

Aus dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin,
der Freien Universität Berlin

Medizinische Klinik I. für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
Direktor: Prof. Dr. M. Zeitz

Vergleich der Expression von p53 und MUC2 in muzinösen und
nichtmuzinösen Karzinomen von Mamma, Pankreas, Ovar und Kolon
und
Untersuchung der humoralen Immunantwort auf MUC2 bei Patienten
mit muzinösen Karzinomen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Maren Hofmeier
aus Bremen

Referent: Prof. Dr. C. Hanski

Korreferent: Prof. Dr. W. Zidek

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 7.9.2001

Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Complex
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Bromo-4Chloro-3-Indolylphosphat-Toluidin
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
DMF	Dimethylformamid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
GTPase	Guanosintriphosphatase
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HNPCC-Syndrom	hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
LB	<i>Luria broth base</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
mRNA	<i>messenger-ribonucleic acid</i>
NBT	Nitrobluetetrazolium
N-CAM	Neuronale Zelladhäsionsmoleküle
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline/ tween</i>
PVDF-Folie	<i>polyvinylidene difluoride-Folie</i>
RER	replication errors
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat Gelelektrophorese
TAA	tumorassoziierte Antigene
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TUF	<i>target unmasking fluid</i>
UICC	<i>unio internationalis contra cancrum</i>
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>

Inhaltsverzeichnis

Seite

I.	Einleitung	6
1	Mechanismus der Tumorentstehung	6
1.1	Tumorsuppressorgen p53	7
2	Muzine	9
2.1	MUC2	10
2.1.1	Charakterisierung und Struktur von MUC2	10
2.1.2	MUC2-Expression in Normalgeweben und gutartigen Neubildungen	10
3	Besondere Merkmale muzinöser Karzinome	11
3.1	Genetische Besonderheiten	11
3.2	Phänotypische Besonderheiten	13
4	Immunantwort auf tumorassoziierte Antigene	14
4.1	Zelluläre Immunantwort	15
4.2	Humorale Immunantwort	15
II.	Fragestellung	17
III.	Material und Methoden	18
1	Immunhistochemische Untersuchung	18
1.1	Gewebe für Immunhistochemie	18
1.2	Histologische Typisierung der Gewebe	18
1.3	Tumorstadien und Differenzierung	18
1.4	Immunhistochemische Färbung mit der ABC-Methode	19
1.5	Färbung mit dem anti-MUC2 Antikörper 4F1	19
1.6	Färbung mit dem anti-p53 Antikörper CM1	20
1.7	Auswertung der Immunhistochemie	20
2	Untersuchung von Humanseren	20
2.1	Herstellung von rekombinantem smuc41-Protein	20
2.1.1	Das pQE Protein-Expressionssystem	21
2.1.2	Herstellung einer Expressionskultur von M15(pREP4)pQE30/smuc41	21
2.1.3	Reinigung von smuc41-Protein über Nickelaffinitätssäule	22
2.1.4	Das pET Protein-Expressionssystem (Novagen)	22
2.1.5	Herstellung einer Expressionskultur von BLR(DE3)pLysS pET24a+	23
2.1.6	Reinigung von smuc41-Protein über Immunaффinitätssäule	23
2.1.7	Herstellung von mit Bakterienlysat präadsorbiertem Serum	24
2.2	SDS-PAGE	24
2.3	Western Blot	25
2.3.1	Blotentwicklung mit Alkalischer Phosphatase	25
2.3.2	Blotentwicklung mit Peroxidase/Lumineszenz	26
3	Chemikalien	26

4	Puffer und Lösungen	27
5	Sonstige Materialien	29
6	Geräte	29
IV.	Ergebnisse	30
1	p53-Expression	30
1.1	Kolonkarzinome	30
1.2	Mammakarzinome	32
1.3	Ovarialkarzinome	33
1.4	Pankreaskarzinome	35
2	Expression von MUC2	39
2.1	Kolonkarzinome	39
2.2	Mammakarzinome	41
2.3	Ovarialkarzinome	42
2.4	Pankreaskarzinome	44
3	Korrelation zwischen p53- und MUC2-Expression	48
4	Humorale Immunantwort auf MUC2 in Patienten mit muzinösen Karzinomen	50
4.1	Untersuchung des Serums des Patienten BRM mit smuc41-Protein, erhalten aus dem pQE-Expressionssystem	50
4.2	Untersuchung von Patientenseren mit smuc41-Protein, erhalten aus dem pET-Expressionssystem	53
4.2.1	Reinigung von smuc41 mit dem pET-Expressionssystem	53
4.2.2	Untersuchung der Seren der Patienten KRA, LES, BRU, POT, GEI	54
4.2.3	Untersuchung der Seren der Patienten LES, POT, BRM	55
5	Zusammenfassung	58
V.	Diskussion	59
1	Expression des p53 Proteins	59
2	Expression des MUC2 Proteins	63
3	Korrelation der Expression der Antigene p53 und MUC2	63
4	Einfluss der Muzine auf Tumorenstehung und Prognose	64
5	Untersuchung der humoralen Immunität gegen MUC2	65
VI.	Literaturverzeichnis	67

5 Zusammenfassung

Die Hypothese, dass muzinöse und nichtmuzinöse Karzinome organübergreifend zwei Gruppen mit unterschiedlichen genetischen Läsionen bilden, wurde an zwei Merkmalen überprüft: an der Expression des Tumorsuppressorproteins p53 und des Muzins MUC2 an je 20 Tumoren des jeweiligen Typs in Kolon, Mamma, Ovar und Pankreas.

