade			High-grade	
Saraga, 1987	2%	1 / 64	4 Jahre	81%	17 / 21	4 Monate
Lansdown, 1990	0	0 / 7		85%	11 / 13	5 Monate
Rugge, 1991	17%	12 / 69	1 Jahr	75%	6 / 8	4 Monate
Fertitta, 1993	23%	7 / 30	10 Monate	81%	25 / 31	5 Monate
Di Gregorio, 1993	7%	6 / 89	2 Jahre	60%	6 / 10	11 Monate
Rugge, 1994	14%	13 / 90	2 Jahre	78%	14 / 18	9 Monate
Kokkola, 1996	14%	13 / 90	2 Jahre	78%	14 / 18	9 Monate

Tabelle 1 Histologische Follow-up Studien bei intraepithelialen Neoplasien des Magens. Darstellung der Patienten mit intraepithelialen Neoplasien, die im weiteren Verlauf ein Karzinom entwickelt hatten. %-Angaben über den Anteil der betroffenen Patienten des Gesamtkollektives, sowie Zeitdauer zwischen Diagnose „Intraepitheliale Neoplasie“ und „Karzinom“.

Die histopathologische Diagnostik von intraepithelialen Neoplasien des Magens weist Inter- und Intrauntersuchervariabilitäten auf. Die Differenzierung der regenerativen, akut entzündlichen Veränderungen von der intraepithelialen Neoplasie und den invasiven Karzinomen verursacht erhebliche Schwierigkeiten (Schlemper et al. 1997, Lauwers et al. 1999). In der Vergangenheit wurden verschiedene Einteilungen zur morphologischen Beschreibung des Spektrums der Läsionen, von nichtneoplastischen Veränderungen bis zum frühen invasiven Karzinom, erarbeitet. Derzeit erfolgt die Differenzierung nach der internationale Padova Klassifikation (Rugge et al. 2000).

#### Intraepitheliale Neoplasie (Dysplasie)

Die intraepitheliale Neoplasie besteht aus flachen, polypoiden oder imprimierten Wachstumsmustern. Die flachen Wachstumsmuster können bei einer gewöhnlichen Endoskopie übersehen werden, nicht jedoch bei der Chromoendoskopie, hier zeigt sie sich mit einer unregelmäßigen Oberfläche.

#### Low grade intraepitheliale Neoplasie

Die low grade intraepitheliale Neoplasie zeigt eine etwas veränderte Mukosaarchitektur mit aufgezweigten, knospigen tubulären Strukturen, mit papillären Einschlüssen, mit Kryptenverlängerungen und zystischen Veränderungen. Die Drüsen sind mit vergrößerten Zylinderepithelzellen, die nur sehr wenig oder kein Muzin bilden, ausgekleidet. Die hyperchromatischen runden oder ovalen Kerne befinden sich normalerweise in der Proliferationszone, die im oberflächlichen Anteil der tubulären dysplastischen Strukturen lokalisiert ist.

#### High grade intraepitheliale Neoplasie

Die high grade intraepitheliale Neoplasie zeigt durch ein glanduläres Wachstum und durch eine deutliche Zunahme der Zellatypien eine Beeinträchtigung der normalen Strukturen. Tubuläre Strukturen nehmen ungewöhnliche Formen an, mit häufigen Aufzweigungen und Faltungen, jedoch ohne ein invasives Wachstum. Die hyperchromati-

schen pleomorphen Kerne nehmen oft längliche Formen an. Eine verstärkte proliferative Aktivität ist im gesamten Epithel zu beobachten.

## **2 Fragestellung / Ziele**

Ziel der Arbeit war es, die Prävalenz von in der Vergangenheit gut charakterisierten Tumorsuppressor- und Onkogenen, sowie der durchflußzytometrisch gemessenen DNA-Aneuploidie im Magenstumpf zu untersuchen. Dies sollte erste Hinweise darauf geben, ob diese Veränderungen die Eigenschaften diagnostischer Biomarker aufweisen. Im einzelnen sollte die Rolle des Tumorsuppressorgens p53, des Onkogens k-ras und die durchflußzytometrisch bestimmte DNA-Aneuploidie und Zellproliferationsrate untersucht werden.

### 3 Patienten, Material und Methoden

#### 3.1 Patientenkollektiv

Es wurden 87 magenteilresezierte Patienten und 11 Kontrollpatienten untersucht. Die magenteilresezierten Patienten wurden alle wegen einer benignen Erkrankung operiert. Es wurden unterschiedliche operative Rekonstruktionsverfahren angewendet (Tabelle 2). Die Kontrollpatienten zeigten eine chronische aktive Gastritis (n=4) oder eine unauffällige Magenschleimhaut (n=7). Das mediane postoperative Beobachtungsintervall lag bei 18 Jahren (1 bis 55 Jahre) (Tabelle 3). Im Rahmen von Nachsorgegastroskopien wurden Gewebeproben aus dem Restmagen (Fundus, Corpus) und der Anastomose entnommen, zusätzlich wurden Lokalisationen untersucht, die makroskopisch auffällig erschienen. Insgesamt wurden 495 Biopsien analysiert. Innerhalb der einzelnen Patientengruppen, die nach dem jeweiligen Operationsverfahren eingeteilt wurden, erfolgte eine Unterteilung der Patienten mit einem postoperativen Intervall bis 15 Jahre und Patienten mit einem Intervall ab 15 Jahre. Die entnommenen Gewebeproben wurden in DMSO-Citrat Puffer bei minus 20° C bis zur Durchflußzytometrie gelagert.

Operationstechnisches Rekonstruktionsverfahren	Anzahl der Patienten
Billroth I (B I)	14
Billroth II (B II)	43
Billroth II mit Roux-Y (B II + Roux-Y)	13
Billroth II mit Braun-Fußpunktanastomose (B II + Br.FA)	17

Tabelle 2 Patientenverteilung nach distaler Magenteilresektion mit dem jeweiligen Rekonstruktionsverfahren.

OP	B I	B II	B II + Roux-Y	B II + Br.FA
Postop. Intervall <15 / >15 Jahre (Patientenanzahl)	10 / 4	9 / 34	9 / 4	7 / 10
Verhältnis m/w	1,33	2,08	2,25	1,13
Patientenalter (Jahre)	33 - 80	50 - 84	34 - 84	46 - 80
Postoperatives Intervall (Jahre)	11	23,1	13,2	18,2

Tabelle 3 Patientenkollektiv nach partieller Gastrektomie, Aufteilung nach postop. Intervall, Geschlecht und Alter (B I: Billroth I, B II: Billroth II, B II + Roux-Y: Billroth II mit Roux-Y-Anastomose, BII+Braun-FA: Billroth II mit Braun-Fußpunktanastomose)

### 3.2 Histopathologie

Jedes Präparat wurde gemäß der oben angegebenen Klassifikation histopathologisch auf das Vorliegen dysplastischer Veränderungen hin untersucht. Die Beurteilung erfolgte durch einen gastrointestinalen erfahrenen Pathologen (Prof. Borchard). In den 495 Biopsien zeigten sich 3 Karzinome und 2 low grade intraepithelialen Neoplasien (Tabelle 4).

Patient	OP	Post-OP Jahre	Histologie
206	B II	20	Niedriggradige Dysplasie
194	B II+Braun-FA	24	Niedriggradige Dysplasie
153	B II	25	Karzinom
205	B II	25	Karzinom
175	B II	25	Karzinom

Tabelle 4 Histopathologische Eigenschaften des Patientenkollektivs (B II: Billroth II, BII+Braun-FA: Billroth II mit Braun-Fußpunktanastomose)

### 3.3 DNA-Durchflußzytometrie

Die Biopsien wurden bis zur durchflußzytometrischen Analyse bei minus 20°C in einem DMSO-Citrat Puffer eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Biopsien mit einem Glaspistell vorsichtig in einem Meßsieb gemörsert. Die sich dabei lösenden Zellen wurden mit DMSO-Citrat Puffer in ein Reagenzglas ausgespült. Die weitere Präparation erfolgte mit einer Detergens-Trypsin-Behandlung entsprechend der von Vindelov und Mitarbeitern beschriebenen Methode (Vindelov et al. 1983). Nach RNase-Behandlung wurde die Zellkernpräparation mit Propidiumjodid für die durchflußzytometrische DNA-Analyse angefärbt.

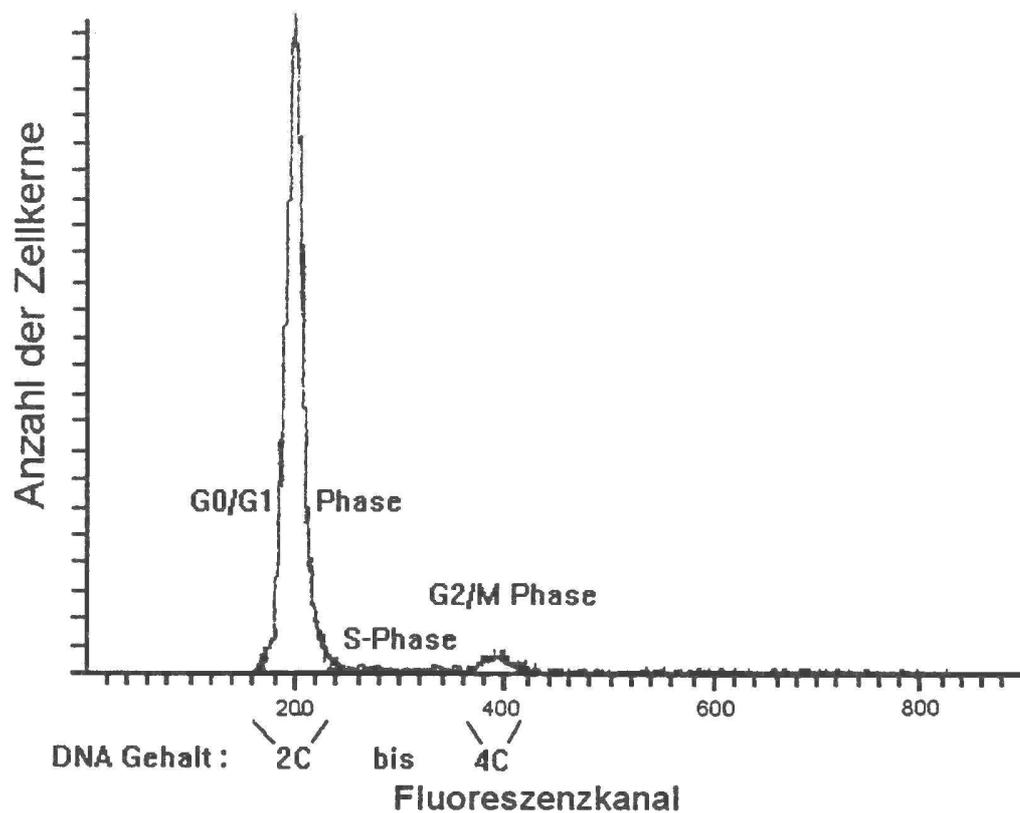


Abbildung 3 Darstellung eines DNA-Histogrammes mit Aufschlüsselung der einzelnen Phasen. Da die Fluoreszenzintensität dem DNA-Gehalt proportional ist, läßt sich die Zellzyklusverteilung der Population berechnen.