Die muzinösen Karzinome von Mamma, Ovar und Kolon wiesen eine detektierbare p53-Expression mit einer Häufigkeit von 39-64% auf, gegenüber der Häufigkeit von 57-72% in nichtmuzinösen Karzinomen der jeweiligen Organe (Seite 38). Damit besteht ein Trend zur selteneren p53-Expression in muzinösen Karzinomen von Brust, Ovar und Kolon. Dieser Unterschied ist jedoch nur zwischen den muzinösen und nichtmuzinösen Kolonkarzinomen statistisch signifikant.

Die MUC2-Expression von muzinösen und nichtmuzinösen Karzinomen von Mamma, Ovar, Pankreas und Kolon ergab in allen untersuchten muzinösen Karzinomen eine statistisch signifikant geringere Häufigkeit der MUC2-Expression nichtmuzinösen Karzinomen (Seite 48).

In den Karzinomen von Mamma, Ovar und Pankreas handelt es sich bei der MUC2-Expression um eine *de novo*-Expression, da die Normalgewebe dieser Organe kein MUC2 exprimieren. D.h. die MUC2-Expression ist in diesen Organen mit der malignen Transformation assoziiert. 52% der als nichtmuzinös definierten Pankreas- und 9% der nichtmuzinösen Ovarkarzinome exprimieren MUC2.

Dies zeigt, dass die aufgrund der Morphologie als muzinös klassifizierten Tumore von Pankreas, Ovar und Kolon auch auf der molekularen Ebene Gemeinsamkeiten haben, die sie von den nichtmuzinösen Tumoren unterscheiden, ohne jedoch zwei diskrete Gruppen zu bilden. Lediglich die muzinösen Mammakarzinome unterscheiden sich in 100% der Fälle von den nichtmuzinösen durch *de novo* MUC2-Expression.

Eine inverse Korrelation zwischen der p53- und MUC2-Expression als Hinweis auf eine mögliche Interaktion zwischen p53 und MUC2 konnte ausgeschlossen werden.

Zum Nachweis einer humoralen Immunantwort auf das überexprimierte MUC2 wurden Seren von 18 Patienten mit muzinösen Karzinomen auf Reaktivität mit einem Peptid aus dem MUC2-Kernprotein untersucht. Keines der untersuchten Tumorseren reagierte spezifisch mit dem MUC2-Peptid.

Danksagung

Für die unermüdliche Geduld und engagierte Betreuung dieser Arbeit gilt Prof. Dr. C. Hanski mein größter Dank, insbesondere für die Anleitung in kritischem, alles hinterfragendem, wissenschaftlichen Denken.

Ohne die tatkräftige Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft der anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe, Christian Böhm, Ulrike Dethlefs, Marie-Luise Hanski, Enno Klussman, Dieter Ogorek, Eva Riede und George Trendelenburg wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. An alle ein riesengroßes Dankeschön!

Sehr dankbar bin ich auch meinem jetzigen Chef Prof. Dr. W. Thimme für die entscheidenden Motivationsschübe in der Endphase der Arbeit und Murat Ünalán für die geduldige Durchsicht des Manuskripts, moralische Unterstützung und *first aid* bei Problemen mit der elektronischen Text- und Datenverarbeitung... .

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Maren Hofmeier
 Wohnort: Tegelerstr. 6
 13353 Berlin
 Tel.: 4660 5220
 Geburtstag: 13.09.1968
 Geburtsort: Bremen

Schulbildung

8/1974-2/1977 Grundschule Bremen
 3/1977-2/1983 Grundschule und Gymnasium Zürich/Schweiz
 3/1983-5/1988 Gymnasium Bremen
 5/1988 Abitur

Berufsausbildung

8/1988-3/1990 Studium der Geschichtswissenschaften und Slavistik FU Berlin
 4/1990-3/1992 Vorklinisches Studium Humanmedizin FU Berlin
 9.4.1992 Ärztliche Vorprüfung
 8/1992-3/1993 Studien-Auslandsaufenthalt Moskau/Rußland
 26.8.1993 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 11.7.1996 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 2/1997-5/1997 I. Trimester Praktisches Jahr
 Abt. Gynäkologie, ev. Waldkrankenhaus Spandau/Berlin
 6/1997-9/1997 II. Trimester Praktisches Jahr
 I. Innere Abteilung, Humboldt-Krankenhaus/Berlin
 10/1997-2/1998 III. Trimester Praktisches Jahr
 Allgemein- und gefäßchirurg. Abteilung Krankenhaus Moabit
 18.6. 1998 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, HU Berlin
 7/1998-12/1999 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum I. Innere Abt. Khs.
 Reinickendorf
 seit 21.2.2000 Tätigkeit als Assistenzärztin Khs. Reinickendorf

Famulaturen:

8/1992 Gynäkolog. Abteilung des 72. städt. Krankenhauses Moskau
 10/1992-12/1992 Chirurg. Abteilung des 1. städt. Krankenhauses Moskau
 3/1993-4/1993 Inst. f. Pathologie St. Joseph Krankenhaus Berlin
 9/1993 Kinderarztpraxis Dr. A. Bau Hamburg
 3/1994 II. Innere Abtl. Krankenhaus Moabit/Berlin (Hämatol./Onkologie)
 8/1994 I. Innere Abtl. Krankenhaus Moabit/Berlin (Kardiologie)
 10/1994 Chirurg. Abteilung DHZB

Hiermit erkläre ich, dass von mir noch kein Promotionsversuch an einer anderen Hochschule unternommen wurde.

Berlin, 10.1.2001.