Pro Biopsie wurden 10.000 Zellen in dem Durchflußzytometer FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Die Verbreiterung des G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Gipfels aufgrund experimenteller Beeinflussungsfaktoren dient in der Durchflußzytometrie als Maß für die Qualität und Trennschärfe der entstandenen DNA-Histogramme. Dabei wird ein sogenannter Variationskoeffizient ("coefficient of variation" = CV) verwendet, der sich bei normalverteilten Daten aus der Division von Standardabweichung und Mittelwert ergibt. Eine DNA-Aneuploidie lag dann vor, wenn sich mindestens zwei separate G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Gipfel abgrenzen ließen, entsprechend einer Definition der DNA-Aneuploidie nach Hiddemann (Hiddemann et al. 1984). Die durchflußzytometrisch gemessene Abweichung oder Übereinstimmung des DNA-Gehaltes von einem normalen diploiden Karyotyp wurde durch den DNA-Index beschrieben (Mittelwert des G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Gipfels der aneuploiden Zellpopulation: Mittelwert des G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Gipfels der normalen Zellpopulation). Liegt ein normaler DNA-Gehalt vor, beträgt der DNA-Index per definitionem 1,0. Desweiteren wird die S-Phase analysiert. Sie ist ein Maß für die Wachstumsaktivität der beobachteten Population und zeigt neben der G<sub>2</sub>/M-Phase den Anteil der Neusynthese genetischen Materials an.

### **3.4 Tumorsuppressorgen p53 / Mutationsscreening**

Um die Bedeutung von Veränderungen des p53-Tumorsuppressorgens für die neoplastische Transformation beim Magenstumpfkarcinom zu untersuchen, sollten die Ergebnisse der exakten histopathologischen Analyse von Zwischenstufen der Karzinomentwicklung mit den Ergebnissen der p53-Analyse verglichen werden. Hiervon war sowohl eine Aussage zur Prävalenz von p53-Alterationen insgesamt als auch ein Hinweis zum zeitlichen Auftreten im Rahmen des Transformationsprozesses zu erwarten. Im einzelnen sollte das Vorkommen von somatischen Mutationen auf DNA-Ebene untersucht werden.

Mutationsanalysen / PCR-SSCP-Assay: Die hochkonservierten Abschnitte des p53-Gens in den Exons 5, 7 und 8, die als Mutations- „Hot Spots“ charakterisiert wurden, wurden jeweils mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert (Tabelle 5).

Exon / Richtung	Primer	Annealing-Temperatur	Produktlänge
5 / Sense	5'-TTCCTCTTCCTACAGTACTCC-3'	64 °C	214 bp
5 / Antisense	5'-GCCCCAGCTGCTCACCATCGC-3'		
7 / Sense	5'-GTGTTATCTCCTAGGTTGGCT-3'	65 °C	135 bp
7 / Antisense	5'-TGGCTCCTGACCTGGAGTCTT-3'		
8 / Sense	5'-CTATCCTGAGTAGTGGTAATCT-3'	59 °C	165 bp
8 / Antisense	5'-GTCCTGCTTGCTTACCTCGCT-3'		

Tabelle 5 PCR-Charakteristika der p53-Mutationsanalysen bei Patienten nach partieller Gastrektomie (bp: Basenpaare).

Das Mutationsscreening erfolgte durch die Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Methode (SSCP). Der Hinweis auf das Vorliegen von Mutationen erfolgte hierbei über ein verändertes Wanderungsverhalten denaturierter Einzelstränge in der Gelelektrophorese aufgrund einer veränderten Basensequenz. Die Temperaturbedingungen und der Glycerol-Gehalt des Gels werden hierbei für jedes Amplifikationsprodukt optimiert, um eine befriedigende Einzelstrang-Separation in der Elektrophorese zu erhalten (Tabelle 6).

Exon	Glyzerolgehalt	Lauftemperatur	Laufdauer
5	0%	4 °C	4 h
7	5%	18 °C	3 h
8	5%	18 °C	3 h

Tabelle 6 Eigenschaften der PCR-SSCP-Analysen zur p53-Mutationssuche bei Patienten nach partieller Gastrektomie.

### 3.5 Onkogen k-ras / Mutationsscreening

Wie für das p53-Tumorsuppressorgen oben beschrieben, sollte auch die Bedeutung des k-ras-Onkogens in der neoplastischen Transformation beim Magenstumpfkarcinom durch den Vergleich des exakten histopathologischen Status mit dem Mutationsstatus vorliegenden Gewebes untersucht werden.

Das Patienten- bzw. Probenkollektiv entsprach dem für die p53-Mutationsuntersuchungen oben dargestellten Kollektiv (Tabellen oben).

Exon 1 des k-ras-Onkogens wurde, wie oben für das p53-Gen beschreiben, durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert und dann einer SSCP-Mutationsanalyse zugeführt. Die für das k-ras-Onkogen adaptierten Bedingungen der PCR sind in Tabelle 7, die der SSCP-Mutationsanalyse in Tabelle 8 aufgeführt.

Exon 1	Primer	AT	Produktlänge
Sense	5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3'	60 °C	192 bp
Antisense	5'-ACTCATGAAAATGGCCAGGGAAACCTTTAT-3'		

Tabelle 7 PCR-Charakteristika der k-ras-Mutationsanalysen bei Patienten nach partieller Gastrektomie (AT: Annealing-Temperatur, bp: Basenpaare).

Exon	Glyzerolgehalt	Lauftemperatur	Laufdauer
1	0%	4 °C	4 h

Tabelle 8 Eigenschaften der PCR-SSCP-Analysen zur k-ras-Mutationssuche bei Patienten nach partieller Gastrektomie.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 DNA-Durchflußzytometrie

#### 4.1.1 Meßqualität

Die Auswertung von insgesamt 495 Biopsien zeigte einen mittleren Variationskoeffizienten (CV) von  $2,58 \pm 0,37\%$  bei einer Spannweite von 2,05 bis 3,6. Es konnten alle untersuchten Proben in die Studie eingeschlossen werden, keine Gewebeprobe mußte wegen unzureichender Meßqualität ausgeschlossen werden.

Alle nachfolgenden Angaben beziehen sich auf 87 operierte – und 11 Kontrollpatienten, bei denen insgesamt 495 Biopsien entnommen wurden.

#### 4.1.2 DNA-Aneuploidie

Bei der Entscheidung ob eine Messung aneuploid oder diploid ist, wurde streng nach den oben erwähnten Kriterien entschieden. Die Analyse der Ploidie zeigte bei 4 (5%) der 87 gastrektomierten Patienten eine Aneuploidie. Alle Biopsien stammten von männlichen Patienten. 2 der Patienten waren nach Billroth II, die anderen beiden waren nach Billroth II mit Braun-Fußpunktanastomose operiert worden. Alle 4 aneuploiden Biopsien wurden aus dem Bereich der Anastomose entnommen. 1 der 3 Karzinome wies eine Aneuploidie auf. Das mediane postoperative Intervall lag bei 20,75 Jahre (18 bis 25 Jahre). Der mittlere DNA-Index zeigte einen Wert von  $1,32 \pm 0,36$  (Spannweite 1,06 bis 1,83) (Tabelle 9).

Pat.-Nr.	OP	Jahre post.-OP	Histologie	DNA-Index
47	B II	20	Folveläre Hyperplasie	1,32
153	B II	25	Karzinom	1,83
154	B II+Braun-FA	18	Folveläre Hyperplasie	1,08
57	B II+Braun-FA	20	Folveläre Hyperplasie	1,06

Tabelle 9 Ergebnisse der Durchflußzytometrie: Patienten mit Aneuploidien im Anastomosenbereich, alle Patienten waren Männer.

#### 4.1.3 Zellproliferation

Bei allen Biopsien wurde die S-Phase analysiert. Beim Vergleich der jeweiligen S-Phasenfraktion war der prozentuale Anteil an der Gesamtzellpopulation ausschlaggebend. Es wurden die S-Phasen der Patienten mit unterschiedlichem Operationsverfahren, sowie innerhalb der Patientengruppen mit unterschiedlichem postoperativem Intervall (bis 15 Jahre oder über 15 Jahre) auf signifikante Differenzen hin untersucht.

Der mittlere S-Phasenanteil aller Biopsien aus der Kontrollgruppe lag bei  $3,11\% \pm 2,32$ . Im Magenantrum ließ sich eine höhere S-Phase mit  $4,85\% \pm 2,15$  als in den proximalen Magenregionen mit  $2,13\% \pm 1,78$  nachweisen. Der Unterschied war in der Zwei-Stichproben-t-Test-Statistik mit einem p-Wert von 0,021 signifikant.

Der mittlere S-Phasenanteil der Biopsien aus dem Restmagen lag bei  $5,29\% \pm 3,27$ . Bei den operierten Patienten wurden die höchsten S-Phasen immer in Biopsien aus der Anastomose gemessen. Patienten mit B I und BII-Operationen zeigten in der Zeit bis 15 Jahre nach Operation in der Anastomose höhere S-Phasenanteile mit 5,94% und 7,73% als Patienten, die nach 15 Jahre untersucht wurden, hier fielen dann die Werte auf 3,8% und 5,26% ab. Im Gegensatz dazu wurde bei den B II operierten Patienten mit Roux-Y-Anastomose und Braun-Fußpunktanastomose in der Anastomose eine erhöhte S-Phase mit 7,65% und 5,91% erst nach 15 postoperativen Jahren gesehen, die entsprechenden Werte der innerhalb von 15 Jahren untersuchten Patienten lagen bei 6,05% und 4,3%. Die drei eingeschlossenen Magenstumpfkarcinome zeigten

einen mittleren S-Phasenanteil von  $4,86\% \pm 2,14$ . Die mittleren gemessenen S-Phasenfraktionen des Restmagens lagen bei allen operierten Patienten im Bereich der gesamt ermittelten S-Phase. Obwohl alle mittlere S-Phasenfraktionen über der des Kontrollkollektivs lagen, zeigte sich sowohl in Bezug auf das Kontrollkollektiv als auch innerhalb der einzelnen Patientengruppen kein statistisch signifikanter Unterschied.

OP	Lokalisation	Postoperatives Intervall (Jahre)	Mittlerer S-Phasenanteil (%)	Standardabweichung
B I		gesamt	5,4	3,35
	Restmagen	< 15	4,38	2,85
	Anastomose	< 15	5,94	3,06
	Restmagen	> 15	4,5	0,99
	Anastomose	> 15	3,8	2,62
B II		gesamt	5,24	2,82
	Restmagen	< 15	3,44	0,72
	Anastomose	< 15	7,73	3,44
	Restmagen	> 15	4,55	2,51
	Anastomose	> 15	5,26	2,49
B II + Roux-Y		gesamt	5,64	4,59
	Restmagen	< 15	3,44	2,38
	Anastomose	< 15	6,05	3,35
	Restmagen	> 15	6,1	5,96
	Anastomose	> 15	7,65	9,38
B II + Braun-FA		gesamt	4,88	2,33
	Restmagen	< 15	4,36	2,34
	Anastomose	< 15	4,3	2,27
	Restmagen	> 15	4,98	3,01
	Anastomose	> 15	5,91	2,26
Kontrollgruppe			3,11	2,32

Tabelle 10 Ergebnisse der Durchflußzytometrie für die mittlere S-Phasenfraktion bei den unterschiedlich operierten Patienten und der Kontrollgruppe (B I: Billroth I, B II: Billroth II, B II + Roux-Y: Billroth II + Roux-Y-Anastomose, B II + Braun-FA: Billroth II mit Braun-Fußpunktanastomose).

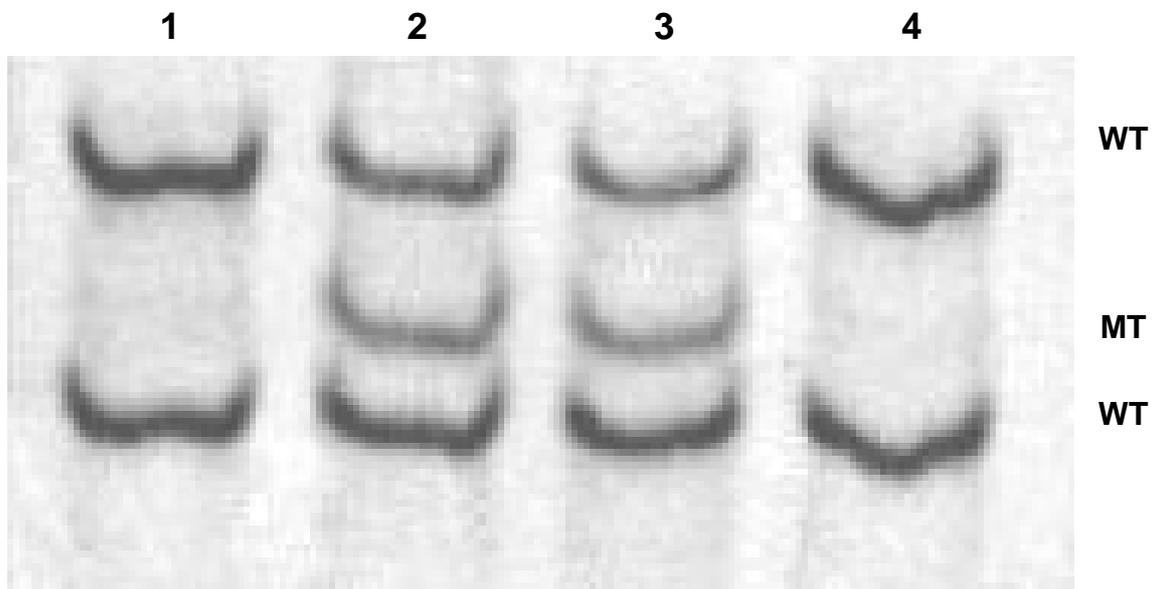
Die vier Patienten mit einer bereits detektierten Aneuploidie wiesen im Mittel eine S-Phase von  $7,02\% \pm 3,2$  auf.

Die beiden Patienten mit den low grade intraepithelialen Neoplasien lagen mit den S-Phasenanteilen bei 3,5% und 2,5%, somit bestand keine signifikante Differenz zu den oben dargestellten Patientengruppen.

## 4.2 Mutationsscreening

### 4.2.1 Tumorsuppressorgen p53

Insgesamt 9 der analysierten 87 magenteilresezierten Patienten zeigten eine p53-Mutation (10,3%) (Abbildung 4).



**Abbildung 4** Beispiel der SSCP-Analyse für Exon 7 des p53 Gens. Dargestellt sind die Ergebnisse von 4 Proben. Spur 1: kein Hinweis auf Mutation (Patient-Nr. 37), Spur 2 und 3: zusätzliche Bande als Hinweis für eine Mutation (Patient-Nr. 76 und 123) (WT: Wildtyp, MT: Mutation), Spur 4: kein Hinweis auf Mutation (Patient-Nr.45).

Etwas mehr als die Hälfte der Mutationen fanden sich in Exon 7 (Tabelle 11). Bei einem Karzinom lag die Mutation im Exon 7, bei dem anderen Karzinom im Exon 8. Das Karzinom mit der Mutation im Exon 7 zeigt bei der durchflußzytometrischen Untersuchung eine Aneuploidie mit einem DNA-Index von 1,83.

Patienten-Nr.	Geschlecht	Postoperative Jahre	Aneuploidie		
			(DNA-Index)	Histologie	Exon
65	m	25	∅	Hyperplasie	5
153	m	25	1,83	Karzinom	7
76	m	22	∅	Metaplasie	7
175	w	25	∅	Karzinom	8
71	m	25	∅	Hyperplasie	7
149	m	26	∅	Gastritis	7
87	m	20	∅	Gastritis	8
123	m	25	∅	Hyperplasie	7
158	w	9	∅	Normal	8

Tabelle 11 Ergebnisse der PCR-SSCP Mutationsanalyse für p53, Exon 5, 7 und 8 in Zusammenhang mit Geschlecht, postoperativem Intervall, Aneuploidie und Histologie.

Die p53-Mutationen zeigten sich im Median nach 25 postoperativen Jahren (Mittlerer Wert 22,44 Jahre  $\pm$  5,39). Bei 8 (88,9%) der 9 Patienten, die eine p53 Mutation zeigten, lag die Operation mindestens 20 Jahre zurück. Bei beiden Magenstumpfkarcinome

wurde die p53-Mutation jeweils 25 Jahre nach erfolgter Operation detektiert. Die Biopsien mit Mutationen wurden alle aus dem Bereich der Anastomose entnommen. Alle 9 Patienten wurden nach Billroth II operiert, bei einer Patientin (Patienten-Nr.158) erfolgte noch zusätzlich eine Roux-Y-Anastomose. Diese Patientin wies bereits nach 9 postoperativen Jahren eine Mutation im Exon 8 auf.

Die durchflußzytometrischen Meßergebnisse der p53-Mutationspatienten waren nicht signifikant unterschiedlich zu den bereits oben genannten Analysen, so lag der mittlere S-Phasenanteil der mutierten Proben bei  $4,86\% \pm 2,14$ .

Die Geschlechterverteilung zeigte ein Verhältnis der männlichen zu den weiblichen Patienten von 3,5:1.

Bei den Patienten mit den low grade intraepithelialen Neoplasien ließen sich keine p53-Mutationen nachweisen.

#### 4.2.2 Onkogen k-ras

Bei den untersuchten 87 magenteilresezierten Patienten und bei den 11 Kontrollpatienten konnten keine k-ras Mutationen nachgewiesen werden.

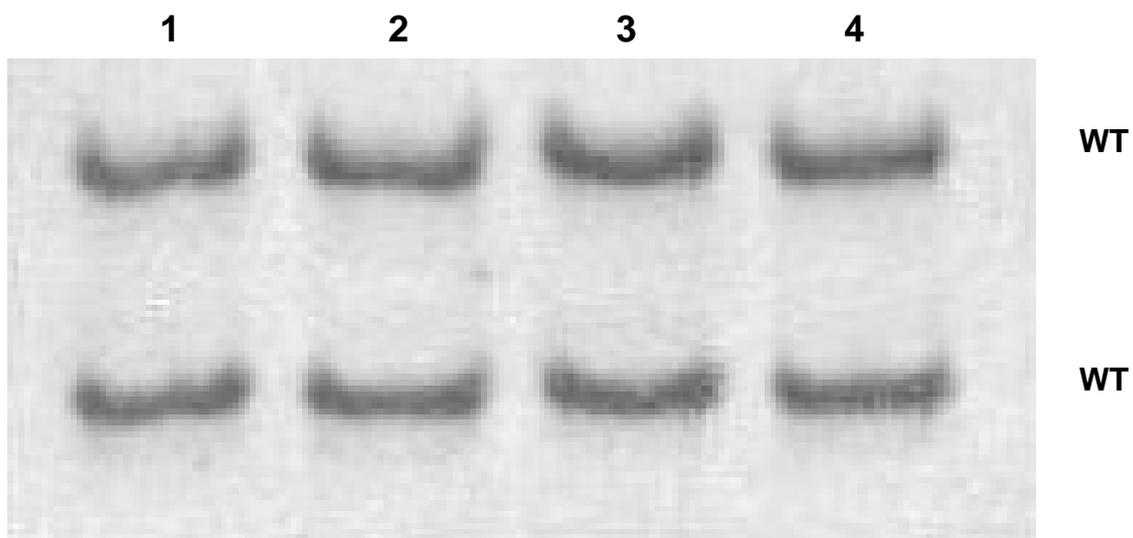


Abbildung 5 Silbergefärbtes Polyacrylamid-Gel mit PCR-SSCP Analyse des k-ras / Exon 1. Spur 1 bis 4: kein Hinweis auf Mutation (WT: Wildtyp).

### 4.3 Zusammenfassung

#### Durchflußzytometrie

1. 5% (4/87) der Patienten zeigte im Median 20 Jahre nach partieller Gastrektomie eine Aneuploidie.
2. Alle Aneuploidien fanden sich in der Anastomose und nach Billroth II Operationen.
3. Eines der drei involvierten Karzinome war aneuploid.
4. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zellproliferation innerhalb der einzelnen Untersuchungsgruppen und im Vergleich zur Kontrollgruppe.

#### Mutationsscreening

1. 10,3% (9/87) der Patienten zeigten eine p53 Mutation.
2. Zwei von drei Karzinome wiesen eine p53 Mutation auf.
3. Die p53 Mutationen konnten im Median nach 25 Jahren und nach Billroth II Operationen nachgewiesen werden.
4. Alle Mutationen wurden ausschließlich im Anastomosenbereich detektiert.
5. Es gab keinen Nachweis einer k-ras Mutation.

## 5 Diskussion

### 5.1 DNA-Durchflußzytometrie

Chromosomale Aberrationen sind ein Marker der neoplastischen Transformation. Abweichungen des zellulären DNA-Gehaltes (= DNA-Aneuploidie) und der Zellproliferation lassen sich mit Hilfe der Durchflußzytometrie nachweisen. Die in der Literatur häufig erwähnten Untersuchungen zur DNA-Ploidie und Zellproliferationsrate beim Magenstumpf- und Magenkarzinom beziehen sich auf operativ gewonnene Tumorproben.

Der Prozentsatz diploider bzw. aneuploider Karzinome des Magens weist in der Literatur eine erhebliche Spannweite auf. Während Johnson et al. nur 20% aneuploide Karzinome fanden, konnten Nanus et al. bei 96% der Patienten mit Magenkarzinom eine Aneuploidie nachweisen (Johnson et al. 1993, Nanus et al. 1989). Die detektierten Aneuploidien, waren im Cardiabereich und im gastroösophagealen Übergang signifikant häufiger nachzuweisen als in den distaleren Magenanteilen (Nanus et al. 1989). Weiterhin konnte die Aneuploidie häufiger beim intestinalen Typ des Magenkarzinoms gefunden werden als bei der diffusen Wachstumsform (Sugai et al. 1999). Gut differenzierte Magenkarzinome zeigen ebenfalls gehäufte Aneuploidien als schlecht- oder undifferenzierte Tumoren (Kim und Cho, 2000). Sugai et al. konnten sogar eine Zunahme der Aneuploidie in Abhängigkeit vom Tumorwachstum darstellen. So waren 55,6% der auf die Mukosa begrenzten Karzinome aneuploid, während die in die Submukosa infiltrierten Karzinome 87,5% und die weiter fortgeschritteneren Tumoren 86,4% ein aneuploides Muster aufwiesen (Sugai et al. 1999).

Beim Magenstumpfkarcinom wurden deutlich geringere Aneuploidien beobachtet. In zwei japanischen Studien wurden Aneuploidien in Magenstumpfkarcinome untersucht und mit einer Häufung von 23,1% und 13,9% beschrieben. Diese Aneuploidien wurden alle im Bereich der Anastomose gefunden (Kimura et al. 1994, Ikeguchi et al. 1995). Diese Angabe entspricht auch den eigenen Ergebnissen, bei denen die 4 der 87 (5%) untersuchten Patienten eine Aneuploidie in der Anastomose zeigten. Weiterhin war 1 von den 3 involvierten Karzinomen aneuploid, allerdings ist diese Häufung bei der geringen Anzahl von Karzinomen nicht repräsentativ. Die Aneuploidien in dieser Studie wurden im Median nach 21 postoperativen Jahren gemessen. Die postoperativen Intervalle lagen bei Kimura et al. und Ikeguchi et al. mit 21 und 18 Jahren ebenfalls

deutlich über dem 15-jährigem, postoperativem Intervall, nach dem ein signifikant erhöhtes Karzinomrisiko für den Restmagen besteht. Die in dieser Studie untersuchten Patienten mit DNA-Aneuploidien waren alle nach Billroth II voroperiert worden, bei zwei Patienten wurde zusätzlich zur Billroth-II-Rekonstruktion noch eine Braun-Fußpunktanastomose angelegt. Die in der Literatur beschriebenen Patienten mit Aneuploidien beim Magenstumpfkarcinom waren jeweils zu ca. 50% nach Billroth I und die andere Hälfte nach Billroth II operiert worden. Die eigenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß nach Billroth II Operationen häufiger als nach anderen operativen gastralen Operationen Aneuploidien gesehen werden. Allerdings läßt sich durch die geringe Anzahl der aneuploiden Proben in dieser Studie keine allgemein gültige Aussage über das Operationsverfahren und der Bedeutung von Aneuploidien treffen.

Die Gründe für unterschiedliche ermittelte Aneuploidieprozentsätze in den o.g. Studien sind vielfältig. Es herrschen immer noch unterschiedliche Vorstellungen zur Definition der Aneuploidie vor. Kimura et al. beispielsweise definierten Aneuploidie ab einem Index größer 1,2. Auch die Meßqualität spielt gerade im Hinblick auf die Erkennung nahediploider Tumoren eine bedeutsame Rolle, so daß die Güte einer Messung Einfluß auf den Prozentsatz aneuploider Tumoren in einer Versuchsreihe hat.

Ein anderes Problem liegt in der bekannten Heterogenität solider Karzinome. Wersto et al. fordern in diesem Zusammenhang die Notwendigkeit, jeweils mehrere Proben eines Tumors zu untersuchen, um keine Aneuploidie zu übersehen (Wersto et al. 1991).

Hinzu kommt noch, daß in vielen asiatischen Studien in das Patientenkollektiv Patienten involviert werden, die wegen einer malignen Erkrankung magenteilreseziert wurden. Diese Ergebnisse lassen sich nicht mit Patienten vergleichen, die wegen benignen Ursache operiert wurden, laut Definition des Magenstumpfkarcinoms. Patienten mit einem primären Magenkarzinom zeigen schon sehr früh nach partieller Gastrektomie ein Magenstumpfkarcinom, das aber sicherlich ätiologisch differenziert werden muß.

Zusätzlich zur Ploidie wurde noch die Proliferationsaktivität mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Bisherige Studien beim sporadischen Magenkarzinom konnten einen signifikant höheren S-Phasenanteil (17% vs. 11%) bei aneuploiden als bei diploiden Tumoren nachweisen (Ohyama et al. 1990, Jähne et al. 1993). Weiterhin konnte eine höhere S-Phase (9% vs. 7%) beim differenzierten Karzinom gegenüber dem undifferenzierten gezeigt werden (Ikeguchi et al. 1995). Eine der wenigen Studien, die beim Magenstumpfkarcinom eine S-Phasenbestimmung durchgeführt haben, konnte einen S-Phasenanteil von  $8,0\% \pm 4,2$  nachweisen. Zwischen den in der Studie zusätzlich untersuchten Magenkarzinomen und den Magenstumpfkarcinomen zeigte sich kein

signifikanter Unterschied bezüglich der S-Phasenanteile. Ebenso ließen sich in Bezug auf die vorausgegangene Operation bei den Patienten mit partieller Gastrektomie, die noch kein Karzinom aufwiesen, keine signifikanten Differenzen bei den durchflußzytometrisch gemessenen S-Phasen bestimmen. Patienten die nach Billroth I operiert wurden und keine Neoplasie aufwiesen, hatten einen S-Phasenanteil von 6,0% gegenüber den Billroth II Patienten mit 5,9% (Ikeguchi et al. 1995). Diese Ergebnisse entsprechen teilweise den in dieser Studie gezeigten Daten, so wurde eine mittlere S-Phase mit  $5,29\% \pm 3,27$  für alle operierten Patienten gemessen. Bei den partiell gastrektomierten Patienten ließ sich ebenfalls keine signifikante Differenz bezüglich des vorangegangenen Operationsverfahren nachweisen. Die drei eingeschlossenen Magenstumpfkarcinome zeigten mit  $4,86\% \pm 2,14$  S-Phasenanteil doch deutlich niedrigere Werte, als in der Literatur gefunden wurde. Kallioniemi fand heraus, daß die Heterogenität innerhalb eines Tumors nicht nur für die Ploidie, sondern insbesondere auch für die S-Phasenfraktion, und hier in besonderem Maße für die diploiden Tumoren, stark ausgeprägt ist (Kallioniemi 1988). Die in dieser Studie nachgewiesene mittlere S-Phase für Aneuploidien lag mit  $7,02\% \pm 3,2$  etwas höher als der durchschnittliche S-Phasenanteil von  $5,29\% \pm 3,27$ . Diese Feststellung entspricht auch den publizierten Daten für das Magenkarzinom. Hierbei muß allerdings berücksichtigt werden, daß es bei durchflußzytometrischen Analysen von aneuploiden Tumoren zu Überlagerungen der G0/G1-Phase der aneuploiden Zellen mit der S-Phase der euploiden Zellen kommen kann. Diese Tatsache erschwert die Analyse der einzelnen Zellzyklusphasen, und es kommt zu ungenauen Meßergebnissen. Beim großzelligen Lungenkarzinom konnte gezeigt werden, daß nur bei 65,2% der involvierten 187 Patienten eine zuverlässige Zyklusanalyse möglich war (Volm et al. 1988).

## 5.2 Helicobacter pylori und das Magenkarzinom

Wie viele klinische Studien zeigten, muß man davon ausgehen, daß der *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ein ätiologisches Agens für die Ursache des Magenkarzinoms darstellt.

Eine gestörte Apoptose stellt im Rahmen der Karzinogenese des Magenkarzinoms eine entscheidende Komponente dar. Obwohl die Apoptose nicht in dem Ausmaß wie beim Kolonkarzinom untersucht wurde, zeigten doch einige Studien, eine Assoziation der *H. pylori*-Infektion mit einer gesteigerten Apoptoserate. Die *H. pylori*-Infektion führt

zu einer vermehrten DNA-Schädigung in den Epithelzellen, die dann durch das Apoptoseprogramm absterben. Moss et al. konnten zeigen, daß bei nichtinfizierter Magenschleimhaut 2,9% der epithelialen Zellen Apoptosezeichen aufwiesen, während bei einer *H. pylori*-infizierten Schleimhaut der Anteil von apoptotischen Zellen bei 16,8% lag (Moss et al. 1996). Diese Daten wurden in anderen Studien bestätigt (Jones et al. 1996). Weiterhin wurde eine verminderte Expression des E-cadherin-Proteins bei *Helicobacter pylori* Infektionen mit histologisch unauffälliger Magenschleimhaut, bei Gastritis und bei Magen - / Dünndarmulkus beobachtet (Terres et al. 1998). Ob die *H. pylori*-Infektion als Ursache für die verminderte E-cadherin-Expression anzusehen ist, oder ob die Minderexpression als solche zu einer malignen Transformation führt, ist bisher noch nicht ausreichend untersucht worden.

Die Aktivierung der Telomerase ist verantwortlich für die Immortalität der Zellen. Sie ist ein häufig beobachtetes Ereignis bei gastrointestinalen Neoplasien. Bei ansteigendem *H. pylori*-Infektionsgrad wurde ein paralleler Anstieg der humanen Telomerase-RNA-Expression (hTR) nachgewiesen (Kuniyasu et al. 1997). Im Gegensatz dazu war die Mikrosatelliteninstabilität unabhängig von einer *H. pylori*-Infektion (Lin et al. 1995). Wu et al. konnten einen Zusammenhang von *H. pylori*-Infektion und molekularen Ereignissen bei p53, c-erbB-2, c-met, APC und DCC nachweisen. Die Veränderungen wurden sowohl beim intestinalen als auch beim diffusen Typ des Magenkarzinoms in gleicher Art und Weise beobachtet (Wu et al. 1997).

Es sind jedoch noch weiter molekularbiologischen Untersuchungen notwendig, um die *H. pylori*-Infektion als ätiologischer Faktor in der Karzinogenese des Magenkarzinoms charakterisieren zu können.

Beim Magenstumpfkarcinom wurde bisher keine Bedeutung der *H. pylori*-Infektion nachgewiesen, so konnte Greene bei 153 Patienten nach partieller Gastrektomie keinen *H. pylori* in deren Restmagenschleimhaut detektieren, obwohl 6,7% (11/153) der beobachteten Patienten ein Magenstumpfkarcinom entwickelten (Greene 1995). Diese Daten weisen darauf hin, daß die *H. pylori*-Infektion bei der Karzinogenese des Magenstumpfkarcinoms nur eine untergeordnete Rolle spielt. In der hier durchgeführten Studie wurde der *H. pylori* Status nicht evaluiert.

### 5.3 Molekularbiologischer Hintergrund der Karzinogenese

Das Magenstumpfkarcinom stellt für die Untersuchung von Karzinogeneseprozessen eine geeignete Erkrankung dar. Die Karzinomentwicklung erfolgt im Laufe eines längeren Zeitraumes über mehrere Zwischenstufen, die einzelnen Entwicklungsstufen sind hierbei makroskopisch teilweise erkennbar und einer minimalinvasiven (endoskopischen) Gewebegewinnung zugänglich. Die Karzinogenese des Magenstumpfkarcinoms soll in Anlehnung an die bekannten molekularbiologischen Ergebnisse des Magenkarzinoms betrachtet werden. In den zurückliegenden Jahren konnten für die Initiierung und Progression des Magenkarzinoms genetische Veränderungen in Tumorsuppressor- und Onkogenen gezeigt werden.

Verschiedene Studien zum Nachweis von Loss of Heterozygosity (LOH) und Comparative genomic hybridization (CGH) Analysen haben einige Chromosomenabschnitte identifiziert, die auf einen Allelverlust hinweisen. Betroffen sind davon mögliche Tumorsuppressorgene, die im Rahmen der Karzinogenese des Magenkarzinoms eine bedeutende Rolle spielen. Folgende chromosomale Regionen waren betroffen: 3p, 4, 5q (30 bis 40% am oder in der Nähe des APC Genlokus) (Sano et al. 1991, Rhyu et al. 1994), 6q (Carvallo et al. 1999), 9p, 17p (über 60% am p53 Genlokus) (Sano et al. 1991), 18q (über 60% am DCC Genlokus) (Uchino et al. 1992) und 20q (Moskaluk et al. 1998, el-Rifai et al. 1998, Yustein et al. 1999). Auf Chromosom 11p15 wurden LOH bei proximalen und distalen Magenkarzinomen gefunden, was als Hinweis für eine gemeinsame Karzinogenese sprechen würde (Moskaluk und Rumpel, 1998). Ein LOH des Lokus 7p (D7S959) ist mit einer peritonealen Metastasierung verbunden.

Die Häufigkeit der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) beim sporadischen Magenkarzinom reicht von 13% bis 44% (Seruca et al. 1995). Die MSI scheint ein Hinweis für fortgeschrittene Magenkarzinome vom intestinalen Typ zu sein. Der Grad der genomischen Instabilität steigt signifikant mit der zunehmenden MSI. Bei einer MSI von über 33% spricht man von einer high-rate MSI (MSI-H), ansonsten von einer low-rate MSI (MSI-L) (dos Santos et al. 1996). Bei verminderter Proteinexpression der hMLH1 oder hMSH2 Gene ist die Hypermethylierung für diese Inaktivierung verantwortlich (Leung et al. 1999, Fleisher et al. 1999). Bei den MSH-positiven Tumoren finden sich in den kodierenden Regionen mit einfachen repetitiven Sequenzen, Gene für TGF- $\beta$  II Rezeptor, BAX, IGFR II, hMSH3, hMSH6 und E2F-4. Studien an phenotypischen MSI-H

Magenkarzinomen zeigten hauptsächlich einen mutierten TGF- $\beta$  II Rezeptor in einem Adeninkomplex (Oliveira et al. 1998, Park et al. 1994). In MSI-Läsionen wurden aber auch andere TGF- $\beta$  II Rezeptorgene gefunden.

Das sporadische Magenkarzinom, besonders der diffuse Typ, zeigt am E-cadherin-Gen DNA-Veränderungen, die zu einer abnormalen Transkription mit einer veränderten oder verminderten E-cadherin-Expression führen (Mayer et al. 1993, Machando et al. 1998). Eine reduzierte E-cadherin-Expression ist mit einer schlechteren Überlebensrate verbunden (Jawhari et al. 1997). Eine verminderte E-cadherin-Expression wird durch LOH und Missense-Punktmutationen hervorgerufen, einige Tumoren zeigen in beiden Allele genetische Veränderungen (Berx et al. 1998). Somatische E-cadherin Genveränderungen wurden auch bei anderen Tumoren mit diffusen Komponenten beobachtet (Machado et al. 1999). Alpha-catenin, ein intrazelluläres Verbindungsprotein zwischen der E-cadherin-Domäne und Elementen des Zytoskeletts, zeigt in vielen Tumoren eine immunohistochemische verminderte Expression und korreliert mit dem infiltrativen Wachstum, sowie mit einer geringeren Tumorzelldifferenzierung (Matsui et al. 1998). Beta-catenin ist in ähnlicher Weise beim Magenkarzinom verändert. Ein weiterer Inaktivierungsmechanismus der E-cadherin-Funktion wird durch eine Promotormethylierung verursacht (Yokozaki 2000, Suzuki et al. 1999)

Beim Magenkarzinom gibt es Hinweise für die Lokalisation eines Tumorsuppressorgens auf dem Chromosom 3p (Kastury et al. 1996, Schneider et al 1995). Dieser Chromosomenabschnitt beinhaltet das FHIT Gen. Magenkarzinome mit einem Gendefekt zeigten eine veränderte Transkription, einen Verlust von Exons (Ohta et al. 1996), eine somatische Missensemutation im Exon 6 und eine verminderte FHIT-Proteinexpression (Baffa et al 1998).

Ein LOH für das APC Tumorsuppressorgen konnte in 30% der Magenkarzinome detektiert werden, es nimmt eine bedeutende Stellung bei der Karzinogenese ein (Nagase und Nakamura, 1993)

Weiterhin wurden Amplifikationen und Überexpressionen der c-met Gene beim Magenkarzinom beobachtet. Diese Gene kodieren für einen Tyrosinkinase-Rezeptor (Kuniyasu et al. 1992). Andere Wachstumsfaktoren und Rezeptor-Signal-Systeme, die beim Magenkarzinom nachgewiesen wurden und an der Karzinogenese beteiligt sind: EGF (Epidermal growth factor), TGF-alpha, Interleukin-1-a, Cripto, Amphiregulin, PDGF (Platelet-derived growth factor) und K-sam (Tahara et al. 1996). Amplifikationen des c-erbB-2 Onkogens, das für einen transmembranösen Tyrosinkinase-Rezeptor kodiert, wurden in nahezu 10% von gastralen Neoplasien gefunden, eine Überexpression

ist mit einer schlechten Prognose verbunden (David et al. 1992). Die Gene der ras-Familie (H-ras, N-ras und K-ras) kodieren für 21 kD-Proteine, die gebundenes GTP zu GDP hydrolisieren. GTP-ras stellt die aktive Proteinkonfiguration dar und führt bei einer Mutation durch ein persistierendes Aktivierungssignal zu einer neoplastischen Transformation (Barbacid 1987, Bos 1989) Beim intestinalen Typ des Magenkarzinoms zeigten sich 9% von mutiertem k-ras (Ranzani et al. 1990). Eine Telomerase Aktivität wurde im späten Stadium bei Magenkarzinomen detektiert, die Beobachtung einer solchen ist ebenfalls mit einer schlechten Prognose behaftet (Hiyama et al. 1995).

Genetische Veränderungen	Diffuser Typ (%)	Intestinaler Typ (%)
Genetische Instabilität	40	11
LOH und Tumorsuppressorgene		
LOH auf Chromosom 1p	38	25
LOH auf Chromosom 1q	-	44
LOH auf Chromosom 7q	33	53
p53 (LOH, Mutation)	76	60
DCC (LOH)		50
APC (LOH, Mutation)		40 - 60
Proto-Onkogene		
K-sam (Amplifikation)	33	-
c-met (Amplifikation)	39	19
k-ras (Mutation)	-	9
c-erbB-2 (Amplifikation)	-	20
Bcl-2 (LOH)	-	43
Cyclin E (Amplifikation)	10	10
E-cadherin (Amplifikation)	50	-
Mikrosatelliteninstabilität (MSI)	2	15

Tabelle 12 Genetische Veränderungen beim Magenkarzinom, Unterteilung in diffusen und intestinalen Typ.

### 5.3.1 p53-Tumorsuppressorgen

Ziel dieser Arbeit war es, durch den Zusammenhang von histologischen Befunden und p53-Status in einem großen Probenkollektiv (495 Biopsien) einen Rückschluß auf die Bedeutung des p53 Tumorsuppressorgens in der Karzinogenese des Magenstumpfkarcinoms zu erhalten.

Beim Magenkarzinom wurde LOH für das p53 Tumorsuppressorgen in über 60% der Fälle identifiziert, während p53 Mutationen, abhängig von der Mutationsnachweismethode, nur in 30% bis 50% gefunden wurden (Hollstein et al. 1996, Tolbert et al. 1999). In der intestinalen Metaplasie wurden p53-Mutationen gefunden, die meisten p53 Veränderungen zeigten sich jedoch im fortgeschrittenen Magenkarzinom (Fenoglio-Preiser et al. 1996). Die p53 Mutationen repräsentieren beim Magenkarzinom ein ähnliches Spektrum wie bei anderen gastrointestinalen Tumoren mit einer Prädominanz des Basenaustausches von CpG Dinukleotiden. Verschiedene Studien beschreiben ein Auftreten von p53-Mutationen erst im späten Stadium des Magenkarzinoms (Craanen et al. 1995, Yamada et al. 1991, Kim et al. 1991). Es wurden jedoch auch p53-Mutationen in frühen Karzinomstadien sowie in schweren intraepithelialen Neoplasien (Dysplasien) beobachtet (Parenti et al. 1995, Craanen et al. 1995, Oiwa et al. 1995). Der immunohistochemische Nachweis des p53-Proteins korreliert mit der Aneuploidie der Tumorzellen und einem erhöhten Potential, in regionale Lymphknoten zu metastasieren (Kitayama et al. 1995). Im fortgeschrittenen Stadium der Magenkarzinome vom intestinalen und diffusen Typ treten p53-Mutationen in einer gemeinsamen Endstrecke auf (Craanen et al. 1995).

Beim Magenkarzinom werden im Durchschnitt in 31% p53-Mutationen detektiert (Tolbert et al. 1999, Ricevuto et al. 1996, Uchino et al. 1992, Hongyo et al. 1995). Safatle-Ribeiro et al. konnten als einzige beim Magenstumpfkarcinom in 35,7% p53-Mutationen von 14 Patienten mit einem postoperativem Intervall von 32 Jahren nachweisen (Safatle-Ribeiro et al., 1996). In der hier durchgeführten Studie zeigten zwei von drei Magenstumpfkarcinome eine Mutation, beide wurden jeweils 25 Jahre nach erfolgter partieller Gastrektomie detektiert. Bei beiden Patienten wurde eine Billroth II Operation durchgeführt. Zu diesen beiden Karzinompatienten, konnten noch bei sieben weiteren Patienten eine p53-Mutation gezeigt werden. Somit wiesen 10,3% der untersuchten 87 Patienten eine p53 Mutation auf. Die Mutationen traten im Median bei allen Patienten nach 25 postoperativen Jahren auf. Bei 8 (88,9%) der 9 Patienten, die eine p53 Mutation zeigten, lag die Operation mindestens 20 Jahre zurück. Alle Patienten die

eine Mutation aufwiesen, waren nach Billroth II operiert worden. Wie diese Untersuchungen zeigen treten p53-Mutationen bei Patienten nach partieller Gastrektomie zu einem sehr späten Zeitpunkt auf. Bei einer deutlichen Risikozunahme nach 15 postoperativen Jahren, kann die Detektion einer p53-Mutation zur Verlaufskontrolle solcher magenoperierten Patienten nicht herangezogen werden. Die o.g. Studie von Safatle et al. bestätigt diese Aussage. Li und Lu. untersuchten präkanzeröse Läsionen, sie konnten bei der intestinalen Metaplasie in 11,8% und bei der intraepithelialen Neoplasie in 31,3% p53-Mutationen nachweisen (Li und Lu, 1998). Allerdings lag die Mutationsrate bei den Magenkarzinomen von Li et al. mit 60,1% deutlich über den sonstigen Literaturangaben. Die Mutationen wurden mittels Sequenzierung detektiert. Eine ebenfalls hohe Mutationsrate des p53 bei nicht malignen Veränderungen der Magenschleimhaut konnten Murakami et al. nachweisen: 52,4% der untersuchten 21 Patienten mit *Helicobacter pylori* positiver Gastritis zeigten eine p53-Mutation, während die Patienten ohne Gastritisnachweis keine Mutationen aufwiesen. Insgesamt betrachtet, findet man in Magenadenomen und bei der chronischen atrophischen Gastritis in 33% p53-Mutationen (Tohdo et al. 1993), ähnliche Zahlen wurden für die intestinale Metaplasie und die intraepitheliale Neoplasie gezeigt (Shiao et al. 1994, Ochiai et al. 1996). Diese Studien könnten darauf hinweisen, daß eine *H. pylori*-Gastritis als mögliche Ursache für eine p53-Mutation diskutiert werden muß. Hierzu fehlen aber derzeit noch beweisende Studien.

Eine immunohistochemische p53 Überexpression kann indirekt ein Hinweis für eine p53 Mutation sein. Die Auswertung von immunohistochemischen Studien die p53-Protein-Expressionsmuster untersuchten, ergab keine zusätzlichen Hinweise für die Bedeutung des p53 bei der Karzinogenese des Magenkarzinoms (Gabbert et al. 1995, Hurlimann und Saraga, 1994). Überexpressionen des p53-Proteins beim Karzinom wurden in 33% bis 57% gefunden (Kakeji et al. 1993, Martin et al. 1992, Sasano et al. 1993, Romiti et al. 1998). Kitayama et al. und Romiti et al. konnten nur bei malignen Läsionen eine p53-Überexpression finden, während benigne Magenschleimhautveränderungen keine Überexpression zeigten (Kitayama et al. 1995, Romiti et al. 1998). Gomyo et al. sahen in der normalen Mukosa keine, bei der intestinalen Metaplasie in 22% und beim Magenkarzinom in 54% p53-Überexpression (Gomyo et al. 1996). Zur genaueren Abklärung von prämaligen Läsionen im Magen, untersuchte Kim et al. Karzinome mit und ohne dysplastische Vorstufen. So konnte er zeigen, daß Magenkarzinome, die auf dem Boden von Dysplasien entstanden waren, zu 90% eine p53-Expression zeigten, die dazugehörigen intraepithelialen Neoplasien waren mit 40%

p53-Expression schon deutlich erhöht. Im Gegensatz dazu waren die Malignome ohne dysplastische Vorstufen nur zu 20% positiv für p53 (Kim et al. 1999). Hieraus würde sich ableiten, daß zum einen die p53-Genveränderung ein Frühereignis bei der Karzinogenese wäre und daß sich zum anderen die Pathomechanismen der Karzinogenese bei intraepithelialen Neoplasien vom denen ohne unterscheidet. Die unterschiedlichen Ergebnisse der immunohistochemischen Untersuchungen des p53-Expressions-musters lassen sich auf unterschiedliche Methoden der Fixation und sonstige methodische Unterschiede zurückführen (Fisher et al. 1994).

Die in dieser Studie gefundene Anzahl von 10,3% an p53-Mutationen könnte durchaus eine zu geringe Zahl darstellen. Die Proben wurden nach der PCR mit einer SSCP-Analyse auf Mutationen untersucht. Tolbert et al. untersuchten 78 fortgeschrittene Magenkarzinome auf p53-Mutationen mit PCR-SSCP und Sequenzierung, sowie die p53-Expression mit immunohistochemischen Methoden. Dabei konnte die SSCP-Analyse 38% weniger p53-Mutationen detektieren als durch die Sequenzierung der gleichen Proben gesehen wurde (Tolbert et al. 1999).

### 5.3.2 Onkogen k-ras

In Anlehnung zu der für das sporadische Magenkarzinom beschriebenen Situation fanden sich keine k-ras-Mutationen. Primär deutet dies auf eine untergeordnete Rolle des k-ras-Onkogens in der Entstehung des Magenstumpfkarcinoms hin. Vor dem Hintergrund der für das sporadische Magenkarzinom beschriebenen Mutationszahlen ist hier jedoch kritisch die Sensitivität der PCR-SSCP-Analyse als Mutationsscreeningverfahren zu hinterfragen. Hinweise auf (Punkt-) Mutationen werden durch resultierenden Konformationsänderungen der denaturierten Einzelstränge, nachgewiesen durch ein verändertes Laufverhalten im Elektrophoresegel, gewonnen. Methodische Untersuchungen konnten, durch den Vergleich mit Sequenzierungsdaten, eine befriedigende Sensitivität dieses Verfahren zeigen (Hayashi 1991, Landegren 1992). Vor diesem Hintergrund und aufgrund eines nicht erfolgten Vergleiches mit Sequenzierungsdaten kann ein Unterschätzen der tatsächlich vorhandenen k-ras-Mutationen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Somit ist aus den vorgelegten Ergebnissen abzuleiten, daß die k-ras-Mutation im Epithel des Restmagens für die Abschnitte der neoplastischen Transformation im frühen Stadium bis hin zum invasiven Karzinom von untergeordneter Bedeutung ist. Vor dem Hintergrund der niedrigen Anzahl analysierter Biopsien mit

dysplastischen Veränderungen und Karzinomproben bleibt eine endgültige Aussage über den Status spät detektierbarer k-ras-Mutationen beim Magenstumpfkarcinom Studien mit größeren Patientenkollektiven vorbehalten.

## 5.4 Schlußfolgerung und Perspektiven

Die hier vorgelegten Ergebnisse konnten zeigen, daß die p53-Tumorsuppressorgen-Mutation sowie die DNA-Aneuploidie in der Anastomose Ereignisse im Rahmen der neoplastischen Transformation darstellen. Hingegen scheinen k-ras-Mutationen seltene Ereignisse bei der Entstehung des Magenstumpfkarcinoms zu sein. Die endgültige Bedeutung der p53-Mutationen bedarf einer weiteren Überprüfung in größeren Kollektiven.

Folgende Perspektiven und Erfordernisse ergeben sich aus diesen Daten:

1. Die Ergebnisse weisen zum einen auf eine bedeutende Rolle des p53-Tumorsuppressorgens in der Karzinogenese hin. Angesichts der großen Häufigkeit gefundener p53-Veränderungen bereits in prämaligen Stadien, muß die funktionelle Bedeutung hinsichtlich einer gestörten Zellzyklusregulation bzw. einer beeinträchtigten Apoptoseinduktion weiter untersucht werden.
2. Die Detektion von p53-Veränderungen erfordert unter klinischen Gesichtspunkten die longitudinale und prospektive Evaluation dieser Veränderungen als Diagnose - bzw. Risikomarker einer neoplastischen Transformation im Magenstumpf.
3. Weiterhin sollten molekularbiologische Marker evaluiert werden, die zusätzlich zur histologischen Diagnostik zur Überwachung von partiell gastrektomierten Patienten dienen können.

## 6 Literatur

**Baffa R., Veronese M.L., Santoro R., Mandes B., Palazzo J.P., Rugge M., Santoro E., Croce C.M., Hübner K.** (1998)  
Loss of FHIT expression in gastric carcinoma  
Cancer Res 58, 4708-4714

**Balfour D.C.** (1922)  
Factors influencing the life expectancy of patients operated for gastric ulcer  
Ann Surg 76, 405-408

**Barbacid M.** (1987)  
ras Genes  
Annu Rev Biochem 56, 779-827

**Bechi P., Amorosi A., Mazzanti R., Romagnoli P., Tonelli L.** (1987)  
Gastric histology and fasting bile reflux after partial gastrectomy  
Gastroenterology 93, 335-343

**Berx G., Becker K.F., Hofler H., van-Roy F.** (1998)  
Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene  
Hum Mutat 12, 226-237

**Bos J.L.** (1989)  
ras oncogenes in human cancer: a review  
Cancer Res 49, 4682-4689

**Brenes F., Correa P.** (1993)  
Pathology of gastric cancer  
Oncol Clin North Am 2, 347-370

**Carvalho B., Seruca R., Carneiro F., Buys C.H., Kok K.** (1999)  
Substantial reduction of the gastric carcinoma critical region at 6916.3-923.1  
Genes Chromosomes Cancer 26, 29-34

**Caygill C.P.J., Kirkham J.S., Hill M.J., Northfield T.C.** (1986)  
Mortality from gastric cancer following gastric surgery for peptic ulcer  
Lancet 1(8487), 929-931

**Craanen M.E., Blok P., Dekker W., Ferwerda J, Tytgate G.N.J.** (1991)  
Prevalence of subtypes of intestinal metaplasia in gastric antral mucosa  
Dig Dis Sci 36, 1529-1536

- Craanen M.E., Blok P., Dekker W., Offerhaus G.J., Tytgat G.N.** (1995)  
Chronology of p53 protein accumulation in gastric carcinogenesis  
*Gut* 36, 848-852
- David L., Seruca R., Nesland J.M., Soares P., Sansonetty F., Holm R., Borresen A.L., Sobrinho S.M.** (1992)  
c-erbB-2 expression in primary gastric carcinomas and their metastases  
*Mod Pathol* 5, 384-390
- Domellöf L. Eriksson S., Janunger K.G.** (1977)  
Carcinoma and possible precancerous changes of the gastric stump after Billroth II resection  
*Gastroenterology* 73, 462-468
- dos Santos N.R., Seruca R., Constancia M., Seixas M., Sobrinho S.M.** (1996)  
Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma  
*Gastroenterology* 110, 38-44
- Eberlein T.J., Lorenzo F.V., Webster M.W.** (1978)  
Gastric carcinoma following operation for peptic ulcer disease  
*Ann Surg* 187, 247-256
- el-Rifai W., Harper J.C., Cummings O.W., Hyytinen E.R., Frierson H.F., Knuutila S., Powell S.M.** (1998)  
Consistent genetic alterations in xenografts of proximal stomach and gastro-esophageal junction adenocarcinomas  
*Cancer Res* 58, 34-37
- Fenoglio-Preiser C.M., Noffsinger A.E., Belli J., Stemmermann G.N.** (1996)  
Pathologic and phenotypic features of gastric cancer  
*Semin Oncol* 23, 292-306
- Fisher C.J., Gillet C.E., Vojtesk B., Millis R.R.** (1994)  
Problem with p53 immunohistochemical staining: the effect of fixation and variation in the method of evaluation  
*Br J Cancer* 69, 26-31
- Fleisher A.S., Esteller M., Wang S., Tamura G., Suzuki H., Yin J., Zou T.T., Abraham J.M., Kong D., Smolinski K.N., Shi Y.Q., Rhyu M.G., Powell S.M., James S.P., Wilson K.T., Herman J.G., Meltzer S.J.** (1999)  
Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability  
*Cancer Res* 59, 1090-1095

**Flyger H.L., Christensen I.J., Thorup T.U., Häkansson T.U., Norgaard T.** (1995)  
DNA aneuploidy in gastric carcinoma  
Scand J Gastroenterol 30, 258-264

**Fuchs K.H., Thiede A., Engemann R., Deltz E., Stremme O., Hamelmann H.** (1995)  
Reconstruction of the food passage after total gastrectomy: randomized trial  
WorldJ Surg 19, 678-706

**Gabbert H.E., Muller W., Schneiders A., Meier S., Hommel G.** (1995)  
The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma  
Cancer 76, 720-726

**Giacosa A., Molinari F., Perasso A., Cheli R.** (1979)  
Endoscopic experiences in the diagnosis of gastric stumb cancer  
Front Gastrointest Res 5, 160-163

**Goebell H.** (1978)  
Magenersatz, Funktionsausfälle und erforderliche Substitutionstherapie  
Chirurg 49, 89-94

**Gomyo Y., Osaki M., Kaibara N., Ito H.** (1996)  
Numerical aberration and point mutation of p53 gene in human gastric intestinal m e-  
taplasia and well-differentiated adenocarcinoma  
Int J Cancer 66, 594-599

**Greene F.L.** (1995)  
Discovery of early gastric remnant carcinoma  
Surg Endosc 9, 1199-1203

**Hayashi K.** (1991)  
PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic  
DNA  
PCR Methods and Applications 1, 34-38

**Hiddemann W., Schumann J., Andreef M., Barlogie B., Herman C.J., Leif R.C.,  
Mayall B.H., Murphy R.F., Sandberg A.A.** (1984)  
Convention on nomenclature for DNA cytometry. Committee on Nomenclature, Society  
for Analytical Cytology  
Cancer Genet Cytogenet 13, 181-183

**Hiyama E., Yokoyama T., Tatsumoto N., Hiyama K., Imamura Y., Murakami Y.,  
Kodama T., Piatyszek M.A., Shay J.W., Matsuura Y.** (1995)  
Telomerase activity in gastric cancer  
Cancer Res 55, 3258-3262

- Hollstein M., Marion M.J., Lehmann T., Welsh J., Harris CC., Martel P.G., Kusters I., Montesano R.** (1994)  
p53 mutations at A:T base pairs in angiosarcomas of vinyl chloride-exposed factory workers  
*Carcinogenesis* 15, 1-3
- Hongyo T., Buzard G.S., Palli D., Weghorst C.M., Amorosi A., Galli M., Caporaso N.E., Fraumeni J.F., Rice J.M.** (1995)  
Mutation of k-ras and p53 genes in gastric adenocarcinomas from high-incidence region around Florence, Italy  
*Cancer* 55, 2665-2672
- Hurlimann J., Saraga E.P.** (1994)  
Expression of p53 protein in gastric carcinomas. Association with histologic type and prognosis  
*Am J Surg Pathol* 18, 1247-1253
- Ikeguchi M., Kondou A., Oka A., Tsujitani S., Maeta M., Kaibara N.** (1995)  
Flow cytometric analysis of the DNA content of tumor cells in cases of gastric cancer in the upper third of the stomach and in the remnant stomach  
*Oncology* 52, 116-122
- Ikeguchi M., Katano K., Oka A., Kurayoshi K., Tsujitani S., Maeta M., Kaibara N.** (1995)  
Relationship between the cell-proliferative activity of gastric cancers and that of the normal epithelium  
*Anticancer Research* 15, 821-826
- Imai T., Kubo T., Watanabe H.** (1971)  
Chronic gastritis in Japanese with reference to high incidence of gastric carcinoma  
*J Natl Cancer Inst* 47, 179-195
- Jähne J., Urmacher C., Cordon-Cardo C., Meyer H.J., Pichelmayer R.** (1993)  
DNA-Analyse beim Magenkarzinom – Korrelation von Aneuploidie mit der Tumorlokalisation  
*Chirurg* 64, 275-278
- Jass J.R., Filipe M.I.** (1980)  
Sulphomucins and precancerous lesions of the human stomach  
*Histopathology* 4, 271-279
- Jawhari A., Jordan S., Poole S., Browne P., Pignatelli M., Farthing M.J.** (1997)  
Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival  
*Gastroenterology* 112, 46-54

- Johnson H., Belluco C., Masood S., Kahn L., Wiese L.** (1993)  
The value of flow cytometric analysis in patients with gastric cancer  
Arch Surg 128, 314-317
- Jones N.L., Yeger H., Cutz E., Sherman P.M.** (1996)  
Helicobacter pylori induces apoptosis of gastric antral epithelial cells in vivo  
Gastroenterology 110, A933
- Kakaji Y., Korenaga D., Tsujitani S., Baba H., Anai H., Maehara Y., Sugimachi K.** (1993)  
Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasis to lymph nodes  
Br J Cancer 67, 589-593
- Kallioniemi O.P.** (1988)  
Comparison of fresh and paraffin embedded tissue as starting material for DNA flow cytometry and evaluation of intratumor heterogeneity  
Cytometry 9, 164-169
- Kaminishi M., Shimizu N., Yamaguchi H., Hashimoto M., Sakai S., Oohara T.** (1995)  
Different carcinogenesis in the gastric remnant after gastrectomy for gastric cancer  
Cancer 77, 1646-1653
- Kastury K., Baffa R., Druck T., Ohta M., Cotticelli M.G., Inoue H., Negrini M., Ruge M., Huang D., Croce C.M., Palazzo J, Hübner K.** (1996)  
Potential gastrointestinal tumor suppressor locus at the 3p14.2 FRA3B site identified by homozygous deletions in tumor cell lines  
Cancer Res 56, 978-983
- Kelly K.A., Becker J.M., van Heerden A.** (1981)  
Reconstructive gastric surgery  
BrJ Surg 68, 687-691
- Kim H.R., Park M.I., Jung Y., Yang S., Hong W.S.** (1999)  
p53 protein expression in gastric dysplasia and carcinoma  
Gastroenterology 116, A439
- Kim J.H., Takahashi T., Chiba I.** (1991)  
Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumors and cell lines  
J Natl Cancer Inst 83, 938-943
- Kim J.Y., Cho H.J.** (2000)  
DNA ploidy patterns in gastric adenocarcinoma  
J Korean Med Sci 15(2), 159-166

**Kimura H., Kanno M., Takamura H., Arakawa H., Maeda K., Uogishi M., Sodani H., Kawashima T.** (1994)

Implications of flow cytometry in preoperative detection of biologic variables of gastric cancer and malignant condition of gastric remnant cells obtained by endoscopic biopsy  
*Oncology* 51, 479-484

**Kitayama Y., Sugimura H., Tanaka M., Nakamura S., Kino I.** (1995)

Expression of p53 and flow cytometric DNA analysis of isolated neoplastic glands of the stomach

*Virchows Arch* 426, 557-562

**Kühlmayer R., Rokitansky O.** (1954)

Das Magenstumpfkarcinom als Spätproblem der Ulkuschirurgie

*Langenbecks Arch* 278, 361-375

**Kujath P., Eckmann C., Broll R., Woltmann A., Hohlbach G.** (1995)

Das Magenstumpfkarcinom

*Langenbecks Arch Chir* 380, 108-114

**Kuniyasu H., Domen T., Hamamoto T.** (1997)

Expression of human telomerase RNA is an early event of stomach carcinogenesis

*Jpn J Cancer Res* 88, 103-107

**Kuniyasu H., Yasui W., Kitadai Y., Yokozaki H., Ito H, Tahara E.** (1992)

Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer

*Biophys Res Commun* 189, 227-232

**Landegren U.** (1992)

Detection of mutations in human DNA

*GATA* 9, 3-8

**Langhans P., Heger R.A., Hohenstein J., Bünthe H.** (1981)

Operation-Sequel Carcinoma – An Experimental Study

*Hepato-Gastroenterol* 28, 34-37

**Lauwers G.Y., Shimizu M., Correa P., Riddell R.H., Kato Y., Lewin K.J., Yamabe H., Sheahan D.G., Lewin D., Sipponen P., Kubilis P.S., Watanabe H.** (1999)

Evaluation of gastric biopsies for neoplasia: differences between Japanese and Western pathologist

*Am J Surg Pathol* 23, 511-518

**Leung S.Y., Yuen S.T., Chung L.P., Chu K.M., Chan A.S., Ho J.C.** (1999)

hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability

*Cancer Res* 59, 159-164

- Li Z., Lu Y.** (1998)  
High frequent mutation of p53 gene in human gastric cancer and precancerous lesions  
Chung-Hua-Chung-Liu-Tsa-Chih 20, 90-93
- Lin S.T., Wu M.S., Shun C.T., Wang H.P.** (1995)  
Microsatellite instability in gastric carcinoma with special references to histopathology and cancer stages  
Eur J Cancer 31A, 1879-1882
- Logan R.F.A., Langmann M.J.S.** (1983)  
Screening for gastric cancer after gastric surgery  
Lancet 350, 667-670
- Lorusso D., Linsalata M., Pezzolla F., Berloco P., Osella A.R., Guerra V., Di-Leo A., Demma I.** (2000)  
Duodenogastric reflux and gastric mucosal polyamines in the non-operated stomach and in the gastric remnant after Billroth II gastric resection. A role in gastric carcinogenesis?  
Anticancer-Res 20(3B), 2197-2201
- Lygidakis N.J.** (1986)  
Histologic changes after elective surgery for duodenal ulcer  
Acta Chir Scand 152, 139-144
- Machado J.C., Soares P., Carneiro F., Rocha A., Beck S., Blin N., Bex G., Sobriho S.M.** (1999)  
E-cadherin gene mutations provide a genetic basis for the phenotypic divergence of mixed gastric carcinomas  
Lab Invest 79, 459-465
- Martin H.M., Filipe M.I., Morris R.W., Lane D.P., Silvestre F.** (1992)  
p53 expression and prognosis in gastric carcinoma  
Int J Cancer 50, 859-862
- Mason R.C., Taylor P.R., Filipe M.I., McColl I.** (1988)  
Pancreaticoduodenal secretions and the genesis of gastric stump carcinoma in the rat  
Gut 29, 830-834
- Matsui S., Shiozaki H., Inoue M., Tamura S., Doki Y., Kadowaki T., Iwazawa T., Shimaya K., Nagafuchi A., Tsukita S.** (1994)  
Immunohistochemical evaluation of alpha-catenin expression in human gastric cancer  
Virchows Arch 424, 375-381

- Mayer B., Johnson J.P., Leitl F., Jauch K.W., Heiss M.M., Schildberg F.W., Birchmeier W., Funke I.** (1993)  
E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration  
*Cancer Res* 53, 1690-1695
- Moss S.F., Calam J., Agarwal B., Wang S., Holt P.G.** (1996)  
Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*  
*Gut* 38, 498-501
- Moskaluk C.A., Rumpel C.A.** (1998)  
Allelic deletion in 11p15 is a common occurrence in esophageal and gastric adenocarcinoma  
*Cancer* 83, 232-239
- Moskaluk C.A., Hu J., Perlman E.J.** (1998)  
Comparative genomic hybridization of esophageal and gastroesophageal adenocarcinomas shows consensus areas of DNA gain and loss  
*Genes Chromosomes Cancer* 22, 305-311
- Nagase H., Nakamura Y.** (1993)  
Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene  
*Hum Mutat* 2, 425-434
- Nanus D.M., Kelsen D.P., Niedzwiecki D., Chapman D., Brennan M., Cheng E., Melamed M.** (1989)  
Flow cytometry as a predictive indicator in patients with operable gastric cancer  
*J Clin Oncol* 7, 1105-1112
- Ochiai A., Yamauchi Y., Hirohashi S.** (1996)  
p53 mutations in the non-neoplastic mucosa of the human stomach showing intestinal metaplasia  
*Int J Cancer* 69, 28-33
- Offerhaus G.J.A., Tersmette A.C., Huibregtse K., Van de Stadt J., Tersmette K.W.F., Stijnen T.H., Hoedemaker Ph.J., Vandenbroucke J.P., Tytgat G.N.J.** 1988  
Mortality caused by stomach cancer after remote partial gastrectomy for benign conditions: 40 years of follow up of an Amsterdam cohort of 2633 postgastrectomy patients  
*Gut* 29, 1588-1590
- Ohta M., Inoue H., Cotticelli M.G., Kastury K., Baffa R., Palazzo J., Siprashvili Z., Mori M., McCue P., Druck T.** (1996)  
The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma associated t(3;8) breakpoint is abnormal in digestive tract cancers  
*Cell* 84, 587-597

**Ohyama S., Yonemura Y., Ituo M.** (1990)

Prognostic value of s-phase fraction and DNA ploidy studied with in vivo administration of bromodeoxyuridine on human gastric cancers  
Cancer 65, 116-121

**Oiwa H., Maehara Y., Ohno S.** (1995)

Growth pattern and p53 overexpression in patients with early gastric cancer  
Cancer 75, 1454-1459

**Oliveira C., Seruca R., Seixas M., Sobrinho-Simoes M.** (1998)

The clinicopathological features of gastric carcinomas with microsatellite instability may be mediated by mutations of different „target genes“: a study of the TGF beta RII, IGFII R, and bax genes  
Am J Pathol 153, 1211-1219

**Ovaska J.T., Havia T.V., Kujari H.P.** (1986)

Retrospective analysis of gastric stumb carcinoma  
Acta Chir Scand 152, 199-204

**Parenti A.R., Rugge M., Frizzera E.** (1995)

p53 overexpression in a multistep process of esophageal carcinogenesis  
Am J Surg Pathol 19, 1418-1422

**Park K., Kim S.J., Bang Y.P., Park J.G., Kim N.K., Roberts A.B., Sporn M.B.** (1994)

Genetic changes in human gastric cancer cells: correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF-beta  
Proc Natl Acad Sci USA 91, 8772-8776

**Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J.** 1999

Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990  
Int J Cancer 80, 827-841

**Ranzani G.N., Pellegata N.S., Previdere C.** (1990)

Heterogeneous proto-oncogene amplification correlates with tumour progression and presence of metastases in gastric cancer patients  
Cancer Res 50, 7811-7814

**Reis C.A., David L., Correa P., Carneiro F., de-Bolos C., Garcia E., Mandel U., Clausen H., Sobrinho S.M.** (1999)

Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) expression  
Cancer Res 59, 1003-1007

- Rhyu M.G., Park W.S., Jung Y.J., Choi S.W., Meltzer S.J.** (1994)  
Allelic deletions of MCC/APC and p53 are frequent late events in human gastric carcinogenesis  
*Gastroenterology* 106, 1584-1588
- Ricevuto E., Ficorella C., Fusco C., Cannita K., Tessitore A., Toniato E., Gabriele A., Frati L., Marchetti P., Gulino A., Martinotti S.** (1996)  
Molecular diagnosis of p53 mutations in gastric carcinoma by touch preparation  
*Am J Pathol* 48, 405-413
- Romiti A., Moretti A., Vecchione A., Muraro R., Feudi M.L., Rinaldi V., Mancini R., Valli C., Mozzicafreddo A., Frati L., Tomao S.** (1998)  
Analysis of p53 expression in precancerous and malignant gastric mucosa  
*Oncol Rep* 5, 109-113
- Rugge M., Correa P., Dixon M.F., Hattori T., Leandro G., Lewin K., Riddell R.H., Sipponen P., Watanabe H.** (2000)  
Gastric dysplasia: the Padova international classification  
*Am J Surg Pathol* 24, 167-176
- Safatle-Ribeiro A.V., Ribeiro U., Reynolds J.C., Gama-Rodrigues J.J., Iriya K., Kim R., Bakker A., Swalsky P.A., Pinotti H.W., Finkelstein S.D.** (1996)  
Morphologic, histologic and molecular similarities between adenocarcinomas arising in the gastric stump and the intact stomach  
*Cancer* 78, 2288-2299
- Sano T., Tsujino T., Yoshida K., Nakayama H., Haruma K., Ito H., Nakamura Y., Kajiyama G., Tahara E.** (1991)  
Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q and 17p in human gastric carcinomas  
*Cancer Res* 51, 2926-2931
- Sasaki K., Takahashi M., Hashimoto T., Kawachino K.** (1989)  
Flow cytometric DNA measurement of gastric cancers  
*Path Res Pract* 184, 561-566
- Sasano H., Date F., Imatani A., Asaki S., Nagura H.** (1993)  
Double immunostaining for c-erbB-2 and p53 in human stomach cancer cells  
*Hum Pathol* 24, 584-589
- Schlemper R.J., Itabashi M., Kato Y., Lewin K.J., Riddell R.H., Shimoda T., Sipponen P., Stolte M., Watanabe H., Takahashi H., Fujita R.** (1997)  
Differences in diagnostic criteria for gastric carcinoma between Japanese and western pathologists  
*Lancet* 349, 1725-1729

**Schneider B.G., Pulitzer D.R., Brown R.D., Prihoda T.J., Bostwick D.G., Saldivar V., Rodriguez M.H., Gutierrez D.M., O'Connell P.** (1995)  
Allelic imbalance in gastric cancer: an affected site on chromosome arm 3p  
*Genes Chromosomes Cancer* 13, 263-271

**Seruca R., Santos N.R., David L., Constancia M., Barroca H., Carneiro F., Seixas M., Peltomaki P., Lothe R., Sobrinho S.M.** (1995)  
Sporadic gastric carcinomas with microsatellite instability display a particular clinico-pathologic profile  
*Int J Cancer* 64, 32-36

**Shiao Y.H., Rugge M., Correa P., Lehmann H.P., Scheer W.D.** (1994)  
p53 alterations in gastric precancerous lesions  
*Am J Pathol* 144, 511-517

**Stolte M., Sticht T., Eidt S., Ebert D., Finkenzeller G.** (1994)  
Frequency, location, age and sex distribution of various types of gastric polyp  
*Endoscopy* 26, 659-665

**Sugai T., Nakamura S., Uesugi N., Habano W., Yoshida T., Tazawa H., Orii S., Suto T., Itoh C.** (1999)  
Role of DNA aneuploidy, overexpression of p53 gene product, and cellular proliferation in the progression of gastric cancer  
*Cytometry* 38, 111-117

**Suzuki H., Itoh F., Toyota M., Kikuchi T., Kakiuchi H., Hinoda Y., Imai K.** (1999)  
Distinct methylation pattern and microsatellite instability in sporadic gastric cancer  
*Int-J-Cancer* 83, 309-313

**Tahara E., Semba S., Tahara H.** (1996)  
Molecular biological observations in gastric cancer  
*Semin Oncol* 23, 307-315

**Takai K., Watanabe H., Itoi T., Saitoh T.** (1996)  
p53 and Ki-67 immunoreactivity and nuclear morphometry of carcinoma in adenoma and adenoma of the gallbladder  
*Pathol Int* 46, 908-917

**Terres A.M., Pajares J.M., O'Toole D., Ahern S., Kelleher D.** (1998)  
H. pylori infection is associated with downregulation of E-cadherin, a molecule involved in epithelial cell adhesion and proliferation control  
*J Clin Pathol* 51, 410-412

**Toftgaard C.** (1989)  
Gastric cancer after peptic ulcer surgery  
*Ann Surg* 210, 159-164

- Tohodo H., Yokozaki H., Haruma K., Kajiyama G., Tahara E.** (1993)  
p53 gene mutations in gastric adenomas  
Virchows Arch B Cell Pathol 63, 191-195
- Tolbert D.M., Fenoglio-Preiser C., Noffsinger A., DeVoe G.W., McDonald J., Benedetti J., Stemmermann G.N.** (1999)  
The relation of p53 gene mutations to gastric cancer subsite and phenotype  
Cancer Causes Control 10, 227-231
- Tolbert D.M., Noffsinger A.E., Miller M.A., DeVoe G.W., Stemmermann G.N., Macdonald J.S., Fenoglio P.C.** (1999)  
p53 immunoreactivity and single-strand conformational polymorphism analysis often fail to predict p53 mutational status  
Mod Pathol 12, 54-60
- Uchino S., Noguchi M., Hirota T., Itabashi M., Saito T., Kobayashi M., Hirohashi S.** (1992)  
High incidence of nuclear accumulation of p53 protein in gastric cancer  
Jpn J Clin Oncol 22, 225-231
- Uchino S., Tsuda H., Noguchi M., Yokoto J., Terada M., Saito T., Kobayashi M., Sugimura T., Hirohashi S.** (1992)  
Frequent loss of heterozygosity at the DCC locus in gastric cancer  
Cancer Res 52, 3099-3102
- Vindelov L.L., Christensen I.J., Nissen N.I.** (1983)  
A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis  
Cytometry 3, 323-327
- Viste A., Opheim P., Thunold J., Eide G.E., Ejornestad E., Skarstein A., Hartveit F., Eide T.J., Soreide O.** (1986)  
Risk of carcinoma following gastric operation for benign disease  
Lancet 30, 502-505
- Volm M., Hahn E.W., Mattern J., Müller T., Vogt-Moykopf I., Weber E.** (1988)  
Five-year follow-up study of independent clinical and flow cytometric prognostic factors for the survival of patients with non-small cell lung carcinoma  
Cancer Res 48, 2923-2928
- Watanabe H., Jass J.R., Sobin L.H.** (1990)  
WHO: Histological Typing of Oesophageal and Gastric Tumours  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Wells C., Welbourn R.** (1951)  
Post-gastrectomy syndromes, a study in applied physiology  
Brit Med J 1, 546-554

**Wersto R.P., Liblit R.L., Deitsch D., Koss L.G.** (1991)

Variability in DNA measurement in multiple tumors samples of human colonic carcinoma

Cancer 67, 106-115

**Wu M.S., Shun C.T., Wang H.P.** (1997)

Genetic alterations in gastric cancer: Relation to histological subtypes, tumour stage and H. pylori infection

Gastroenterology 112, 1457-1465

**Yamada Y., Yoshida T., Hayashi K.** (1991)

p53 gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases

Cancer Res 51, 5800-5805

**Yokozaki H.** (2000)

Molecular characteristics of eight gastric cancer cell lines established in Japan

Pathol-Int 50, 767-777

**Yustein A.S., Harper J.C., Petroni G.R., Cummings O.W., Moskaluk C.A., Powell S.M.** (1999)

Allelotype of gastric adenocarcinoma

Cancer Res 59. 1437-1441



## Danksagung

An der Verwirklichung dieser Dissertationsarbeit haben eine Vielzahl von Personen innerhalb und außerhalb des Labors bzw. der Klinik Anteil. Ihnen allen bin ich außerordentlich dankbar für ihre Hilfe.

Bei Herrn Professor R. Porschen bedanke ich mich besonders für die Überlassung des Themas und die kontinuierliche Betreuung im Laufe der Erstellung der Arbeit. Herrn Professor M. Gregor gilt mein Dank für die Möglichkeit, in einer Arbeitsgruppe seiner Klinik diese Arbeit verwirklichen zu können.

Frau Monika Straub bin ich dankbar für ihre praktische Anleitung im Labor, insbesondere im Rahmen meiner Einarbeitung.

Herrn Dr. K. Klump danke ich für die zahlreichen Diskussionen, die mir sehr geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt vor allem Herrn Dr. C. Hsieh, der mir durch Diskussionen, inhaltliche Ideen und praktische Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit sehr geholfen hat.

Herrn Dr. K. Holzmann danke ich für die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Frau V. Gaco und Frau M. Weiss-Klemm sind weitere Mitglieder der Arbeitsgruppe, die durch zahlreiche Hilfestellungen zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Besonderen Dank sage ich Herrn Professor Borchard, ohne dessen Beurteilung der histopathologischen Befunde diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.



## Lebenslauf

### Persönliche

#### Angaben

- ◆ geboren am 20. Dezember 1966
- ◆ Geburtsort: Stuttgart
- ◆ Familienstand: verheiratet, 1 Tochter

#### Ausbildung

- 1973 - 1977 Grundschule in Stuttgart
- 1977 - 1984 Realschule in Remseck
- 1984 - 1988 Ausbildung zum Energieanlagenelektroniker
- 1988 - 1990 Technische Oberschule in Stuttgart  
Fachgebundene Hochschulreife
- 1991 – 1993 Krankenpflegehelfer im Katharinenhospital in  
Stuttgart
- 1992 Zeppelinymnasium in Stuttgart  
Allgemeine Hochschulreife
- 1993 – 1999 Studium der Humanmedizin an der Universität  
Tübingen
- 2000 - 2001 Arzt im Praktikum an der Chirurgischen Uni-  
versitätsklinik in Tübingen
- seit 2001 Weiterbildung zum Chirurgen an der Chirurgi-  
schen Universitätsklinik in Tübingen

#### Famulaturen

- 1997 Anästhesiologie an der Universität Tübingen
- 1997 Hämatologie im Bronglais Hospital in  
Aberystwyth/Wales
- 1998 Unfallchirurgie in der Berufsgenossenschaftli-  
chen Unfallklinik Tübingen
- 1998 Praxisfamulatur in der Chirurgischen Polikli-  
nik, Chirurgische Universitätsklinik Tübingen

#### Praktisches Jahr

- Universitätsklinikum Tübingen
- 1. Terial Chirurgie unter Prof. Dr. H.D. Becker
- 2. Terial Anästhesiologie unter Prof. Dr. K. Unertl
- 3. Terial Innere Medizin unter Prof. Dr. M. Gregor
- 16.11.1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung