

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie,
Charité Universitätsmedizin Berlin,
Campus Buch,
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Mutationsanalysen von K-ras und p53 bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Lisa Holper
aus München

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P. T. Daniel
2. Prof. Dr. R. Greil
3. Priv.-Doz. Dr. med. C. Belka

Datum der Promotion: 10.02.2006

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
2. Einleitung	9
2. 1. Das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus	10
2. 1. 1. Modelle zur Tumorgenese ösophagealer Plattenepithelkarzinome	10
2. 1. 2. Ursachen und Risikofaktoren	13
2. 1. 3. Inzidenz	16
2. 1. 4. Mortalitätsraten	16
2. 1. 5. Symptomatik und klinisches Bild.....	17
2. 1. 6. Diagnostische und prognostische Ansätze	18
2. 1. 7. Therapeutische Ansätze	22
2. 2. Molekularbiologische Grundlagen	26
2. 2. 1. Apoptose und Nekrose	26
2. 2. 2. Apoptosesignalwege.....	28
2. 2. 3. Das Onkogen K-ras	29
2. 2. 4. Zellzyklus und Tumorsuppressorgen p53	30
2. 3. Genetische Veränderungen in Tumoren.....	32
2. 3. 1. Allgemeine Kategorien genetischer Veränderungen in Tumoren.....	32
2. 3. 2. Genetische Veränderungen von K-ras.....	33
2. 3. 3. Genetische Veränderungen des p53 Genes	34
2. 3. 4. Genetische Veränderungen in Ösophaguskarzinomen.....	36
3. Patienten, Material und Methoden	37
3. 1. Patienten-Kollektiv der Plattenepithelkarzinome des Ösophagus	37
3. 2. Allgemeine Darstellung der, zur Mutationsanalyse verwendeten Methoden	39
3. 2. 1. Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction (PCR))	40
3. 2. 2. Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP) - Methode.....	42
3. 2. 3. Immunhistochemische Methode	43
3. 2. 4. Interpretation der Immunhistochemie.....	45
3.3. Spezielle Darstellung der Methoden-Protokolle.....	47
3.3.1. Deparaffinierung der Tumorproben.....	47
3.3.2. DNA-Extraktion der Patienten-Proben und Zelllinien.....	47
3.3.3. Protokoll des Hybridisierungs-Assays für K-ras	47

3.3.4. PCR–Protokoll für das p53 Gen.....	49
3.3.5. Agarosegel-Nachweis	50
3.3.6. Protokoll der SSCP-Methode für p53.....	50
3.3.7. Protokoll der Immunhistochemie von p53.....	51
3.3.8. Geräte, Zubehör und Reagentien	52
4. Ergebnisse der Analyse des Patienten-Kollektivs mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.....	54
4. 1. Patientenkollektiv und Follow-up	54
4. 2. Mutationsanalyse von K-ras	56
4. 3. Mutationsanalyse von p53.....	56
4. 4. Immunhistochemische Analyse von p53 Protein	57
4. 5. Statistische Analyse von K-ras und p53	58
4. 5. 1. Box Plot Analysen und Mann-Whitney U-Test	59
4. 5. 2. Kaplan-Meier Überlebensanalyse	64
4. 5. 3. Uni- und multivariate Analyse	68
5. Diskussion.....	70
5. 1. K-ras Mutation	70
5. 2. p53 Mutation.....	70
5. 3. p53 Expression.....	72
5. 4. Diagnostische und prognostische Bedeutung von p53.....	74
5. 5. Therapeutische Bedeutung	76
5. 6. Fazit.....	80
6. Danksagung.....	81
7. Literaturverzeichnis.....	82

1. Zusammenfassung

Apoptose, der programmierte Zelltod, und die beteiligten Apoptosegene, sowie deren Aktivierung und Hemmung spielen eine Rolle in der malignen Transformation von Tumoren. Die Fragestellung der vorliegenden retrospektiven Arbeit war die Analyse von Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 und des Onkogens K-ras sowie die Suche nach prognostisch relevanten Faktoren, mit dem Ziel individueller therapeutischer Strategien, u.a. zur Überwindung der Therapieresistenz.

Für die Analyse von p53 und K-ras wurden Tumorproben von 68 Patienten mit primärem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mittels SSCP-PCR auf p53 Mutationen untersucht. Mittels Immunhistochemie wurde die Expression des p53-Protein und mittels PCR und Oligonukleotid-Hybridisierungstest wurden K-ras Mutationen nachgewiesen.

Bei der retrospektiven Analyse von 68 Ösophaguskarzinomen wurden sieben Mutationen in den Exons 5-8 des p53 Gens identifiziert (Exon 5, n = 3 (4.41%), Exon 7, n = 3 (4.41%), Exon 8, n = 1 (1.48%)). Immunhistochemisch wurde in 37 Tumoren (54,4%) hohe Expressionen von p53 mit zytosolischem und nukleärem Färbemuster gefunden. Bei der Mutationsanalyse von K-ras wurden in drei Tumoren Mutationen im Kodon 12 nachgewiesen. Die Korrelation dieser molekularen Befunde mit klinisch-pathologischen Parametern zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Gesamtüberlebenszeit und dem Lymphknotenstatus, der UICC-Klassifikation sowie der AJCC-Klassifikation. Es wurden hingegen keine signifikanten Assoziationen zwischen p53 Mutationen, der p53 Protein Expression und K-ras Mutationen gefunden. Überexpression bzw. Mutation von p53 und K-ras zeigen keinen signifikanten Zusammenhang und sind somit unabhängige Ereignisse.

In der Analyse der Plattenepithelkarzinome des Ösophagus wurden in 10,3% der Tumoren p53 Mutationen gefunden. Die theoretische Annahme, p53 Proteinakkumulation resultiere aufgrund von p53 Genmutationen, konnte nicht bestätigt werden. Analog zu anderen Studien, zeigte sich hier eine niedrige Frequenz von K-ras Mutationen in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus.

2. Einleitung

Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein Prozess der unter Betätigung einer Vielzahl biologischer Systeme und Signalwege reguliert wird. Die beteiligten Apoptosegene, sowie deren Aktivierung bzw. Hemmung spielen eine wesentliche Rolle in der malignen Transformation von Tumoren.

Die Fragestellung der vorliegenden retrospektiven Arbeit war die Analyse von molekularen Veränderungen von p53 und K-ras und die Suche nach prognostisch relevanten Faktoren als Basis für die zukünftige Entwicklung individueller therapeutischer Strategien in Bezug auf diese beiden Proteine. Schwerpunkt dieser Arbeit war die Fortsetzung einer vorausgegangenen retrospektiven Studie zu den Apoptosegenen p53, Bax, und p16^{ink4a/CDKN2} bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (1).

Resistenz gegenüber Zytostatika und Bestrahlung ist der wesentliche Grund für das Versagen von Tumortherapien in der Onkologie. Studien zur Pathogenese der Therapieresistenz ergaben Hinweise auf eine Regulation der zellulären Antwort auf Zytostatika und Bestrahlung über das Tumorsuppressorgen p53. Untersuchungen zum Tumorsuppressorgen p53 in der ösophagealen Tumorgenese zeigten zudem molekulargenetische Veränderungen in späten Stadien der Tumorentwicklung und ergaben somit einen Hinweis, dass p53 Mutationen an der Tumorprogression beteiligt sein könnten.

Studien zur Ras-Onkogen-Familie zeigten dagegen das Auftreten aktivierender Mutationen in frühen Stadien in Tumoren des gastrointestinalen und respiratorischen Traktes (2). Prognostische und therapeutische Bedeutung kann K-ras u.a. erlangen infolge der Aktivierung anti-apoptotischer Signalkaskaden, z.B. über PI3- und Akt-Kinase, sowie durch den klinischen Einsatz von Inhibitoren der Farnesyl-Protein-Transferase (FTPase), eines für die Signaltransduktion und Aktivität von K-ras wichtigen Enzyms. Daten ösophagealer Tumore im Rattenmodell zeigten Aktivierung von K-ras und Genamplifikation des K-ras Onkogens sowie eine Überexpression von H-ras RNA und in niedriger Frequenz auch K-ras Mutation.

Aufgrund dieser Befunde und Vorarbeiten zum p53 Signalweg wurden Mutations- und Protein-Expressions-Analysen des Tumorsuppressorgens p53 und des zellulären

Onkogens K-ras in einem Kollektiv von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus durchgeführt und deren Zusammenhang untersucht.

Für die Analyse von p53 und K-ras wurden Tumorproben von 68 Patienten mit primären Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus mittels der Polymerase-Chain-Reaction – Single-Strand-Conformational-Polymorphism – Methode (PCR-SSCP) auf p53 Mutationen untersucht. Mittels immunhistochemischer Methoden (IHC) wurde das Expressionsniveau des p53-Protein bestimmt und mittels genomischer PCR gefolgt von einem Oligonukleotid basierten Hybridisierungstest wurden aktivierende Punktmutationen von K-ras im Codon 12 nachgewiesen.

2.1 Das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

2.1.1 Modelle zur Tumorgenese ösophagealer Plattenepithelkarzinome

Folgende Mechanismen können bei der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen von Bedeutung sein.

Genetische Instabilität spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und auch bei der Progression maligner Tumoren. Mutationen in Kontrollgenen verleihen dabei tumorösen Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil, mit dem Resultat eines klonalen Wachstums. Eine Form der Instabilität kann durch Inaktivierung sogenannter DNA mismatch repair (MMR) Gene entstehen. Wichtige MMR Gene sind z.B. MSH2 oder MLH1. Ihre Inaktivierung ist an über das Genom verstreuten, kleinen DNA Repeats erkennbar, die bei MMR-Instabilität charakteristisch verlängert oder verkürzt sind. Man spricht dann von Mikrosatelliten Instabilität (MIN).

Eine weitere Form der Instabilität basiert in den Chromosomen in Sinne von Aneuploidie, welche durch genetische Veränderung in mitotischen Genen entstehen kann, die in Ungleichverteilungen von Chromosomen nach mitotischer Zellteilung resultiert. Bei diesen chromosomalen Instabilitäts (CIN)-Veränderungen könnte es sich um Nebeneffekte maligner Transformation handeln, wie sie durch Veränderungen von ras, myc oder p53 ausgelöst werden. Für die Initiierung des CIN-Typs scheinen die genannten Gene jedoch nicht verantwortlich, da MIN Tumore, obgleich sie nicht aneuploid sind, gleiche Mutationen, z.B. in p53 oder ras, wie CIN Tumore, sowie gleiche Charakteristika der Stadien und Progression aufweisen. Es kommt infolge CIN oder MIN zu klonalem Wachstum, durch Aktivierung von Onkogenen, Inaktivierung von

Tumorsuppressorgene oder durch Veränderung von Reparaturgenen, wie der BLM-Helikase oder der MMR Gene, MLH1 und MSH2, welche physiologischerweise die genetische Stabilität sichern. Eine zu hohe Anzahl an Mutationen führt jedoch zum Zelltod. Das Wachstum der Zellpopulation ist demnach gekennzeichnet durch die Balance zwischen Mutations-Effekten, welche Selektion bzw. Wachstumsvorteile fördern, und solchen, welche zum Zusammenbruch der Zellpopulation führen. Selektionsbarrieren sind u.a. abnorme Bedingungen im zellulären Milieu, Perioden von Hypoxie, Malnutrition, hormonelle Einflüsse und potentielle Angriffe des Immunsystems (4).

Hypothesen zur genetischen Instabilität der kolorektalen Tumorentstehung, welche auch im Rahmen der ösophagealen Karzinogenese diskutiert werden, besagen, dass multiple genetische Veränderungen bzw. Mutationen zur Entwicklung maligner Tumore notwendig sind. Nach Darstellungen kolorektaler Tumormodelle sind mindestens sieben voneinander unabhängige Ereignisse für eine genetische Instabilisierung von Allelen der Tumorsuppressorgene verantwortlich (5). Dabei gibt es bevorzugte Sequenzen für Mutations-Ereignisse, deren Akkumulation bestimmender für den biologischen Phänotyp ist, als deren Reihenfolge.

Das Model der monoklonalen Theorie besagt, dass der Grund für die Entstehung multipler Foci in der Streuung von Zellen liegt, die einer einzigen neoplastischen Zelle entstammen. Die Theorie der „field cancerization“ hingegen diskutiert, dass Karzinogene ihre Wirkung kontinuierlich auf ein Organ oder einen Gewebebereich ausüben, welcher genetisch instabil wird und in Folge für die Tumorentwicklung prädisponiert ist. Dies führt zu multiplen, unabhängig von einander auftretenden Foci von Läsionen (6).

Studien zur Morphologie von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und systematische Charakterisierungen des kanzerösen Feldes zeigen, basierend auf der Akkumulation von p53, dass diese wahrscheinlich in frühen Stadien an multifokalen Regionen des Gewebes entstehen, die zu Gruppen transformierter Zellen fusionieren können und nicht durch Streuung ausgelöst sind (7). Die hohe Frequenz p53-positiver, dem Tumor benachbarten Epithelien bei p53-negativen Karzinomen, sowie das Vorkommen unterschiedlicher p53 Mutationen unterstützen diese Theorie der „field-

cancerization“ der Kanzerogenese. Dieses Phänomen könnte ein Grund für das Entstehen von Rezidivien nach Entfernung des Primärtumors sein (6).

Das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz besagt, dass sich Tumore des Gastrointestinaltraktes wie die Ösophaguskarzinome in Stadien histopathologischer Veränderungen innerhalb des Epithels entwickeln. Diese Stadien gehen von normalem Epithel über zu Atrophie mit verlängerten Papillen und zu Hyperplasie des Epithels mit über 15% an proliferierenden, basalen Zellen (basal cell hyperplasia (BCH)). In höheren Stadien kommt es zu leichter bzw. schwerer Dysplasie (DYS) mit veränderten Krypten, Kernatypien, Verlust der normalen Zellpolarität und dem Auftreten abnormer Gewebeausreifung. Schreitet die Entwicklung zu sogenannten Früh-Adenomen fort, gelten u.a. K-ras Mutationen als Progressionsfaktor für Spät-Adenome. Die Aktivierung des Onkogens K-ras erfordert nur ein genetisches Ereignis, im Gegensatz zu Tumorsuppressorgenen, welche zu ihrer Inaktivierung zwei, in jedem Allel eines, benötigen (5).

Das nächste Stadium, u.a. gefördert durch das Tumorsuppressorgen p53 ist das Carcinoma in situ (CIS), mit vollständiger Durchsetzung des Epithels mit dysplastischen Zellen, jedoch noch intakter Basalmembran. Das CIS kann über Jahre asymptomatisch bleiben, bevor es zur Invasion und Überschreitung der Basalmembran und somit zum manifesten ösophagealen Plattenepithelkarzinom fortschreitet (6). Morphologische Veränderungen im Bereich von Plattenepithelkarzinomen sind abgeplattete, erodierte Mukosaanteile als Zeichen von DYS und CIS, sowie eine Verdickung der longitudinalen und transversalen Mukosafalten (7). Zur Klassifizierung gut- bzw. schlecht-differenzierter Karzinome können keratinisierte Zellen genutzt werden (8).

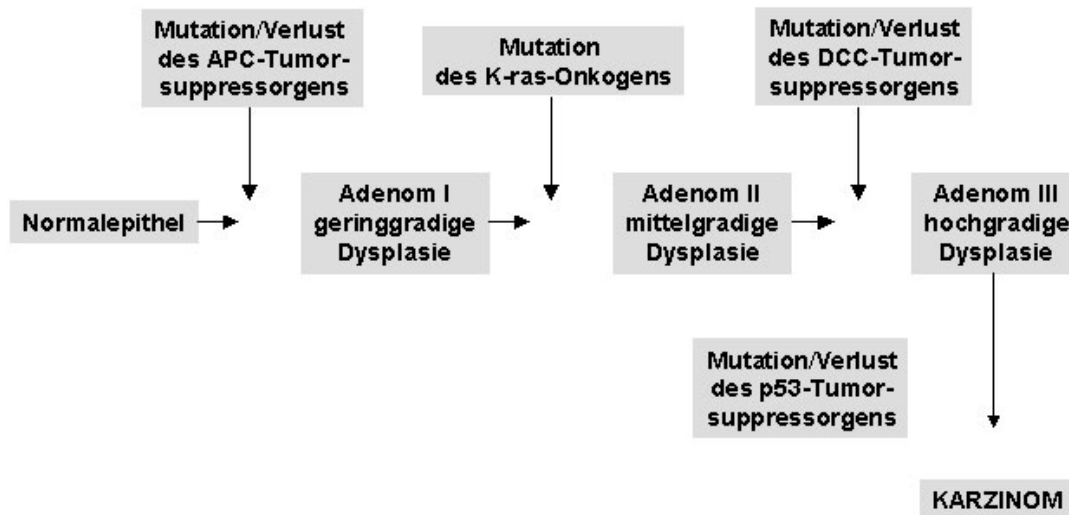


Abb. 1: Adenom-Karzinom-Sequenz

2.1.2 Ursachen und Risikofaktoren

Die Auslösung von Karzinomen im menschlichen Organismus ist in der Regel nicht auf eine einzige Ursache zurückzuführen. Dies schließt konsequenterweise die Schwierigkeiten mit ein, die sich bei der Bewertung von chemischen Stoffen, Umweltfaktoren und anderen Risikoparametern ergeben.

Kanzerogene bzw. Mutagene können mit der DNA reagieren und deren Struktur verändern. Voraussetzung ist u.a. die Umwandlung inaktiver Vorstufen in aktive Formen. Innerhalb des Lebermetabolismus findet z.B. eine direkte Aktivierung karzinogener Vorläufer als Substrate des Cytochrom p450-Systems statt. Genetische Varianten solcher metabolischer Enzyme, wie z.B. die Glutathion-S-Transferase-M1 (GSTM1), mit geringerer Kapazität, Karzinogene, zu entgiften, stellen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko dar (9, 10).

Alkohol- und Tabak-Konsum gelten als die Hauptrisikofaktoren für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus in Nordamerika und Europa. Epidemiologische Daten zeigen eine signifikante Beziehung zwischen chronischem Alkohol-Konsum und erhöhtem Tumorrisiko im oberen Atem- und Verdauungstrakt (Kopf-Hals-Tumore). Die biologischen Wirkungsmechanismen des Ethanols, bzw. seines Metaboliten, Acetaldehyd, sind bislang ungeklärt, wobei unter anderem Proliferationshemmung, Apoptose, Induktion einer verzögerten G1-Phase, Aktivierung der Proteinkinasen und

Protoonkogenen, Inhibition der DNA Reparatur und Erzeugung freier Radikale diskutiert werden (11). Ein weit größerer Teil an Tumoren des oberen Atem- und Verdauungstraktes ist positiv korreliert mit dem Tabak-Konsum. Teerprodukte enthalten u.a. die für eine karzinogene Wirkung verantwortlichen polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK). PAK entstehen beim Erhitzen von organischem Material unter Sauerstoffmangel (u.a. in Luftverunreinigungen, Zigarettenrauch). Aktive Verbindungen, wie Benzo(a)anthracen oder Benz(a)pyren, mit selbst schwacher karzinogener Aktivität, können über Substitutionen von Methylgruppen potente Karzinogene produzieren, wie z.B. 7,12-Dimethyl- und 7,8,12-Trimethylbez(a)anthracene. Die Aktivierung der chemisch reaktionsträgen polyzyklischen Aromaten wird durch Monooxygenase (MO) und Epoxidhydrolase (EH) katalysiert (10). Die so entstandenen Epoxide, als enzymatische Endprodukte von PAK, stellen mutagene Verbindungen dar, die irreversibel an DNA sowie RNA binden und damit wohl die Tumorentstehung induzieren (12). Im Vergleich der Erkrankungsrisiken bei gleichzeitigem Alkohol- und Tabak-Konsum zeigt sich, dass das Risiko an einem Ösophaguskarzinom zu erkranken, z.B. bei 0-9 g Tabak und 0-40 g Alkohol pro Tag gleich 1.0 ist, während es bei ≥ 30 g Tabak und ≥ 121 g Alkohol pro Tag auf 149,3 ansteigt. Wenn eines zum anderen kommt, erhöht sich das Risiko eines Rauchers, einem Ösophaguskarzinom zu erkranken beträchtlich, je mehr Alkohol er trinkt. Dies ist ein Hinweis auf die synergistische Wirkung, die begünstigende Faktoren – auch wenn sie alleine keinen Tumor auslösen können – für die Tumorgenese haben können (12). Infektionen mit DNA-Viren der Humanen Papillomavirus-Gruppe (HPV), Typ 16 und 18, sind assoziiert mit anogenitalen Tumoren und Plattenepithelkarzinomen. Sie vermehren sich bevorzugt in Plattenepithelien und induzieren warzenartige Veränderungen und chronische Entzündungsreaktionen, die Basis tumoröser Entwicklungen sein können. HPV-DNA Nachweise in Plattenepithelkarzinomen von 0-72% variieren in verschiedenen geographischen Regionen (13). Wesentlich hierfür sind die HPV Proteine E6 und E7, die das Rb bzw. das p53 Protein inaktivieren und hierdurch Proliferations- und Apoptosekontrollmechanismen aufheben. Prädisponierende Grunderkrankungen für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus sind u.a. chronische Ösophagitiden, die in Hoch-Risiko Gebieten schon bei jungen Menschen beobachtet werden (14), die Tylosis, eine autosomal vererbte Erkrankung,

welche durch Hyperkeratose der Handflächen, Fußsohlen und der Papillen des Ösophagus charakterisiert ist, sowie die Achalasie, bei der das Gewebe in häufigen Kontakt mit Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen von zurückgehaltenen Speisen oder Getränken kommt. Ferner können Verletzungen, Verätzungen, ösophageale Divertikel oder das Plummer-Vinson Syndrom, eine aus einer Eisenmangelanämie entstehende Schleimhautatrophie in Mund, Rachen und Ösophagus, zu Plattenepithelkarzinomen führen.

Ursächlich für die unten dargestellten Unterschiede in der geographischen Verteilung ösophagealer Plattenepithelkarzinome sind möglicherweise auch Einflüsse spezifischer Umweltfaktoren und Ernährungsgewohnheiten. In Süd-Afrika, im Iran und in China findet man z.B. Assoziationen zu auf Mais oder Mehl basierten Speisen, bestimmten eingelegten Gemüsen und dem Konsum kochend heißer Speisen (15). Ferner werden Kontamination von Speisen mit Pilzen, wie z.B. *Fusarium moniliforme*, oder Mykotoxinen, sowie Defizite an Vitaminen, wie z.B. Vit A, C, E, Niacin, Riboflavin, Zink - oder Spurenelementdefizite, Mangel an Anti-Oxidantien oder die Bildung von Stickstoffmonoxid diskutiert (16).

Antioxidantien, wie Vitamin C, Betakarotine oder alpha-Tocopherol, können DNA-schädigende freie Radikale, wie sie z.B. bei Tabak-Konsum oder Reflux entstehen, neutralisieren (18).

Stickstoffmonoxid (NO), welches endogene N-Nitrosamine bzw. N-Nitroso-Verbindungen bildet, wird durch Überexpression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (nitric oxid synthase (NOS)) in mehreren Zelltypen, wie z.B. Makrophagen, Endothelzellen und einigen Karzinomzellen in großen Mengen produziert. NO ist ein wichtiger second messenger und wird generell in allen Zellen gebildet. Die Beteiligung von NO in der menschlichen Karzinogenese ist jedoch noch unklar. Studien zeigten, dass NO den Übergang von Kolonadenomen zum Carcinoma in situ fördert, DNA-Schäden und Angiogenese induzieren kann, jedoch auch das Wachstum epithelialer Tumorzellen inhibiert. NO induziert u.a. eine Akkumulation von p53 (19). Das Reaktionsprodukt von NO und Superoxid (O₂⁻), Peroxynitrit (ONOO⁻), ist ein potentes nitrierendes und oxidierendes Agens, das mit Tyrosin reagiert, um Nitrotyrosin zu bilden. Das endogene Nitrotyrosin ist damit ein Marker für die Bildung von Peroxynitrit, welches in gesundem Gewebe nicht nachweisbar ist.

Kanzerogenität von N-Nitrosomethylbenzylamine (NMBA), die in Zink-defizienten Ratten beobachtet wird, wirkt möglicherweise durch erhöhten ösophagealen mikrosomalen Matabolismus von NMBA, Bildung von O6-Methylguanin, Hemmung ösophagealer Reparaturenzyme, sowie eine erhöhte ösophageale Zellproliferation. Das Rattenmodell zeigt, dass ein Zink-Defizit die Inzidenz ösophagealer Karzinome steigert, wodurch im allgemeinen nicht-tumorinduzierende Dosen von NMBA zu hoch tumor-induzierenden werden können (20).

2.1.3 Inzidenz

Ösophaguskarzinome gehören weltweit zu den häufigen malignen Tumoren mit hoher Mortalität. Die geographische Verteilung ösophagealer Plattenepithelkarzinome weist zeitliche und örtliche Unterscheide mit bis zu 17-fachen Differenzen der Inzidenz- und Mortalitätsraten auf. Studien und Daten zu Mortalitätsraten der WHO beschreiben u.a. Hoch-Risiko Gebiete in Nord-China (Provinzen Linxian, Henan Provinz, Shanxi, Sichuan (6)), Puerto Rico, Singapur, Iran, Frankreich, Schweiz, Norditalien und in Süd-Thailand.

In der dunkelhäutigen und asiatischen Bevölkerung dominieren Plattenepithelkarzinome, während in der weißen Bevölkerung in Nord-Amerika und Europa Adenokarzinome überwiegen (21).

Während in den USA unter männlichen Weißen in den Jahren 1974 – 1994 die jährliche Inzidenzrate der Plattenepithelkarzinome von 3.4 auf 2.2 pro 100 000/Einwohner sank, stieg sie für Adenokarzinome von 0.7 auf 3.2. Unter männlichen Schwarzen ließ sich in der gleichen Zeit ebenfalls ein Anstieg der Adenokarzinome von 0.4 auf 0.6 beobachten, während die Inzidenz von Plattenepithelkarzinomen konstant bei 13.2 lag. Innerhalb der weiblichen Bevölkerung sind die Inzidenzraten beider Typen proportional niedriger (9).

2.1.4 Mortalitätsraten

Trotz Verbesserungen in der Behandlung bleibt die Prognose ösophagealer Tumore schlecht. Die durchschnittliche Überlebenszeit ösophagealer Karzinome liegt bei 11 Monaten nach Diagnosestellung, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 5-44 % in unterschiedlichen geographischen Regionen (21, 22, 23, 24).

Die UICC (Union Internationale Contre le Cancer) erstellt Datenbanken der WHO mit Statistiken zu altersangepasste Mortalitätsraten maligner Tumore von aus weltweit 33 Ländern. Die aus Standard-Populationen ermittelten Raten pro 100 000/Einwohner der Jahre 1988-1992 zeigen hohe Werte von 11 in Frankreich, 7.8 in England und 7.7 in Chile, für Männer, bzw. 3.7 in Irland, 3.4 in Chile und 3.2 in England, für Frauen. Für Deutschland liegen die Werte innerhalb dieses Zeitintervalls, getrennt nach Geschlechtern, bei 5.2 bzw. 0.9. Die niedrigsten Werte sind 2.0 in Mexiko, 1.7 in Israel und 1.5 in Griechenland, für Männer, bzw. 0.5 in der ehemalige Tschechoslowakei, 0.5 in Griechenland und 0.5 in Österreich, für Frauen.

1999 publizierte Mortalitätsraten zeigen einen Anstieg und eine geographische Umverteilung, mit Höchstwerten für Männer bzw. Frauen, von 19.2 bzw. 7.1 in Süd-Afrika und 15.8 bzw. 7.9 in China (je pro 100 000/Einwohner) und niedrige Werte von 1.0 bzw. 0.1 in Mittel-Afrika und 0.9 bzw. 0.5 in West-Afrika (25).

2.1.5 Symptomatik und klinisches Bild

Trotz Fortschritten in der diagnostischen Technik werden Ösophaguskarzinome wie auch andere Tumore des gastrointestinalen Traktes selten in frühen Stadien diagnostiziert. Das Alter der Patienten liegt bei Erstdiagnose in der Regel zwischen 55–65 Jahre. Initiale Symptome sind Dysphagie (80-96%), ab einem Durchmesser von mehr als 13mm, Gewichtsverlust (42-46%), retrosternale oder epigastrische Schmerzen (6-20%), Kachexie (6%), Husten (3-4%) sowie Aspirationspneumonien; in fortgeschrittenen Stadien kann es zu Hämatesis, Hämoptysis, Melaena, Nervenläsionen, wie z.B. Horner-Syndrom, zu Vena subclavia Syndromen, zur Erosion der Aorta, zu Pleuraergüssen, Ascites, paraneoplastischen Syndromen, wie z.B. eine Hyperkalziämie kommen (14).

Lokalisiert sind ca. 15% der Tumore im oberen Drittel, 50% im mittleren und 35% im unteren Drittel des Ösophagus. Je größer die Ausdehnung des Tumors in einem bzw. mehreren Dritteln, desto höher ist der Anteil betroffener anliegender Strukturen.

In 65% haben Karzinome einen Durchmesser von ≤ 5 cm mit einer Metastasierungswahrscheinlichkeit von 35%, in 25% sind die Karzinome > 5 cm mit einer Metastasierungswahrscheinlichkeit von 75%. Das dichte Lymphgefäßsystem in der ösophagealen Mucosa und Submucosa kommuniziert mit extraösophagealen

Lymphgefäßen, was die Streuung von Metastasen innerhalb des Ösophagus, als auch in thorakale, suprazervikale und zervikale Lymphknoten-Regionen erleichtert.

2.1.6 Diagnostische und prognostische Ansätze

Auf internationaler Ebene bestehen z.T. Unterschiede in der pathologischen Diagnostik von Dysplasien versus Karzinomen. Diagnostische Kriterien sind einerseits die Invasion des Tumors in die Lamina propria der Mucosa, andererseits nukleäre und strukturelle Merkmale, wie Hyperchromasie, Variabilität und Vergrößerung der Nukleoli. Kriterien, welche auf geringsten Veränderungen basieren, können zu unangemessenen Diagnosen und Behandlungen mit unnötig hohen Komplikationsraten führen. Andererseits können zu hoch angesetzte Schwellenkriterien in einer verspäteten Behandlung resultieren. Es sollte daher eine eindeutige Nomenklatur der Stadien bzw. der histologischen Kriterien angestrebt werden (21).

Das klinische Staging und Grading von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus nach dem TNM-System ist international etabliert und beinhaltet die folgenden Kriterien. Die sieben T-Kriterien für primäre Tumore, umfassen T0, kein Primär-Tumornachweis, Tis, präinvasives Carcinoma in situ (CIS), T1, Invasion bis an die Grenze der Submucosa, T2, an die Grenze der Muscularis propria, T3, Invasion der Adventitia sowie T4, Invasion angrenzender Strukturen. TX bedeutet fehlende bzw. mangelhafte Bewertbarkeit des Tumors. Eine Invasion der Lymphgefäße kann auftreten, wenn der Tumor die Muscularis mucosae überschreitet. Der Status der regionalen Lymphknoten wird mit den drei N-Kriterien, N0, kein Nachweis bzw. N1, Nachweis einer Metastasierung in regionale Lymphknoten, beschrieben. NX bedeutet fehlende oder mangelhafte Einschätzbarkeit des Lymphgewebes. Die M-Kriterien für Fernmetastasen sind M0, kein Nachweis bzw. M1, Nachweis von Fernmetastasen. MX bedeutet fehlende oder mangelhafte Einschätzbarkeit von Fernmetastasen.

Aus dieser TNM Klassifikation leiten sich klinisch strukturierte Klassifikationssysteme für die Gruppierung der Stadien ösophagealer Karzinome. Nach der AJCC (American Joint Committee on Cancer) Klassifikation liegt das Stadium 0 bei den Kriterien Tis-N0-M0 vor, Stadium I bei T1-N0-M0. Stadium II umfasst T2-N0-M0, T1-N1-M0 und T2-N1-M0 und Stadium III umfasst T3-N0-M0, T3-N1-M0 und T4-N1-M0. Bei jedem Nachweis von Fernmetastasen (M1) wird von Stadium IV gesprochen (14).

Die Einteilung der Tumoren erfolgt einerseits anhand des Bezuges zum Tracheobronchialsystem (infrabifurkale, suprabifurkale und rein zervikale) und andererseits nach der TNM-Klassifikation der UICC (Union International Contre le Cancer) und der AJCC (American Joint Commission for Classification of Cancer).

Tab. 1: Tumor-Nodus-Metastase (TNM)-Stadieneinteilung des Ösophaguskarzinoms nach UICC*

Primärtumor (T-Stadium)	T_x	Primärtumor nicht beurteilbar
	T₀	Kein Anhalt für Primärtumor
	T_{is}	Carcinoma in situ
	T₁	Tumor infiltriert Lamina propria oder Submucosa
	T₂	Tumor infiltriert Muscularis propria
	T₃	Tumor infiltriert Adventitia
	T₄	Tumor infiltriert Nachbarorgane
Regionale Lymphknoten (N-Stadium)	N_x	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
	N₀	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
	N₁	Regionäre Lymphknotenmetastasen
Fernmetastasen (M-Stadium)	M_x	Fernmetastasen nicht beurteilbar
	M₀	Keine Fernmetastasen
	M₁	Fernmetastasen
		<ul style="list-style-type: none"> • Tumoren des unteren thorakalen Ösophagus* M1a: Metastase(n) in zöliakalen Lymphknoten M1b: Andere Fernmetastasen • Tumoren des oberen thorakalen Ösophagus M1a: Metastase(n) in zervikalen Lymphknoten M1b: Andere Fernmetastasen • Tumoren des mittleren thorakalen Ösophagus M1a: Nicht anwendbar M1b: Nicht-regionäre Lymphknoten oder andere Fernmetastasen
R-Kategorie (Tumorresektionsränder)	R0	Resektionsränder mikroskopisch und makroskopisch tumorfrei
	R1	Mikroskopischer Residualtumor
	R2	Makroskopischer Residualtumor

*Anmerkung: Aus operationstechnischen Gründen und im Hinblick auf das Muster der lymphogenen Streuung wird der thorakale Ösophagus (ca. 18 cm ab Zahnlinie) in 3 Segmente unterteilt: oberer Teil ab obere Thoraxapertur bis Trachealbifurkation, ca. 18 bis 24 cm ab Zahnlinie; mittlerer Teil von Bifurkation bis etwa 32 cm ab Zahnlinie; unterer Teil letzte 8 cm bis ösophagogastraler Übergang inklusive des abdominalen Anteils bis ca. 40 cm ab Zahnlinie.

Tab. 2: Klinische Stadieneinteilung der Ösophaguskarzinome nach AJCC*

Stadium	TNM-Kategorien			5-Jahres-Überlebensrate(89)
0	T _{is}	N ₀	M ₀	
I	T ₁	N ₀	M ₀	67%
IIA	T ₂	N ₀	M ₀	43%
	T ₃	N ₀	M ₀	
IIB	T ₁	N ₁	M ₀	26%
	T ₂	N ₁	M ₀	
III	T ₃	N ₁	M ₀	16%
	T ₄	jedes N	M ₀	
IV	jedes T	jedes N	M ₁	3%
IVA	jedes T	jedes N	M1a	
IVB	jedes T	jedes N	M1b	

* AJCC (87): Die vom AJCC etablierte klinische Stadieneinteilung beruht sowohl auf dem TNM-Stadium der UICC als auch auf der klinischen Prognose und praktischen chirurgischen Aspekten, u.a. der Resezierbarkeit.

Tab. 3: Klinische Stadieneinteilung der Ösophaguskarzinome nach UICC

Stadium	TNM-Kategorien		
0	T _{is}	N ₀	M ₀
I	T ₁	N ₀	M ₀
	T ₂	N ₀	M ₀
II	T ₃	N ₀	M ₀
	T ₄	N ₀	M ₀
III	jedes T	N ₁	M ₀
	jedes T	N ₂	M ₀
IV	jedes T	jedes N	M ₁

Klinisch-pathologische Merkmale, wie das Alter, die Histologie, die Tiefe der Tumorinvasion, das Ausmaß der lymphatischen und venösen Invasion, Fernmetastasen und das Stadium sind nur bedingt prognostisch zuverlässig (26).

Erkenntnisse über die molekulargenetischen Mechanismen der Tumorentstehung könnten die Erstellung von zuverlässigen Diagnose- und Prognosekriterien ermöglichen und

werden durch Entwicklung geeigneter Nachweis-Methoden erleichtert (27). Einzelne oder kombinierte diagnostische molekulare Marker werden durch Techniken mit hoher Spezifität und Sensitivität, wie der PCR-SSCP, der RT-PCR oder der Immunhistochemie können nun konventionelles Staging und Grading, wie z.B. durch die Identifizierung von Mikrometastasen, ergänzen (9). Durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper wurden die Untersuchung von Zellzyklus-, Apoptose-, oder Therapieresistenz-assoziierten Proteinen, z.B. mittels Immunhistologie oder Durchflußzytometrie, und deren Einsatz zum Screening von Tumormaterial ermöglicht (27). Auf Grund der unterschiedlichen genetischen Veränderungen von Ösophaguskarzinomen erscheint die Entwicklung einzelner spezifischer Marker schwer, eine ganze Gruppe von Markern, sogenannter Risikoprofile, hingegen eine bessere Strategie zu sein.

Tab. 4: Diagnostik und Staging bei Patienten mit Ösophaguskarzinom (87)

Anamnese	<ul style="list-style-type: none"> • Dysphagie, Gewichtsverlust, Regurgitation, Heiserkeit • Lymphknotenschwellung (axillär, nuchal, infra- und supraclavikulär)
Labor	<ul style="list-style-type: none"> • Basis-Laboruntersuchungen • Tumormarker zur Verlaufkontrolle: SCC (Plattenepithelkarzinom), CEA (Adenokarzinom)
Tumorlokalisation	<ul style="list-style-type: none"> • Ösophagoskopie mit Biopsie • Doppelkontrast-Ösophagusröntgen
Tumorinfiltration	<ul style="list-style-type: none"> • Endosonographie (ggf. mit Punktion) • Computertomographie • Bronchoskopie bei suprabifurkaler und zervikaler Tumorlokalisation • HNO-Status (Nn. Recurrens, Zweit-Tumor)
Lymphknotenmetastasen	<ul style="list-style-type: none"> • Endosonographie (ggf. mit Punktion) • Computertomographie (Hals/Thorax/Abdomen)
Fernmetastasen	<ul style="list-style-type: none"> • Röntgen-Thorax in 2 Ebenen • Perkutane Sonographie (Hals/Abdomen) • Computertomographie (Hals/Thorax/Abdomen) • Staging-Laparoskopie bei infrabifurkaler Tumorlokalisation

Tab. 5: Präoperative Untersuchungsmethoden zur Risikoabschätzung (87)

Pulmonales System	<ul style="list-style-type: none">• Röntgen-Thorax-Übersichtsaufnahmen in 2 Ebenen• Einfache Spirometrie (FEV₁ >70%)• Blutgasanalyse (paO₂ >55 mmHg)• Physiotherapie (Atemübungen, Inhalation)
Kardiovaskuläres System	<ul style="list-style-type: none">• Basis-EKG• Ggf. Belastungs-EKG und Echokardiographie
Leberfunktion	<ul style="list-style-type: none">• Cholinesterase (>2000 U/l)• Protein (>6 g/l)• Quick-Wert (>70%)• Gesamt-Bilirubin (<1,5 mg/dl)
Nierenfunktion	<ul style="list-style-type: none">• Kreatinin im Serum• Kreatinin-Clearance (>60 ml/dl)
Ernährungsstatus	Bei den in aller Regel als Folge ihrer Grunderkrankung Mangelernährten Patienten kann präoperativ eine kalorische enterale oder parenterale Ernährung über mindestens 14 Tage angezeigt sein.

2.1.7 Therapeutische Ansätze

In der Behandlung von Karzinomen des Ösophagus wird bei kurativer Intention die multimodale Therapie mit Einsatz von Chemo- und Radiotherapie, Operation sowie der externen Bestrahlungstherapie eingesetzt. Eine frühe Entdeckung von Ösophaguskarzinomen ist die beste, oft einzige Chance, die Prognose zu verbessern, unter der Voraussetzung einer kompletten Entfernung, weshalb das präoperative Staging eine entscheidende Rolle in der therapeutischen Entscheidung spielt.

Von Goldie und Coldman wurde zudem das Auftreten mutierter Klone mit einem mathematischen Modell beschrieben, und hieraus wurden wesentliche Rückschlüsse für die klinischen Therapiestrategien abgeleitet. Die Goldie-Coldman-Hypothese besagt, dass während der Größenzunahme eines Tumors die Zahl der zur Therapieresistenz führenden mutierten Zellklone zunimmt. Mit anderen Worten: Es besteht eine enge Beziehung zwischen Tumorgröße und der Wahrscheinlichkeit, dass der Tumor resistente Zellen enthält. Mit zunehmender Tumorgröße reduziert sich daher die Wahrscheinlichkeit einer Heilung durch Chemotherapie. Eine wesentliche

Schlussfolgerung aus der Goldie-Coldman-Hypothese ist die Notwendigkeit, bei chemosensiblen Tumoren so früh wie möglich mit einer zytostatischen Kombinationstherapie unter Verwendung nicht kreuzresistenter Zytostatika zu beginnen (28).

Zytostatika wirken meist nur auf proliferierende Zellen. In der G₀- oder Ruhephase sind gesunde als auch Tumorzellen daher weitgehend unempfindlich. Die G₀-Phase ist die prädominante Zellzyklus-Phase von Dauergewebes. Im Gegensatz hierzu treten Tumorzellen gehäuft aus der Ruhephase in den Zellzyklus ein. Die erste Phase des Zyklus ist die präsynthetische G₁-Phase, gefolgt von der DNA-Synthese-Phase (S-Phase), der prämitotischen G₂-Phase und der mitotischen M-Phase. Nahezu alle Zytostatika haben ihre größte Wirkung auf Zellen, die sich im Zellzyklus befinden. Vergleicht man Tumore mit unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten, so wird klar, dass schnellwachsende Tumore durch Chemotherapie am besten zu beeinflussen sind. Es besteht eine Beziehung zwischen der therapeutischen Sensibilität und der Wachstumsgeschwindigkeit. Die meisten klinisch eingesetzten Chemotherapeutika sind bei langsam wachsenden Tumoren, wie dem Ösophaguskarzinom ohne Basistherapie und Operation, daher oft nur palliativ einsetzbar (28).

Behandlungsergebnisse von Tumoren durch Chemotherapie zeigen, dass bei Ösophaguskarzinomen durch eine palliative Therapie eine Tumorverkleinerung erreichbar ist, ohne dass damit in der Regel eine Lebensverlängerung verbunden ist. Der Profit der Chemotherapie ist dabei vor allem für frühe Stadien der Erkrankung etabliert. Eingesetzt werden meistens 5-Fluorouracil (5-FU) und Cisplatin (28). 5-Fluorouracil hat als S-Phasen-spezifisches Zytostatikum seinen zellzyklusspezifischen Angriffspunkt an der DNA-Synthese. Folinsäure kann hierbei den Abbau von 5-FU durch Hemmung der Thymidilatsynthase (TS) verlangsamen. Cisplatin bildet DNA-Addukte und induziert hierdurch Zelltod. Die drei Wirkstoff-Kombination ergibt gute Resultate in frühen Stadien (29), steigert die Rate resezierbarer Tumore, verbessert die lokale Tumorkontrolle und verlängert das rezidivfreie Intervall. Der Effekt der systemischen Chemotherapie auf lokal fortgeschrittene und metastasierte Karzinomen ist jedoch gering. Aufgrund organotoxischer Wirkungen von Fluorouracil, wie z.B. auf das Knochenmark, mit Leuko-, Thrombozytopenie und Anämie, und auf den Magen-Darm-

Trakt, sowie hoher postoperativer Morbidität und Mortalität sind weitere Verbesserungen notwendig (30).

Gen- und immuntherapeutische Ansätze haben bisher keinen Einzug in die Klinik solider Tumore des Ösophagus gefunden.

Primäre oder erworbene Resistenzen können Ursache für das Versagen von zytostatischen Tumortherapien sein. Der Versuch der Induktion von Apoptose, welcher in vitro durch eine Reihe chemotherapeutischer Wirkstoffe gelingt, wird daher in Studien auch in vivo bei ösophagealen Plattenepithelkarzinomen angestrebt (32). So ist z.B. die Rekonstitution von Zellzyklus-Arrest und Apoptose-fördernden Genen bereits Ziel gentherapeutischer Strategien und für p53, den "Wächter des Genoms" (33), konnte gezeigt werden, dass lokaler p53-Gentransfer die Tumorregression bei Bronchialkarzinomen begünstigt.

Vor der kurativen Tumorresektion wird der kombinierte und simultane Einsatz einer präoperativen Radiotherapie additiv zur Chemotherapie durchgeführt (27). Die Strahlentherapie kann perkutan und/oder als intraluminale Brachytherapie durchgeführt werden.

Unter den operativen Verfahren wird die Anwendung von EMR (endoscopic mucosal resection) als minimal invasive Behandlung zur frühen Entdeckung und gleichzeitigen Entfernung oberflächlicher Tumoren diskutiert. Die Indikationen für EMR sind auf Tumore der epithelialen Schicht und der Mukosa propria beschränkt (34). Tiefere liegende Karzinome erfordern eine radikale Resektion mit Thorakotomie bzw. Laparatomie (8).

Zur weiteren Einschätzung der Operabilität sollten die präoperativen Stagingverfahren die Lage des Tumors zu angrenzenden Strukturen (Lokalisation), die Tiefe der Tumorerkrankung bestimmen (T-Status), regionale Lymphknotenmetastasen evaluieren (N1), Fernmetastasen ausschließen (M1) und das histopathologische Stadium bewertet werden. Bildgebende Techniken mit geeigneter Sensitivität sind die Endosonographie, die Computertomographie, Röntgenaufnahmen, Ultraschall und die Laparoskopie (35). Wichtig ist es, Patienten herauszufiltern, die von einer Operation profitieren, sowie Patienten mit z.B. Nachweis von Fernmetastasen von evtl. unnötig risikoreichen Operationen mit prä- und postoperativen Komplikationen auszuschließen.

Tab. 6: Therapie des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus (88)

<p>1. Neoadjuvante (präoperative) Therapie</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Alleinige neoadjuvante (präoperative) Radiotherapie des R0 -resektablen Oesophaguskarzinoms ist nicht zu empfehlen. • Neoadjuvante (präoperative) kombinierte Radiochemotherapie ist prinzipiell wirksam. • Vor allem bei lokal fortgeschrittenen suprabifurkalen und zervikalen Plattenepithelkarzinom.
<p>2. Chirurgische Therapie in kurativer Zielsetzung</p>	<p>R0-Resektion ist wesentliche Voraussetzung für kurativen Behandlungserfolg.</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Nichtinvasive und frühinvasive Plattenepithelkarzinome:</i> Für T_{is}, bis 2 cm, gut differenzierte Mukosakarzinome ist Mukosaresektion ausreichend. • <i>Suprabifurkales Ösophaguskarzinom:</i> Bei T1/T2-Tumoren subtotale Ösophagusresektion mit abdominaler und mediastinaler Lymphadenektomie. Bei T3/T4-Tumoren (wenn nicht R0-resektabel) neoadjuvante Strahlenchemotherapie (Downstaging), sekundär operative Therapie. • <i>Infrabifurkales Ösophaguskarzinom:</i> Bei T1/T2-Tumoren subtotale Ösophagusresektion mit abdominaler und mediastinaler Lymphadenektomie. Auch im fortgeschrittenen Tumorstadium, bei T4-Tumoren jedoch erhöhtes Operationsrisiko und ungünstige Langzeitprognose. Alternative im Stadium II/III Radiochemotherapie. • <i>Zervikales Ösophaguskarzinom:</i> Bezüglich des therapeutischen Vorgehens besteht kein Konsens.
<p>3. Operative Technik</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Thorakale Plattenepithelkarzinome:</i> Am besten nach rechtsseitiger Thorakotomie. En-bloc-Resektion des intrathorakalen Ösophagus mit umgebendem Fett- und Bindegewebe, Ductus thoracicus, ggf. Vena azygos und adhärenter Strukturen. Stets mediastinale und abdominelle Lymphadenektomie, letztere umfasst proximale Resektion der kleinen Kurvatur des Magens und Entfernung der zoeliakalen und suprapankreatischen Lymphknoten. • <i>Ösophagusersatz:</i> Der zu Schlauchmagen umgeformte Magen oder Kolonabschnitt. • <i>Minimal-invasive, thoroskopische oder laparoskopische Operationsmethoden:</i> Derzeit keinen gesicherten Platz bei der operativen Therapie des Ösophaguskarzinoms mit kurativem Ziel (Internationale Konsensus-Konferenz ISDE 1995). • <i>Pathohistologische Diagnostik des Resektats:</i> Pathohistologischer Befund mit Tumortyp, Grading nach WHO, R-Klassifikation, pTNM-Klassifikation nach UICC, Anzahl der untersuchten und befallenen regionären

	<p>Lymphknoten. Verlässliche Diagnose pN0 erfordert histologische Untersuchung von mindestens sechs regionären Lymphknoten. Bei weitgehender Tumorregression nach multimodaler Therapie (bes. Plattenepithelkarzinome) Tumorausbreitung dann nach UICC als ypTNM-Stadium klassifizieren.</p>
<p>4. Postoperative (adjuvante) Strahlentherapie und/oder Chemotherapie</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Nach R0-Resektion von Plattenepithelkarzinomen:</i> Postoperative Strahlentherapie vermindert lokoregionäre Rezidivrate, ohne Überlebensrate zu verbessern. Keine Daten, die Einsatz außerhalb von Studien rechtfertigen. • <i>Nach R1-Resektion suprabifurkaler Plattenepithelkarzinome:</i> Evt. kann durch Radiotherapie eine lokoregionäre Tumorprogression mit Einbeziehung des Tracheobronchialsystems vermieden werden. Gesamtreferenzdosis im ehemaligen Tumorbereich von 54 bis maximal 60 Gy bei Einzeldosen von 1,8 Gy täglich empfehlenswert.
<p>5. Radiochemotherapie primär irresektabler Oesophaguskarzinome</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Für lokal fortgeschrittenen nicht R0-resektablen Karzinome kombinierte simultane Radiochemotherapie empfehlenswert. Gesamtreferenzdosis von mehr als 60 Gy (1,8 Gy/fx, ICRU 50) simultan mit Zytostatikakombination (Cisplatin/5-Fluorouracil). • Wirksamkeit der Kombination der externen Strahlentherapie mit endokavitärer Bestrahlung (Brachytherapie) auf Überlebenszeit bislang nicht nachgewiesen.
<p>6. Palliativmaßnahmen</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Beseitigung von Schluckbeschwerden bei nicht resektablem Karzinom:</i> Endoskopische, interventionelle, chirurgische und radiotherapeutische Maßnahmen. Intraluminale Bestrahlung in Afterloadingtechnik ist wenig belastende Therapie mit meist rascher Besserung bestehender Schluckbeschwerden. Bei starken thorakalen Schmerzen und/oder Kompression des Ösophaguslumens evt. kleinvolumige perkutane Radiotherapie mit 36–45 Gy als Palliativmaßnahme. • <i>Fernmetastasen eines Plattenepithelkarzinoms:</i> evt. Cisplatin-/5-Fluorouracil-Kombinationstherapie (Remissionsraten 30–40%).

2.2 Molekularbiologische Grundlagen

2.2.1 Apoptose und Nekrose

Apoptose, der programmierte Zelltod, spielt eine zentrale Rolle in biologischen Systemen, wie der Embryogenese, der physiologischen Morphogenese und Zellerneuerung, dem Nerven- und Immunsystem, der Homöostase eines Organismus

und bei der Zellantwort auf äußere Stimuli, wie dem durch Zytostatika oder Bestrahlung induzierten Zelltod (36). Studien in Modellorganismen bestätigen, dass die grundlegenden Apoptoseprozesse im Laufe der Evolution konserviert wurden (83) und aus einer Einleitungs- und einer Ausführungsphase, mit verschiedenen Effektoren, Inhibitoren und Initiatoren bestehen. Während dieser Phasen finden morphologische und biochemische Veränderungen statt (38).

Im Vergleich zu nekrotischen Prozessen ist Apoptose genetisch programmiert und erlaubt die geregelte Elimination einzelner Zellen. Die Atmungskette, als Energielieferant der Apoptose, bleibt nach Induktion noch lange aktiv und damit auch die Membran, im Gegensatz zur Nekrose, initial erhalten. Jedoch ändert sich die Membranzusammensetzung, was ein „Iss-mich“ Phagozyten-Signal auslöst. Der Einstrom zytosolischer Ionen und H₂O durch Permeabilitätsveränderungen führt dann in späteren Phasen zum Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials und der Atmungskette. Apoptotische Zellen werden durch Phagozytose aus dem Gewebeverband entfernt, ohne inflammatorische Reaktionen oder Schäden an angrenzenden Zellen zu verursachen.

Die für die Apoptose charakteristischen, morphologischen Veränderungen, sind jedoch aufgrund der kurzen Dauer schwer in histologischen Schnitten darzustellen (39). Sie bestehen u.a. in folgenden Merkmalen: beobachtet wird eine zytoplasmatische Schrumpfung und ein Membran-Blebbing. Diese sichtbaren Transformationen sind begleitet von biochemischen Veränderungen. An der Zelloberfläche wird u.a. die Externalisierung von Phosphatidylserin ausgelöst, die die Erkennung durch Phagozyten fördert. Intrazellulär zeigt sich eine Chromatin-Kondensation und Fragmentierung der DNA in von Membranen umschlossenen Vesikeln, sowie die Spaltung spezifischer zellulärer Polypeptide durch aktivierte Caspasen (84).

Neben einer Verlängerung der Zellüberlebenszeit und Bildung hyperplastischen Gewebes kann die Hemmung von Apoptose direkt an der malignen Transformation beteiligt und verantwortlich sein. Die Akkumulation genetischer Veränderungen erleichtert hierbei einen selektiven Wachstumsvorteil und den Verlust der Proliferationskontrolle.

2.2.2 Apoptosesignalwege

Die Aktivierung zellulärer Apoptoseprogramme wird u.a. ausgelöst durch exogene oder endogene Schädigungen, wie Hypoxie, (UV-) Strahlung, Medikamente, wie Zytostatika, die zu DNA-Schäden, Störungen der Mitochondrienfunktion, der Gewebemöostase oder der die Zellteilung regulierenden Mechanismen, die zelluläre Stressprogramme aktivieren, führen. Ein Teil der Zelltodsignalwege wird über die Todes-Rezeptoren der TNF-Familie vermittelt, welche u.a. die folgenden Rezeptoren und Liganden einschließen: den p55 und p75 TNF-Rezeptor (TNF-R1 und R2) des Tumor Nekrose Faktors alpha (TNF- α), der CD95/Fas-Rezeptor mit dem Fas-Liganden, zwei TRAIL-Rezeptoren (DR4 und DR5) und deren TNF-related apoptosis inducing factors (TRAIL) sowie DR6. Extrazellulär besitzen die Rezeptoren Cystein-reiche Domänen, welche deren Trimerisierung vermitteln. Intrazellulär befinden sich Todes-Domänen (Death-Domain (DD)), die an der Bindung von Adaptorproteinen und der Bildung des DISC (death inducing signaling complex) beteiligt sind. Die Liganden induzieren die Trimerisierung und die lokale Konzentration der Rezeptoren und stimulieren die Rekrutierung der Adaptorproteine FADD zur Todesdomäne (DD). Das apoptotische Programm läuft weiter über die Initiator-Caspasen 8 und 10, die sich vermutlich autokatalytisch aktivieren (84).

Dieser Zelltodsignalweg wird auch als extrinsischer Signalweg bezeichnet, da er über extrazelluläre Signale aktiviert wird. Im Gegensatz hierzu aktivieren intrazelluläre Stress-Signale den intrinsischen Signalweg, der über die Aktivierung des mitochondrialen Zelltodsignalweges exekutiert wird. Beteiligt sind u.a. die antiapoptischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL, sowie die proapoptischen Proteine Bax, Bak und Bok, welche direkt die Mitochondrien aktivieren. Die Konformationsänderung im N-Terminus von Bax löst dessen Translokation bzw. Insertion vom Zytoplasma in die äußere Mitochondrienmembran aus. Dieser Vorgang öffnet Ionenkanäle und setzt ATP und Cytochrom c frei. Freigesetztes ATP und Cytochrom c binden an das zytosolische Apaf-1 Protein, führen zur Konformationsänderung von Apaf-1 und damit zur Rekrutierung von Pro-Caspase 9 (84). Dieser Komplex wird als Apoptosom bezeichnet und führt zur Aktivierung von Procaspase-9 zur aktiven Caspase-9.

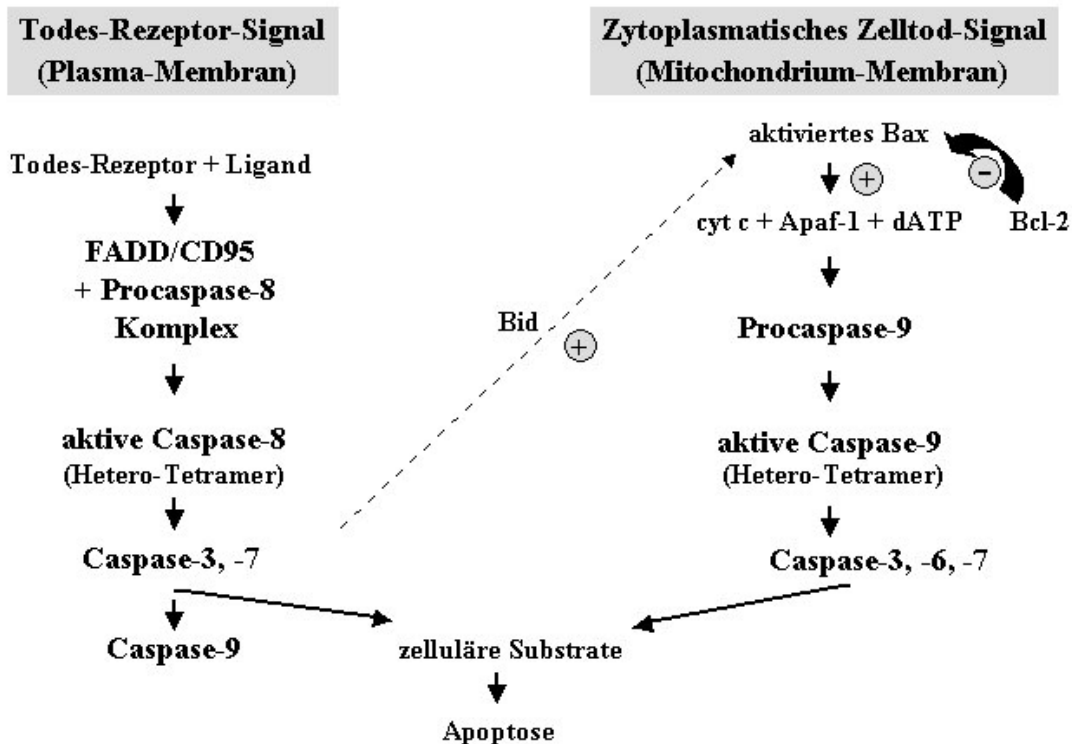


Abb. 2: Apoptose-Signalwege

2.2.3 Das Onkogen K-ras

Das Proto-Onkogen K (Kirsten)-ras, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa, zählt zu einer Familie von GTPasen mit weiteren Vertretern wie H (Harvey)-ras und N (Neuroblastom)-ras (40), welche Sequenzhomologie auf Aminosäuren auf ca. 85% haben (41). Ras wird als inaktives Verläufermolekül synthetisiert, das posttranslational modifiziert werden muss, um aktiv zu wirken. Der wichtigste Mechanismus ist hierbei die Prenylierung durch das Enzym Farnesyltransferase. Mutierte und hierdurch konstitutiv aktive Ras-Proteine liegen in der farnesylierten Form vor. Dieses aktivierte Ras rekrutiert Adapterproteine und aktiviert nachgeschaltete Kinasesignalwege (81). Diese induzieren Kaskaden Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAP-Kinasen), stimulieren Transkriptionsfaktoren und steuern zelluläre Antworten auf

exogene Reize, wie Wachstumssignale oder UV-Strahlung. Die dabei stattfindende GTP-Bindung ist in gesunden Zellen durch ein Wechselspiel von Rezeptor-Tyrosinkinasen mit intrazellulären Proteinen kontrolliert (43). Onkogene und konstitutions aktive Formen von K-ras haben dauerhaft GTP gebunden. Ursache dafür sind u.a. Mutationen in den Bindungsstellen der Proteine, wodurch die Hydrolyse von GTP zur GDP verhindert wird (46). Dabei erfordert die Aktivierung von K-ras, im Gegensatz zur Inaktivierung der zwei Allele von Tumorsuppressorgenen, nur ein, nicht zwei, genetische Ereignisse (5).

Ras-Gene zählen zu den am häufigsten deregulierten zellulären Onkogene in menschlichen Tumoren (48) und zeigen eine frühe Aktivierung in verschiedenen Rattenmodellen für maligne Transformation.

Mutationen sind v.a. nachweisbar in humanen Tumoren des gastro-intestinalen und respiratorischen Traktes, sowie in ösophagealen Rattenmodellen (49). Frühere Studien zur Frequenz von K-ras Mutationen in humanen ösophagealen Tumoren sprechen von ca. 5% (48).

Die Expressionsprodukte zweier ras-regulierter Gene, Osteopontin und Cathepsin L, welche mit Tumorinvasion und Metastasierung korrelieren, konnten in hoher Frequenz in Ösophaguskarzinomen nachgewiesen werden, scheinen jedoch beim größten Teil der Karzinome durch ras-unabhängige Mechanismen vermittelt zu sein (2).

2.2.4 Zellzyklus und Tumorsuppressorgen p53

Der Zellzyklus besteht aus den aufeinander folgenden Phasen der Interphase und der Mitose in proliferierenden Geweben. Die Interphase umfasst die G1 (gap1-), die S- (Synthese-), die G2- (gap2-) Phase. Nicht proliferierende Zellen befinden sich zumeist in der G0-Phase. Die sich anschließende Mitose durchläuft die Pro-, Prometa-, Meta-, Ana- und die Telophase. Die Dauer des Zellzyklus ist variabel, z.B. in Lymphozyten ca. 24 Stunden.

Ist ein durch DNA-Schädigung entstandene Schaden innerhalb des Zellzykluses irreparabel, wird das Tumorsuppressorgen aktiviert. P53 induziert dann Apoptose, um genetisch irreversibel geschädigte Zellen zu eliminieren. Dies erfolgt unter anderem durch transkriptionelle Aktivierung der Expression des proapoptotischen Bax Proteins und Hemmung der Expression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins. Bax und Bcl-2 sind

homologe Proteine, welche intrazelluläre Heterodimere bilden, wobei die Wechselwirkung von Bcl-2 mit Bax für die Hemmung des Zelltod durch Bcl-2 wichtig zu sein scheint. Ferner reguliert P53 die Sensitivität gegenüber Apoptose, dass deren Triggerung erleichtert wird, z.B. durch Bestrahlung oder zytotoxische Wirkstoffe.

Das Tumorsuppressorgen p53 liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17, umfasst in elf Exons von 16-20 kb zelluläre DNA und kodiert ein Phosphoprotein von 393 Aminosäuren. P53 Wildtyp ist ein Schlüsselgen der Zellzyklusregulation, des Zellwachstum und der Tumorsuppression. Wichtige Elemente sind dabei die Erhaltung der genetischen Integrität durch Regulation des G1 - S-Phaseüberganges, des Zellzyklusarrestes und der DNA-Reparatur vor der Induktion von Apoptose.

Die Aktivität von p53 selbst und die Höhe der Expression des p53 Protein werden durch transkriptionelle und posttranskriptionelle sowie durch posttranslationale Mechanismen reguliert. Seine Funktion, als transkriptioneller Regulator zelluläre Gene zu aktivieren bzw. zu reprimieren erfordert DNA-Bindungsregionen, um durch Sequenz-spezifische Wechselwirkungen an Zielgene zu binden. Promotoren solcher Zielgene enthalten Sequenzen mit Homologie zur Konsensus-Bindungsstelle von p53 (51).

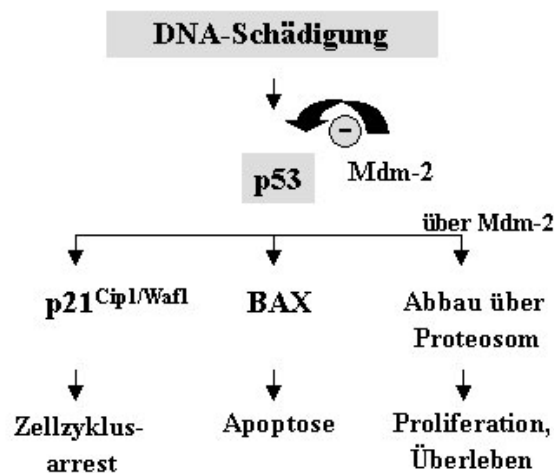


Abb. 3: Aktivierung und Funktion von p53

Einige Elemente des Zellzyklus werden durch Cyclin-abhängige-Protein-Kinasen (Cdks) reguliert, deren Aktivität durch Cycline induziert und durch Cyclin-Kinase-Inhibitoren (CKIs) gehemmt wird. Zwei Familien an CKIs sind identifiziert. Die Mitglieder der ersten (INK4) sind p16INK4a, p15INK4b, p14INK4d, p18 und p19, welche Spezifität für Cdk4 und Cdk6 besitzen. Die zweite der Familien (CIP/KIP) enthält p21/WAF1/CIP1, p27KIP1 und p57KIP2 mit Spezifität für Cyclin/Cdk-Komplexen (52).

Nach DNA-Schädigung wird p21 durch p53 hochreguliert, welches in Folge durch die Hemmung von Cyclin D1–Cdk4 und Cyclin E–Cdk2 Komplexen zur Hemmung der Cdk-abhängigen Phosphorylierung von Rb führt. Dies wiederum hemmt die Transkription von Genen, die den Übergang von der G1- zur S-Phase ermöglichen. Die Folge ist Zellzyklusarrest in der G1-Phase und damit Suppression von Wachstum, u.a. von Tumorwachstum (52). Dieser Arrest erlaubt die Reparatur geschädigter DNA vor der sich anschließenden DNA-Replikation und verhindert eine unkontrollierte Proliferation. Gelingt der Zelle die Reparatur, dann wird der G1-Block aufgehoben und die Proliferation fortgesetzt. Dieser Vorgang der Zellzyklusarrest-Funktion von p53 über den nachgeschalteten Effektor p21 scheint nur durch den Wildtyp von p53 induziert zu werden. Mutiertes p53 jedoch verliert im Allgemeinen seine Fähigkeit, die Transkription der Zielgene, wie p21, zu induzieren. So zeigt sich z.B. in Tumoren mit p53-Überexpression, welche durch p53 Mutationen mit entsprechender Protein-Akkumulation ausgelöst sein kann, häufig eine niedrige bzw. keine p21 Expression (23). Neben der Induktion von p21 über p53 existiert ein p53-unabhängiger Weg, welcher z.B. über Wachstumsfaktorentzug ausgelöst werden kann (26).

2.3 Genetische Veränderungen in Tumoren

2.3.1 Allgemeine Kategorien genetischer Veränderungen in Tumoren

In tumorösen Zellen werden häufig genetische Veränderungen identifiziert, welche das Wachstum kontrollierende Gene beeinflussen. Drei Kategorien stehen dabei im Vordergrund.

Genom-Mutationen sind Änderungen in der Chromosomenanzahl, Aneuploidie genannt, durch Verlust oder Vervielfachung ganzer Chromosomen oder Anteile von Chromosomen.

Chromosomen-Mutationen sind Veränderungen der Form bzw. Struktur von Chromosomen, wie z.B. die Translokation. Dabei handelt es sich um Fusionen von verschiedenen Chromosomen oder von Segmenten einzelner Chromosomen. Beim zusammengesetzten, im Gegensatz zum einfachen Typ, können dabei während der Rekombination Deletionen oder Insertionen von Anteilen chromosomaler Arme auftreten, was zu Verlusten oder Zugewinnen an chromosomalem Material, und hierdurch bedingt zur Produktion neuer Gene, sogenannter Fusionsgene, führen kann.

Nukleotidsequenz-Austausch ist charakterisiert durch intragenetische Gen- bzw. Punkt-Mutationen und umfasst Basen-Substitutionen, Deletionen oder Insertionen einzelner oder mehrerer Nukleotide. Hierzu zählen ebenfalls Polymorphismen, z.B. SNPs (single nucleotide polymorphisms). In Abhängigkeit von der Art und Lage der dadurch ausgetauschten Aminosäure im Protein, führt nicht jeder Nukleotid-Austausch zu einer Veränderung des Gen-Produktes. Wird die genetische Information jedoch verändert, entstehen u.a. Missense- oder Nonsense-Mutationen, Stop-Kodons oder Leseraster-Mutationen, bei welchen infolge Insertion oder Deletion der Triplet-Code eine andere Bedeutung bekommt und ein sogenannter Frame-Shift, eine Verschiebung des Leserasters, auftritt. Geringe Veränderungen verursachen z.B. Austausche gleich geladenen Seitenketten bzw. Aminosäuren; ein Austausch z.B. im aktiven Zentrum eines Enzyms kann zudem zu dessen Funktionsverlust führen. Substitution eines Pyrimidin- bzw. Purin-Nukleotids gegen ein anderes Pyrimidin- bzw. Purin-Nukleotid wird Transition, Substitution eines Pyrimidin- gegen ein Purin-Nukleotid Transversion genannt.

Spontane oder durch Chemikalien ausgelöste Mutationen treten an ca. 10 000 Stellen pro Zelle und Tag auf. Mutationseignisse sind dabei nicht gleichmäßig über die Sequenz eines Gens verteilt. Es gibt Stellen, an welchen Mutationen selten oder nicht auftreten, während an anderen mehrere unabhängige Mutationseignisse auftreten können. Letztere Stellen nennt man „hot-spots“.

2.3.2 Genetische Veränderungen von K-ras

Die ras-Proteine zählen zu den wichtigsten bekannten Onkogene. Es wird geschätzt, daß ihre Mutation an der Entstehung von bis zu 10 % aller bösartigen Erkrankungen Anteil hat (45). Onkogene Varianten von K-ras sind mutierte, konstitutiv aktive Proteine,

die dauerhaft GTP gebunden haben. Ursache dafür können Mutationen in den Nukleotid-Bindungsstellen des Proteins sein, was die Hydrolyse von GTP zur GDP verhindert (46). Diese Mutationen sind hauptsächlich in den Kodons 12, 13 und 61 zu finden (54).

Daten aus dem Jahre 1991 berichten von über 400 humanen Tumoren, in welchen K-ras Punktmutationen charakterisiert wurden. K-ras scheint u.a. an der Entstehung epithelialer Tumore beteiligt zu sein, mit besonders hohen Prozentangaben für Adenokarzinome des Pankreas (75%), Adenome und Karzinome des Kolon und Rektum (40%), Karzinome der Gallengänge sowie Lungen-, Leber- und Nierenkarzinome. Differenzen in gastrointestinalen und respiratorischen Tumoren beruhen möglicherweise auf unterschiedlicher Exposition gegenüber genotoxischen Wirkstoffen (55).

In ösophagealen Karzinomen wurde über eine Gen-Amplifikation von K-ras berichtet, Mutationen konnten bislang jedoch kaum nachgewiesen werden. Die geringe Frequenz der K-ras Mutationen steht dabei häufig im Gegensatz zur hohen Frequenz der p53 Mutationen in ein und denselben Karzinomen (2).

Im Rahmen der Diagnostik gehört das Onkogen K-ras, z.B. bei Pankreas- und Dickdarmkarzinomen zu den bislang am besten geeigneten molekularbiologischen Markern, da sie schon in frühen Stadien der Kanzerogenese auftreten und damit für eine Tumorfrüherkennung möglicherweise geeignet sind. Da die Mutationen im wesentlichen an definierten Positionen in Kodon 12 und 13 auftreten, können sie durch Hybridisierung mit wenigen Oligonukleotid-Sonden identifiziert werden und durch Vervielfältigung der mutierten DNA selbst bei einem Anteil von weniger als 1% des Probenmaterial erkannt werden (56).

2.3.3 Genetische Veränderungen des p53 Genes

Der Verlust von p53 kann durch die fehlende Hemmung der Replikation geschädigter DNA und gesteigerter Proliferation veränderter Zellen zu genomischer Instabilität führen. Normalerweise bewirkt das Vorhandensein eines intakten p53 eine gute Sensitivität von Zellen gegenüber zytotoxischen Wirkstoffen bzw. Bestrahlung. Zellen mit defektem p53 zeigen daher eine verminderte Zytostatika-induzierte Apoptose bzw. Zellzyklusarrest. Unklarheiten bestehen jedoch in der Frage, wie der Verlust von p53

zur Resistenz führt. Ursächlich hierfür könnte eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen dem proapoptotischen Bax und dem antiapoptotischen Bcl-2 sein, da p53 ein transkriptioneller Aktivator des bax-Promotors ist und die Expression von Bcl-2 reduziert.

P53 Mutationen sind häufig in humanen Tumoren zu finden, u.a. bis zu 50% in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen (23). Dabei wird diskutiert, ob sie schon in frühen Stadien leichter basaler Hyperplasie (basal cell hyperplasia (BCH)) entstehen oder ein spätes Ereignis darstellen.

Nicht alle Mutationen haben Einfluss auf die Struktur oder Funktion des p53 Proteins. Sie können im Intron gelegen sein, sich als stille Mutationen erweisen und damit nicht den nötigen Wachstumsvorteil hervorrufen, um Tumore zu fördern (58).

Charakterisiert sind die Mutationen v.a. durch Punktmutationen (35-80%), kleine Deletionen oder Insertionen, mit Frameshift oder Aminosäure-Austauschen. Lokalisiert sind sie häufig nahe an GC-reichen Regionen (85) und mit über 90% in den phylogenetisch konservierten Domänen der Exons 5 - 8. Hotspots sind im Exon 5 die Kodons 126-187(175), im Exon 6, Kodon 188-224(213), im Exon 7, Kodon 225-261(245/248/249) und im Exon 8 die Kodons 262-290(273/282). Dies sind DNA-Sequenzen, welche für Aminosäuren der DNA-Bindungsdomäne kodieren und deren wichtigste Rolle die Sequenz-spezifische Transkription von Zielgenen, wie des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors (CDK) p21^{WAF/CIP1} oder des proapoptotischen Bcl-2 Homologs Bax, ist. Diese Mutationen betreffen häufig die für Arginin kodierenden Segmente, welche eine entscheidende Rolle in der DNA-Bindung durch Wasserstoffbindungen spielen.

Der Verlust der Heterozygotie, d.h. der Verlust eines Allels des Chromosoms 17p auf dem das p53 Gen lokalisiert ist, wird im Zusammenhang mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus beobachtet. Die Befunde deuten auf einen hohen Grad genetischer Instabilität des Chromosoms 17p hin. Besonders betroffen sind drei schmale Regionen, welche auch den Locus für das p53 Gen enthalten (17p13.2-p13.1) (15). Trotz z.T. hohen Frequenzen in geographischen Regionen mit den weltweit höchsten Inzidenzraten und der Beobachtung einer familiären Häufung, konnte allerdings keine signifikante Korrelation zwischen Verlusten von 17p und p53 Mutationen des zweiten p53 Allels nachgewiesen werden.

Zum Vergleich von p53 Mutationen eignet sich insbesondere die IARC TP53 Mutations Datenbank (International Agency for Research on Cancer (IARC) als Teil der WHO, abrufbar unter: <http://www.iarc.fr/>), welche derzeit insgesamt 17689 Fälle der weltweit charakterisierten Mutationen umfasst. Die Prozentsätze für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus liegen bei 17% - 71% in den untersuchten Populationen.

2.3.4 Genetische Veränderungen in Ösophaguskarzinomen

Da Ösophaguskarzinome in den meisten Fällen erst in fortgeschrittenen Stadien entdeckt werden, ist die Identifikation von nicht-invasiven, serologischen Marker zur Frühentdeckung und zuverlässigeren prognostischen Bewertung von besonderer Bedeutung. Klinische Studien haben daher das Ziel, neben dem Zusammenhang von p53 Mutationen und intra-tumoraler p53 Protein-Akkumulation, eine humorale Immunantwort mit Produktion von p53 Antikörpern gegen Plattenepithelkarzinome nachzuweisen. Ziel dieser Studien ist, die Relevanz von p53 Antikörpern als Biomarker zu begründen. In gesundem Gewebe sind Antikörper gegen p53 nicht nachweisbar. In 9-26% humaner Tumore konnten jedoch p53 Antikörper als potentielle Antwort auf die Tumorentwicklung in frühen Stadien entdeckt werden. Dabei erscheinen bestimmte Mutationen immunogener zu sein als andere. Bei Fehlen immundominanter Epitope, wie z.B. bei Frameshift-Mutationen mit Produktion trunkierter p53-Proteine, werden geringere oder gar keine Immunantworten hervorgerufen (19). Ferner muss noch geklärt werden, wie zuverlässig die Bewertung der Serokonversion der p53 Antikörpern, nach Behandlung der Erkrankung, ist, um die Therapiekontrolle zu erleichtern (60). Die hohe Prävalenz zirkulierender p53 Antikörper sowie die signifikante Korrelation der humoralen Immunantwort mit p53 Antikörpern und einer intratumoralen p53 Protein-Akkumulation (61) würde die Anwendung von serologischen p53 Antikörpern als nicht-invasive Marker zur Früherkennung rechtfertigen. Besonders Patienten in Hoch-Risiko Gebieten könnten profitieren, zudem ist sie einfacher anzuwenden, als immunhistochemische Methoden oder Mutationsanalysen (19).

3. Patienten, Material und Methoden

3.1 Patienten-Kollektiv der Plattenepithelkarzinome des Ösophagus

Es wurden 68 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus analysiert. Das Material wurde von der Chirurgischen Abteilung des Universitäts-Klinikums Benjamin-Franklin der Charité-Universitätsmedizin, Berlin bereitgestellt. Die Patienten wurden dort in den Jahren 1982 bis 1993 nach Resektion mit kurativer Absicht behandelt und nachuntersucht. Tab. 7 zeigt die klinisch-pathologischen Parameter des Patienten-Kollektivs.

Tab. 7: Klinisch-pathologische Parameter des Patienten-Kollektivs

Anzahl der Patienten

Gesamt n = 68

Männer/Frauen 53/16

Alter (in Jahren)

Mittelwert 56,82 ± 9,01

Spannweite 37 - 84

T-Stadium

T1 6 (8,8%)

T2 15 (22,1%)

T3 37 (54,4%)

T4 10 (14,7%)

N-Stadium

N0 21 (30,9%)

N1 36 (52,9%)

N2 10 (14,7%)

Fehlend 1 (1,5%)

M-Stadium

M0 53 (77,9%)

M1 15 (22,1%)

Grading

G1 2 (2,9%)

G2 28 (41,2%)

G3 35 (51,5%)

Fehlend 3 (4,4%)

UICC-Klassifikation

1 2 (2,9%)

2	15 (22,1%)
3	35 (51,5%)
4	16 (23,5%)

AJCC-Klassifikation

1	3 (4,4%)
2	23 (33,8%)
3	27 (39,7%)
4	15 (22,1%)

3.2 Allgemeine Darstellung der, zur Mutationsanalyse verwendeten Methoden

Zur Mutationsanalyse von Tumorgeweben an Hand von operativ reseziertem oder biopsiertem Material werden Schnitte mittels eines Mikrotoms angefertigt. Diese Handhabung beinhaltet u.a. zwei Nachteile, die Kontamination der Schnittfläche, beim Einsatz an unterschiedlichen, nacheinander bearbeiteten Blöcken, sowie eine mögliche mangelhafte Gewebe-Repräsentation. Letztere ist dann nicht eindeutig, wenn verschiedene Komponenten des Gewebes, wie z.B. epitheliales und interstitielles, oder unterschiedliche Arten von Läsionen, wie Tumore und um-/anliegendes normales Gewebe, im Schnitt enthalten sind. Für qualitativ wie quantitativ gute Ergebnisse der PCR wird daher eine manuelle Bearbeitung des Materials durch das Ablösen abgeschabter Stücke anstelle der konventionellen Schnitte empfohlen. Durch Gebrauch einer chirurgischen Klinge bzw. eines Skalpels können mit visueller Kontrolle, normales Gewebe und Wachs vom Zielgewebe bzw. verschiedene Arten an Tumoren getrennt werden. Der Anteil relativ reiner Tumor-DNA ist höher, falsch-positive Reaktionen der PCR werden reduziert oder verhindert. Die Menge an extrahierter DNA ist vergleichbar. Der Prozess der Fixierung der Proben und die Einbettung in Paraffin haben einen bedeutenden Effekt auf die molekulare Anordnung der Nukleinsäuren im Gewebe und können in unterschiedlichem Ausmaß in der Degradation der DNA resultieren. Wichtige Einflussfaktoren auf die Qualität reiner DNA sind das zeitliche Intervall der Gewebe-Hypoxie zwischen Operation und Fixierung, der Grad der Gewebe-Autolyse und Nekrose, die Größe der Proben und deren Permeabilität gegenüber dem Fixativ, die chemische Zusammensetzung des Fixativs, die Dauer der Fixierung und der Aufbewahrung in Paraffinblöcken. Als Hauptmechanismus der DNA-Degradation während der Fixierung wird v.a. das sogenannte cross-linking von Proteinen der DNA beschrieben. Der erste Schritt der Reaktion mit Formaldehyd führt zu schneller, reversibler Hydroxymethylierung der Amino- und Imino-Gruppen der Nukleinsäurebasen, der zweite zu einer langsamen Methylene-Brückenbildung zwischen den Basen. Eigene Erfahrungen zeigen aber, dass die DNA solcher Genteste in kurze Fragmente degeneriert ist und hierdurch die PCR Amplifikation genomischer Segmente erschwert ist.

Beide Schritte werden durch die Reaktions-Temperatur und die Konzentrationen der Reagentien moduliert. Bei einem Anstieg von 37°C auf 65°C beginnen

Wasserstoffbindungen zwischen den Basenpaaren der Doppelstrang-DNA zu brechen, bei $>90^{\circ}\text{C}$ liegen Einzelstränge vor und die DNA ist denaturiert. Durch die genannte Hydroxymethylierung von Formaldehyd mit denaturierter DNA kann die Reaktions-Temperatur gesenkt und das Re-Annealing gehemmt werden. Jedoch auch bei 37°C oder Raumtemperatur reagiert Formaldehyd direkt oder indirekt mit DNA. Eine direkte Wirkung ist die Bildung freier, exozyklischer Aminogruppen, exponiert in der Doppelstrang-DNA, und endozyklischer Amino- und Imino-Gruppen. Indirekt wird eine Bindung der Amino-Gruppen von Histonen und deren Verbindungen zur DNA ausgelöst. Beide Effekte vermehren sich quantitativ bei Verlängerung der Fixierung. Das cross-linking von Proteinen der DNA und die Anwesenheit von Formalin-induzierten Proteinkomplexen erklärt u.a. die Notwendigkeit einer verlängerten Digestionszeit mit Proteinase K für einige Tage, sowie die höhere Qualität der Extraktion bei kürzerer Fixationszeit. Gegenüber anderen Proteinasen bearbeitet die Proteinase K das fixierte Material schneller und führt zu einem höheren DNA-Gehalt. Sie ist relativ stabil bei einer mittleren Temperatur von $50-60^{\circ}\text{C}$, was kürzerer Digestionszeiten ermöglicht. Die Menge reiner DNA ist, je nach dem Grad der Degradation, aus fixiertem Gewebe in der Regel geringer als aus frischem oder gefrorenem Material. Hierdurch sind die PCR technischen Grenzen gesetzt (62).

3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction (PCR))

Die von Kary Mullis 1985 vorgestellte Polymerase-Ketten-Reaktion, erfuhr seitdem durch Entwicklung und Erweiterung zunehmend an Bedeutung. Die zuerst verfügbaren, hitzelabilen Enzyme, wie das Klenow-Fragment der E.coli-DNA-Polymerase I, wurden durch hitzestabile Polymerasen ersetzt. Eine der heute genutzten Polymerasen ist die DNA-Polymerase des Organismus *Thermus aquaticus*, Taq-Polymerase, welche initial aus heißen Quellen des Yellowstone Nationalparks isoliert wurde. Die Amplifikation unbegrenzter Gensegmente und die zunehmend einfachere Bedienung von Thermocyclern ermöglichte in der Folge die klinische Anwendung einer solchen Mutationsanalyse.

Die PCR ermöglicht hierbei eine gezielte Vervielfältigung kurzer DNA-Abschnitte. Die notwendige Starthilfe bieten Oligonukleotidprimer, kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die den Enden der definierten Ziel-Sequenz der DNA-Matrize komplementär

sind. Die DNA-Polymerase verlängert dann, in Gegenwart von Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs), die Primer entlang der einzelsträngigen, denaturiert vorliegenden DNA-Matrize in 5´ - 3´Richtung, mit ca. 35-100 Nukleotiden pro Sekunde und synthetisiert so neue, der Matrize komplementäre, DNA-Moleküle. Zur erneuten Synthese wird die doppelsträngige DNA wiederholt durch Hitze aufgeschmolzen durch die thermostabile Polymerase repliziert, separiert in Einzelstränge und nach Abkühlung wieder von den Primern gebunden. Unter optimalen Reaktionsbedingungen steigt damit bei jedem neuen Zyklus die Konzentration der zu vervielfältigenden Ziel-Sequenz an. Bereits ab dem dritten Zyklus entstehen Produkte der gesuchten Länge. Kurze Ziel-Sequenzen, die durch die Primer eingeschlossen sind, vermehren sich ab dem vierten Zyklus exponentiell, lange Produkte, mit einem Ende ohne Primer, werden hingegen linear vervielfältigt. Bei 100prozentiger Ausbeute in jedem Zyklus hat sich nach 20 Zyklen die DNA 2 hoch 20-fach vermehrt. Alle Kopien der DNA-Moleküle liegen zum Abschluss der Reaktion in Form von Doppelsträngen vor; ihre Anzahl lässt sich anhand folgender Formel bestimmen : $(2^n - 2n)$, wobei n die Anzahl der Vermehrungszyklen ist, 2n die Produkte des ersten und zweiten Zyklus, deren Länge nicht definiert ist (63).

Besondere Möglichkeiten bietet die PCR durch hohe Spezifität und Sensitivität. Mit Einsatz geringster Mengen an Ziel-DNA aus komplexen Mischungen genomischer Sequenzen einzelner Zellen oder einzelner Kopien von Genen mit einer Größe von 50-10000bp ist es möglich, in praktisch unlimitierter Menge DNA-Fragmente zu amplifizieren. Für weitere Anwendungen konnte daher an Material(Schnitte) bzw. DNA gespart werden.

Die Sensitivität der Methode stellt nicht nur die Kraft, sondern auch die Schwäche der PCR dar. Sowohl falsch-negative bzw. falsch-positive Resultate durch Kontamination und die Vollständigkeit der Zielsequenz, in Abhängigkeit von der Degradation, müssen ausgeschlossen werden. Ferner nimmt die Vermehrung der Amplifikationsprodukte in der Praxis nicht beliebig lange in exponentieller Weise zu, da im Verlaufe jedes Zyklus mehrere Faktoren eine 100%ige Ausbeute verhindern, ein Effekt, der sich in späteren Zyklen noch verstärkt. Auch ist die Ausbeute durch die Menge und Aktivität des Enzyms, der Polymerase, begrenzt, nicht zuletzt da Hitze das Enzym im Laufe der Reaktionen denaturiert. Die zunehmende Konzentration der gebildeten Stränge

vermindert u.a. durch deren Hybridisierung untereinander, die Effektivität der PCR Amplifikation durch Konkurrenz bei der Anlagerung der Primer. Weiterhin bewirken lange Fixationszeiten des verwendeten Materials eine weniger effiziente PCR.

Für die Wirksamkeit von Hemmstoffen und Beschleunigern der PCR gibt es bis jetzt wenig garantierte Nachweise. Viele unbekannte Hemmstoffe befinden sich in biologischen Material. Die Proteinase K z.B., welche bei der Extraktion der DNA eingesetzt wird, baut denaturierte Proteine ab. Da die Taq-Polymerase gegen solche Proteasen empfindlich ist, muss die Proteinase K durch Denaturierung bei 95°C aus dem PCR Ansatz entfernt werden.

Erfahrungsgemäß können durch die unten beschriebene Optimierung (siehe Ergebnisse), nötige Modifikationen der PCR vorgenommen werden und Störfaktoren reduziert werden (62).

3.2.2 Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP) - Methode

Die Methode der SSCP-Elektrophorese bei bekannter DNA-Sequenz ist zum Routinescreening geeignet und stellt ein praktisches Verfahren zum Screening möglicher Mutationen dar. Die Anwendung zeigt sich besonders nützlich beim Vergleich unbekanntes Patientenmaterials mit bekanntem Standard-Wildtyp als positive Kontrolle. Vorteile liegen in der Schnelligkeit, der einfachen Handhabung und der Möglichkeit, mehrere Proben zur gleichen Zeit untersuchen zu können.

Die Methode der SSCP basiert auf der Beobachtung, dass die Mobilität des DNA-Einzelstranges in nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen sehr sensitiv gegenüber der primären Struktur bzw. Sequenz reagiert. Während doppelsträngige DNA im elektrischen Feld v.a. in Abhängigkeit ihrer Größe (in bp) wandert, bilden Einzelstränge aufgrund der Basensequenz unterschiedliche räumliche Anordnungen, die Konformation, welche für ein charakteristisches Bandenmuster verantwortlich ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit haben daher selbst leichte Änderungen der DNA-Sequenz große Auswirkung auf die Konformation der Einzelstränge. Diese Beobachtungen sind empirischer Natur, eine eindeutige Theorie für die Beweglichkeit, basierend auf der Konformation oder deren Änderung gibt es bisher nicht.

Da die Einzelstrang-Konformation unter nicht-denaturierenden Bedingungen nur von der Zusammensetzung der Sequenz abhängig ist, ergeben sich unterschiedliche oder

abweichende Konformationen bei nur einem einzigen Basenaustausch. Die meisten Konformations-Veränderungen scheinen die physikalische Konfiguration oder die Größe ausreichend zu beeinflussen, dass, trotz gleicher Ladung der varianten Sequenz, das Verhältnis der Konfiguration-zur-Ladung bzw. der Größe-zur-Ladung in genügendem Maße unterschiedlich ist, um als Mobilitäts-Differenz in der Elektrophorese durch eine verzögernde Matrix, wie der des Polyacrylamidgels, sichtbar werden zu lassen.

Mit der SSCP Analyse kann der größte Teil an Variationen von Einzelsträngen identifiziert werden. Typischerweise liegt die Länge der eingesetzten Einzelstränge zwischen 150 und 250 Nukleotiden, wodurch 70-90% an Basensubstitutionen entdeckt werden. Längere Stränge entwickeln in geringerem Ausmaß Konformationsänderungen durch einzelne Basenaustausche, während kürzere weniger komplexe Konformationen annehmen. In beiden Fälle besteht die Gefahr, dass Veränderungen nicht sichtbar werden. Heteroduplexe Banden werden als Nebenprodukte gefunden und können in die Analyse miteinbezogen werden. Eine zusätzliche Sequenzierung der DNA kann nach diesem Suchtest in der Folge durchgeführt werden, um zu bestimmen, ob abweichenden Bandenmustern Mutationen oder andere Veränderungen, wie z.B. Polymorphismen zu Grunde liegen.

Limitationen der SSCP-Methode bestehen u.a. in der Bewertung der Laufgeschwindigkeiten der Einzelstränge. Diese geben lediglich Auskunft über den Quotienten aus Ladung und Molekulargröße der DNA-Fragmente und variieren durch deren räumliche Anordnung. Unterschiedliche DNA-Fragmente mit verschiedenen Sequenzen und Längen können u.U. in einer nativen Elektrophorese gleiche Laufgeschwindigkeiten aufweisen. Aus diesem Grund läßt sich aus der Laufgeschwindigkeit keine direkten Sequenzinformation ableiten, was eine Sequenzierung wünschenswert macht. Daher sollte zuvor mittels sequenzdefinierter Mutanten, sowie des Wildtyps geklärt werden, ob sich alle Mutationen darstellen lassen und welches Bandenmuster sie haben.

3.2.3 Immunhistochemische Methode

Um Struktur, Organisation, Entwicklung und Differenzierung von tumorösem Gewebe darzustellen, kann die Verteilung von Antigenen in situ bestimmt werden. Mit immunhistochemischen Techniken lassen sich spezifische Interaktionen von

Antikörpern mit Antigenen, die Verteilung von Antigenen in Zellen bzw. Geweben lokalisieren.

Die hier verwendete Avidin-Biotin-Methode gehört zu den Immunperoxidase-Färbemethoden. Sie basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Hierzu werden drei Reagenzien benötigt: 1) ein Primärantikörper, spezifisch für das zu bestimmende Antigen, 2) ein Sekundärantikörper, welcher mit Biotin konjugiert ist und den ersten bindet, 3) ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Das Enzym Peroxidase wird mit Chromogenen sichtbar gemacht; aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin erhält man eine hochspezifische Verstärkung der Färbung und gute Ergebnisse aus fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material.

Da Antigen-Antikörper-Reaktionen eine hohe Spezifität aufweisen, sind immunhistochemische Techniken präziser als gewöhnliche histochemische. Die Reaktion führt zu Immunkomplexen, die als Präzipitate dargestellt werden können. Antikörper, die bei immunhistochemischen Färbungen eingesetzt werden, sind vorwiegend vom IgG Typ, mit schweren Ketten vom Typ γ , und zwei leichten Ketten vom Typ Kappa κ oder Lambda λ ; das von Leicht- und Schwereketten gebildete Fab-Fragment trägt die Antigenerkennungsregion und ist für die spezifische Antigenbindung verantwortlich.

Antikörper werden mit einem Fluoreszenz- oder Enzym-Marker konjugiert, deren intensives Signal bei der Auswertung der Schnitte unter dem Mikroskop eine Visualisierung ermöglicht. Ein Vorteil von Enzym-Markierungen der sekundären Antikörper, z.B. Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-HRP) ist, dass gewöhnliche Durchlicht-Mikroskope gebraucht werden können und chemische Gegenfärbungen, wie der Zellkerne mit Haematoxylin, die Darstellung der Morphologie unterstützen können. Vorteilhaft ist auch die kleine Größe der Peroxidase, so dass die Bindung vom Antikörper an benachbarte Stellen nicht behindert wird. Sie ist in hochgereinigter Form erhältlich, was die Kontaminationsgefahr und unspezifische Farbreaktionen verringert. Sie ist stabil und bleibt während Herstellung, Aufbewahrung und Anwendung weitgehend unverändert. Dazu gibt es eine Vielzahl von Chromogenen, die mit der Peroxidase Farbprodukte bilden, welche dann an der Stelle des zu lokalisierenden Antigens präzipitieren und es hierdurch visualisieren.

Bei allen immunhistochemischen Verfahren sind positive und negative Kontroll-Antikörper zum Vergleich mit dem Test-Antikörper erforderlich. Werden unbekannte Proben mit Primärantikörpern angefärbt, werden folgende Kontrollen angewendet: Positiv-Kontrolle ist eine bekannte, identisch vorbehandelte Probe, die das gesuchte Antigen enthält und v.a. im unteren positiven Bereich die Sensitivität der Methode zeigt. Negativ-Kontrolle ist eine bekannte, identisch vorbehandelte Probe, die das gesuchte Antigen nicht enthält. Eine unbekannte Probe, die nur mit Verdünnungspuffer bearbeitet wird bzw. mit nichtbindenden, Isotyp-gleichen Kontrollantikörpern bzw. nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurde, dient als Leerpräparat, um positive Ergebnisse von unspezifischen Proteinbindungen, endogenen Peroxidaseaktivitäten oder anderen unerwünschten Epiphänomenen zu unterscheiden.

3.2.4 Interpretation der Immunhistochemie

In der immunhistochemischen Auswertung werden der Vergleich unspezifischer und spezifischer Reaktionen sowie Färbeintensitäten unbekannter Proben und Kontrollen interpretiert. Färbereigenschaften werden nach der Menge des präzipitierten Chromogens, welches zur Menge des Antigens proportional ist, sowie nach zytoplasmatischer und nukleärer Markierung charakterisiert. Da nicht alle Zellen gleiche Mengen an Antigenen enthalten, ergeben sich unterschiedliche Intensitäten innerhalb einer Probe. Fehlende Unterscheide in der Intensität können daher auf unspezifische Färbungen hinweisen. Spezifische Färbungen sind auf die Zellen beschränkt, unspezifische finden sich z.B. häufig in Collagen und Bindegewebsmatrix.

Interpretationsfehler lassen sich in vier Kategorien einteilen. Unspezifische Farbstoff-Präzipitate können mit einer positiver Anfärbung des Antigens verwechselt werden, sind aber im Gegensatz zu diesen nicht auf Zellen beschränkt. Es handelt sich dabei um nicht reagierende Chromogenpartikel oder auch Pigmente der Gegenfärbung. Ferner gibt es Gewebsartefakte, welche beim Schneiden der Schnitte entstehen, und Zellartefakte, welche positive Anfärbungen von nekrotischen, zerquetschten, autolytischen Zellen und hämorrhagischem Gewebe darstellen. Zuletzt können (spezifische) Hintergrundfärbungen, z.B. bei blutigem, ungewaschenem Gewebe mit viel Serum im interstitiellen Gewebe, auftreten. Das gesuchte Antigen liegt dabei in hoher Konzentration im Serum vor und stellt als intensive Hintergrundfärbung eine

spezifische, jedoch unerwünschte Färbung des Antigen im Serum dar. Diese kann das in Zellen gesuchte Antigen verdecken.

Ursächlich für mangelnden oder fehlenden Nachweis von anzufärbenden Proteinen können Nonsense-Mutationen, Spleiß-Varianten oder Stop-Kodons sowie unterschiedliche Antikörper und nicht zuletzt auch differierende Interpretationskriterien sein (3).

3.3 Spezielle Darstellung der Methoden-Protokolle

3.3.1 Deparaffinierung der Tumorproben

Aus 30 µm in Paraffin eingebetteten Schnitten wurde DNA entsprechend standardisierter Techniken vor Extraktion durch zweimalige Deparaffinierung gesäubert: durch Zugabe von 1ml Octan und, nach Zentrifugation in einer Tischzentrifuge und Resuspension in 0.5ml 96% Ethanol, wird das Paraffin aus der Gewebeprobe herausgelöst.

3.3.2 DNA-Extraktion der Patienten-Proben und Zelllinien

DNA wurde mit dem Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Firma Invitek GmbH, Berlin-Buch, Deutschland) wie folgt extrahiert. Das Ausgangsmaterial wurde in 400 µl Lyse-Puffer und 40 µl Proteinase K-Lösung bei einer Inkubationstemperatur von 52°C unter kontinuierlichem Schütteln (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) über Nacht lysiert, unlysierte Bestandteile mittels Zentrifugation (Tischzentrifuge, Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg) entfernt. Nach Zugabe von 200 µl Bindungs-Puffer (Invitek, Berlin) wurde die DNA an einer Minisäule gebunden, nach Zentrifugation und Waschen mit 500 µl Wasch-Puffer mit 100 µl, auf 52°C erwärmten, Elutions-Puffer (Invitek, Berlin) verdünnt und anschließend in 10 mM Tris HCL/0, 1 mM EDTA Puffer pH 8.0 bei -20°C zur DNA-Analyse aufbewahrt.

3.3.3 Protokoll des Hybridisierungs-Assays für K-ras

Die Mutationsanalyse wurde mit dem K-ras-Genotyping System (Invitek, Berlin) für Punktmutationen im Kodon 12 und 13 des Onkogens K-ras durchgeführt. Nach der ersten PCR im Thermocycler (Gene Amp, PCR System 9700, PE Applied Biosystems) wurden die gewonnenen Produkte einer Restriktionsreaktion unterzogen, um Wildtyp ras zu zerstören und in der folgenden zweiten PCR selektiv amplifiziert. Die Amplifikate wurden einem Hybridisierungs-Test im Mikrotiter-96-Lochplatten Format zugeführt, in welchem im PCR Amplifikat durch Nachweis mittels biotinylierter, für mutiertes ras Sequenz-spezifischer Oligonukleotide gefolgt von Streptavidin-Peroxidase-Komplexen und Farbreaktion mittels standardisierter Absorbionsmessung Mutationen aufgedeckt wurden. Die im Test ermittelten Extinktionen wurden mit der Spezialsoftware DiGeM für Codon 12 bzw. 13- Mutationen analysiert.

Die Probenamplifikation mittels der 1. PCR erfolgte in einem standardisierten Ansatz mit den Komponenten Buffermix I, Primermix I, Solution, Taq Polymerase (10 units/ μ l) und ddH₂O. Der Thermocycler wurde wie folgt programmiert: Initialdenaturierung bei 94 °C für 5 min., 25 Zyklen bei 94 °C für 30 sec., 54 °C für 30 sec., 72 °C für 20 sec. und Extension bei 72 °C für 1 min. Der Ansatz für die Restriktionsreaktion enthielt die Komponenten Restriction Buffer, Restriction Enzyme und ddH₂O. Die selektive Amplifikation mittels der 2. PCR erfolgte mit den Komponenten Buffermix II, Primermix II, Solution, Taq Polymerase (10 units/ μ l) und ddH₂O. Der Thermocycler wurde wie folgt programmiert: Initialdenaturierung bei 94 °C für 5 min., 25 Zyklen bei 94 °C für 30 sec., 54 °C für 30 sec., 72 °C für 20 sec. und Extension bei 72 °C für 1 min. Es erfolgte eine Kontrolle der Amplifikation auf Agarosegel.

Für den Hybridisierungs-Test wurden die Amplifikate aus der 2. PCR durch Zugabe von Dilution Solution verdünnt. Eine Mikrotiterplatte wurde mit externen Standardproben sowie der Proben- und Kontroll-Amplifikate beladen. Durch Zugabe von Denaturations Puffer wurde denaturiert und anschließend mit Verdünnungslösung gewaschen. Für die Hybridisierungsreaktion wurden die auf 42°C vorgewärmten Hybridisierungs sonden zugegeben. Dann wurde mit Waschpuffer gewaschen, mit Equilibrations Puffer äquilibriert und für die Nachweisreaktion die Verdünnungslösung zugegeben. Nach erneutem Waschen wurde die Farbreaktion durch Zugabe von Substrat eingeleitet und dann abgestoppt. Die Absorbionsmessung wurde in einem Mikrotiterplatten-Photometer (SLT-Systems, Salzburg) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm durchgeführt.

Die Interpretation der Messdaten erfolgte in zwei Schritten. Erstens wurden die Ergebnisse der externen und internen Kontrollproben begutachtet und zweitens die Resultate der Untersuchungsproben geprüft. Als externe Kontrolle diente eine Standardkurve mit mutiertem Ras-Amplifikat, deren Ergebnisse den Erfolg des DNA-Hybridisierungs-Assays anzeigen. Anhand der internen Kontrollprobe wurde geprüft, ob die Schritte der Probenamplifikation und der Restriktionsreaktion fehlerfrei verlaufen waren. Sie enthielt DNA aus einem Zellgemisch des homozygoten Wildtyps mit der heterozygoten Mutante im Verhältnis 2000/1. Die Negativkontrollen gaben Auskunft über Probenverschleppung während der Nukleinsäurepräparation oder der Amplifikationsreaktionen. Mögliche Fehlerquellen wurden beachtet, wie eine ungültige

Eichkurve bei falschen zur Messung verwendeten Wellenlängen, eine ungültige Standardkurve bei falsch aufgetragenen Standardverdünnungen, auffallend viele Mutationen durch Probenverschleppung während der DNA-Präparation oder der PCR, auffallend wenige Mutationen bei mangelnder Mutationsanreicherung.

3.3.4 PCR-Protokoll für das p53 Gen

Exon 5 bis 8 des p53 Gens wurden mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

Die Exon 5 – 8 betragen (in bp) : Exon 5 = 184, Exon 6 = 113, Exon 7 = 109, Exon 8 = 137.

Das Exon 5 von p53 wurde aufgrund seiner Gesamtlänge von 184 bp in zwei Anteile, 5a und 5b, geteilt und getrennt amplifiziert.

Die Amplifikationsprodukte der Exons 5 – 8 umfassen (in bp) : Exon 5a = 139, Exon 5b = 191, Exon 6 = 163, Exon 7 = 190, Exon 8 = 199.

Die Sequenzen der Oligonukleotidprimer für die PCR-Amplifikation sind wie folgt unten aufgelistet (sense und antisense):

Exon 5a : CCA GTT GCT TTA TCT GTT CA und TGT GGA ATC AAC CCA CAG ;

Exon 5b : CAA CTG GCC AAG ACC TGC und AAC CAG CCC TGT CGT CTC T ;

Exon 6 : CTC TGA TTC CTC ACT GAT TGC und GAG ACC CCA GTT GCA AAC CA ;

Exon 7 : TTG CCA CAG GTC TCC CCA A und AGG GTG GCA AGT GGC TCC ;

Exon 8 : CCT TAC TGC CTC TTG CTT C und CGC TTC TTG TCC TGC TTG C;

Der Reaktionsansatz enthält:

2-4 µl DNA;

0,5 µl je sense und antisense Primer (50 pmol/µl);

12,5 mmol je dNTP, verdünnt mit Aqua dest. in einem Gesamtvolumen von 100 µl : eingesetzt wurden 0,4 µl für Exon 5a, 5b, 6 und 7; 0,8 µl für Exon 8;

1 µl MgCl₂ (50 mM) für Exon 6 und 7, 2µl MgCl₂ für Exon 5a, 5b und 8;

5 µl Reaktion-Puffer ((NH₄)₂SO₄) (16 mM);

1,5 U der Taq-Polymerase, entspricht 0,5 µl (InViTAQ, InViTek);

Die Komponenten wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit Aqua dest. verdünnt;

Für die PCR Reaktion wurde ein Thermocycler (Gene Amp, PCR System 9700, PE Applied Biosystems) anhand des folgenden Protokolls programmiert:

Erhitzen auf 94 °C für 4 min, gefolgt von 35 Zyklen bei 94 °C für 1 min, Annealing-Temperatur (siehe unten) der jeweiligen Primer für 30 sec, 72 °C für 1 min; 72 °C für 7 min; Abkühlung auf 12 °C;

Die Annealing-Temperaturen für Exon 5 – 8 betragen: Exon 5a = 52 °C, Exon 5b = 65 °C, Exon 6 = 58 °C, Exon 7 = 58 °C, Exon 8 = 58 °C;

3.3.5 Agarosegel-Nachweis

Nach der PCR wurde ein Nachweis der amplifizierten DNA unter Prüfung negativer und positiver Kontrollen mittels Agarosegelen durchgeführt.

Je 10 µl der DNA-Produkte wurde unter Zugabe von 2 µl Sigma-Ladungspuffer (6×) in 12%igen TAE-Agarosegelen (Agarose (SeaKem) 1×TAE Tri-Acetate-EDTA)-Puffer : 50×TAE verdünnt mit A. bidest : 242 g Tris-Base (Aminomethan), 57.1 ml Eisessig, 100 ml 0.5M EDTA (pH 8.0), 1000 ml A. bidest) aufgetragen und bei 120V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde 1 µl Ethidiumbromid (Roth), welches nach Interkalierung die DNA der PCR Produkte unter UV-Beleuchtung sichtbar werden lässt.

3.3.6 Protokoll der SSCP-Methode für p53

SSCP-Analysen wurden bei dem Patienten-Kollektiv der Plattenepithelkarzinome des Ösophagus für das p53 Gen durchgeführt.

5-12 µl der PCR-Produkte wurde in 6 µl DNA Ladungspuffer verdünnt (82% Formamid, 10 mmol/l NaOH, 50 mmol/ EDTA, Bromphenol Blau, Xylen Xyanol Farbstoff).

Die Proben wurden bei 95 °C für 5 min denaturiert, dann im Eisbad für 3 min abgekühlt, um eine erneute Zusammenlagerung der Einzelstränge zu verhindern. Im Anschluss wurden die Proben auf ein 10%iges nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel (11 ml A. bidest, 4 ml 5×TBE (1×TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer : 5×TBE verdünnt 1: 5 mit 1000 ml A. bidest : 54 g Tris-Base, 27.5 g Borsäure, 20 ml 0.5M EDTA (pH 8.0), 1000 ml A. bidest), 5 ml 40%-iges Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)-Stammlösung, 125µl APS 10%-ig (Ammoniumpersulfat), 25 µl TEMED) aufgetragen und anschließend bei 300 V für 30 min, 900 V für 10-100 min und 50 mA bei 22 °C in einer Multiphor-Elektrophorese-

Kammer (Pharmacia, Freiburg) in SSCP-Ladungspuffer (9 ml Formamid, 20 µl 5 NaOH (pH 8.0), 200 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0), 1 ml Farbstofflösung (0.5% Bromphenolblau, 0.5% Xylen Xyanol Farbstoff) elektro-phoriert.

DNA der Zelllinie LoVo diente als Wildtyp Kontrolle für p53 Mutationen. Je eine Wildtyp Probe wurde wie die untersuchten Proben denaturiert, eine zweite Wildtyp Probe diente der Kontrolle doppelsträngiger DNA.

Die Exons 5 - 8 des p53 Gens wurden bei einer Lauftemperatur von 22 °C aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde eine Silberfärbung der Gele mit dem DNA Silberfärbekit (Pharmacia Biotech) durchgeführt.

3.3.7 Protokoll der Immunhistochemie von p53

Alle Schritte der Färbung wurden ohne Unterbrechung durchgeführt und ein Austrocknen der Schnitte vermieden. Nach Entparaffinierung mit Xylol für mind. 20 min und Alkoholbad in absteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte in Aqua bidest. und 1x TBS (Tris buffered saline: 10 X TBS 1:10 verdünnt mit A. bidest : 9 g Tris-Base (Aminomethan), 68,5 g Tris-HCL, 87,8 g NaCl, 1000 ml A. bidest, pH 7,4-7,6) rehydriert. Dann wurden sie in 1x Citratpuffer (pH 6), 9 ml einer Stammlösung A, 0.1 M Zitronensäure (21.01 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ in 1000 ml A. bidest), 41 ml einer Stammlösung B, 0.1 M Natriumcitrat (29.41 g $C_6H_5Na_3 \cdot 2 H_2O$ in 1000 ml A. bidest) und 450 ml A. bidest) gekocht und in Aqua bidest. und 1 x TBS vor und zwischen den anschließenden Inkubations-Intervallen gewaschen.

Die Inkubation wurde wie folgt durchgeführt: 1) die Schnitte wurden mit dem, in TBS verdünntem, primären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert; zur Immunlokalisation des p53 Protein wurde der monoklonale primäre Antikörper Anti-human p53 (Klon DO-7, kappa, (Verdünnung 1:75) Dako A/S, Glostrup, Denmark) verwendet; anschließend erfolgte ein Waschschrift von 3x2 min mit TBS; 2) Inkubation mit biotinyliertem sekundärem Ziege-anti-Maus-Antikörper (Dianova) verdünnt im Verhältnis 1:250 in TBS, für 30 min. bei Raumtemperatur; anschließender Waschschrift von 3x2 min mit TBS; 3) Streptavidin-Peroxidase (Dianova, Hamburg) verdünnt im Verhältnis 1:500 in TBS, für 30 min. bei Raumtemperatur; anschließender Waschschrift von 3x2min mit TBS. Darauf folgte eine Färbung mit DAB (Pierce), für 5-10 min, und Hämatoxylin nach Meyer (1 g Hämatoxylin (Merck, Darmstadt), 0.2 g Kaliumjodat

(Merck), 50 g Kalialaun (Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat, Merck), 1000 ml A. bidest, 50 g Chloralhydrat (Merck), 1 g krist. Zitronensäure (Merck) für 15 sec sowie eine aufsteigende Alkoholreihe mit Paraclear (Quartett, USA) und das Eindecken in ClariOn (Natutec, Frankfurt/Main).

Die Interpretation der immunhistochemisch gefärbten Schnitte zum Nachweis der p53 Proteinexpression wurde blind von zwei Untersuchern ohne Kenntnis der klinisch-pathologischen Daten durchgeführt. In vier hoch aufgelösten Feldern ($\times 400$) wurde der Prozentsatz positiv gefärbter Tumorzellen (0 % bis 100 %) und die Färbeintensität (0 bis 3-fach positiv) unter dem Mikroskop evaluiert. Für die weitere Analyse wurde der Prozentsatz positiver Tumorzellen und der sogenannte p53 Färbe-Index benutzt, welcher als das Produkt an positive gefärbten Zellen und der Färbeintensität berechnet wurde. Eine Positiv-Kontrolle (Kolonkarzinom-Tumorprobe) zeigte eine angemessene Immunreaktivität für p53. Die Negativ-Kontrolle (Kolonkarzinom-Tumorprobe) zeigte hingegen keine Immunofärbung.

Für die statistische Auswertung der immunhistochemischen Färbung von p53 Protein wurde ein Grenzwert bei 10% positiver Zellen in Analogie zu früheren Untersuchungen an anderen Tumorkollektiven definiert (90). D.h. Karzinome mit $>10\%$ gefärbten Zellen wurden mit „hoher Expression“ bzw. „positiv“ bezeichnet und Karzinome mit $\leq 10\%$ gefärbten Zellen mit „niedriger Expression“ bzw. „negativ“ bezeichnet.

3.3.8 Geräte, Zubehör und Reagentien

3.3.8.1 Geräte und Zubehör

Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Thermocycler, Gene Amp, PCR System 9700	PE Applied Biosystems
Multiphor Elektrophorese Kammer, Biometra, Agagel Midi-Wide	Pharmacia, Freiburg, D
Agarose Elektrophoresezubehör, Zubehör	BioRad, München, D
Lichtmikroskop BX50	Olympus, Hamburg, D
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Perkin-Elmer, Weiterstadt, D
Pipetten 10,100,200,1000 μ l	Merck, Darmstadt, D
Pipettenspitzen	Merck, Darmstadt, D
Vortexer	Merck, Darmstadt, D

3.3.8.2 Reagentien

- DNA-Extraktion:
- Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Invitex, Germany)
 - 0.5M EDTA Lösung: 146.125g EDTA, 800ml + 1000ml A. bidest, pH 8.0;
- Hybridisierungs Assay für K-ras:
- K-ras-Genotyping System (Invitex, Germany);
- PCR für p53:
- Tag-Polymerase, entspricht 0,5µl (InViTAQ, InViTek);
- Agarosegel:
- 1×TAE Tri-Acetat-EDTA)-Puffer : 50×TAE verdünnt mit A. bidest : 242g Tris-Base (Aminomethan), 57.1ml Eisessig, 100ml 0.5M EDTA (pH 8.0), 1000ml A. bidest;
- SSCP:
- 1×TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer : 5×TBE verdünnt 1: 5 mit 1000ml A. bidest : 54g Tris-Base, 27.5g Borsäure, 20ml 0.5M EDTA (pH 8.0), 1000ml A. bidest;
 - 10% Polyacrylamidgel : 11ml A. bidest, 4ml 5×TBE, 5ml 40% iges Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)-Stammlösung, 125µl APS 10% ig (Ammoniumpersulfat), 25µl TEMED;
 - SSCP-Ladungspuffer : 9ml Formamid, 20µl 5NaOH (pH 8.0), 200µl 0.5M EDTA (pH 8.0), 1ml Farbstofflösung (0.5% Bromphenolblau, 0.5% Xylenblau, Sigma B 3269);
 - Silberfärbung;
- Immunhistochemie:
- Monoklonaler primärer Antikörper Anti-human p53 (Klon Do-7, kappa, (Verdünnung 1:75) Dako A/S, Denmark);
 - 1× TBS (Tris buffered saline) : 10XTBS 1:10 verdünnt mit A. bidest : 9g Tris-Base(Aminomethan), 68,5g Tris-HCL, 87,8g NaCl, 1000ml A. bidest, pH 7,4-7,6;
 - 1× Citratpuffer (pH 6) : 9ml einer Stammlösung A, 0.1M Zitronensäure (21.01g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ in 1000ml A. bidest), 41ml einer Stammlösung B, 0.1M Natriumcitrat (29.41g $C_6H_5Na_3 \cdot 2 H_2O$ in 1000ml A. bidest) und 450ml A. bidest;
 - Hämatoxyloin nach Meyer : 1g Hämatoxylin (Merck 1.04302.0025, 25g), 0.2g Kaliumjodat (Merck 1.05051.0100, 100g), 50g Kalialaun (Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat, Merck 1.10047.1000. 1000g), 1000ml A. bidest, 50g Chloralhydrat (Merck 1.59121.0025, 25g), 1g krist. Zitronensäure;

4. Ergebnisse der Analyse des Patienten-Kollektivs mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

4.1 Patientenkollektiv und Follow-up

Es wurden 68 Patienten analysiert, die mit kurativ intendierter Resektion von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus behandelt wurden. Daten zu Alter, Geschlecht, Stadium und Grading sind in Tab.8 aufgeführt.

Das Kollektiv umfasst 52 (76,5%) Männer und 16 (23,5%) Frauen, im Alter von 37 - 84 Jahren (Mittelwert $56,82 \pm 9,01$) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Nach der UICC-Klassifikation waren zwei (2,9%) Karzinome in Stadium I, 15 (22,1%) in Stadium II, 35 (51,5%) in Stadium III und 16 (23,5%) in Stadium IV. Nach der AJCC-Klassifikation waren drei (4,4%) Karzinome in Stadium I, 23 (33,8%) in Stadium II, 27 (39,7%) in Stadium III und 15 (22,1%) in Stadium IV. Nach dem TNM-Stadium wurden sechs (8,8%) Karzinome dem T-Stadium T1, 15 (22,1%) T2, 37 (54,4%) T3 und 10 (14,7%) T4 zugeordnet. Der Lymphknotenstatus war bei 21 (30,9%) Karzinomen N0, bei 36 (52,9%) N1 und bei 10 (14,7%) N2. In einem (1,5%) Fall fehlte das N-Stadium. Fernmetastasen wurden bei 53 (77,9%) Karzinomen nicht nachgewiesen, die somit im M0 Stadium klassifiziert werden. Bei 15 (22,1%) wurde das Stadium M1 bewertet. Das Grading war bei zwei (2,9%) Karzinomen G1, bei 28 (41,2%) G2 und bei 35 (51,5%) G3. In drei (4,4%) Fällen fehlten Angaben zum Grading. Am Ende der follow-up Periode von maximal 201 Monaten (16,75 Jahren) waren noch drei (3/68: 4,4%) der Patienten am Leben. Die mediane Gesamt-Überlebenszeit war 14 Monate für das gesamte Kollektiv (Spannweite 1 – 201 Monate, Mittelwert $23,76 \pm 32,39$). Die 1-, 2- bzw. 5-Jahres Überlebensraten waren 72,1%, 19,1%, bzw. 8,8%. Todesfälle mit unbekannter bzw. nicht Tumor-assoziiertes Todesursache wurden zensiert (26 Patienten). Daten zur Technik und Art des operativen Verfahrens standen nicht zur Verfügung. Die Schnitte und histopathologischen Berichte der Patienten-Proben wurden geprüft, um das klinisch-pathologische Grading und Staging zu bestätigen.

Tab. 8: Klinisch-pathologische Parameter des Patienten-Kollektivs

Anzahl der Patienten

Gesamt n = 68

Männer/Frauen 53/16

Alter (in Jahren)

Mittelwert 56,82 ± 9,01

Spannweite 37 - 84

T-Stadium

T1 6 (8,8%)

T2 15 (22,1%)

T3 37 (54,4%)

T4 10 (14,7%)

N-Stadium

N0 21 (30,9%)

N1 36 (52,9%)

N2 10 (14,7%)

Fehlend 1 (1,5%)

M-Stadium

M0 53 (77,9%)

M1 15 (22,1%)

Grading

G1 2 (2,9%)

G2 28 (41,2%)

G3 35 (51,5%)

Fehlend 3 (4,4%)

UICC-Klassifikation

1 2 (2,9%)

2 15 (22,1%)

3 35 (51,5%)

4 16 (23,5%)

AJCC-Klassifikation

1 3 (4,4%)

2 23 (33,8%)

3 27 (39,7%)

4 15 (22,1%)

4.2 Mutationsanalyse von K-ras

Reine DNA konnte aus allen Tumor-Proben mittels Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Invitex, Germany) in ausreichender Menge für die Mutationsanalysen von K-ras und p53 extrahiert werden. Die Mutationsanalyse von K-ras erfolgte mittels PCR (Polymerase-chain-reaction) und Festphasen-Hybridisierung mit Mutations-spezifischen Oligonukleotiden. Im Ergebnis zeigte sich bei allen 68 untersuchten Tumor-Proben eine zufriedenstellende Amplifikation, die durch anschließende Restriktion und Reamplifikation mutierter Allele auf mutierte K-ras Sequenzen fokussiert wurden. Die Auswertung erfolgte mit standardisierter Software der Firma Invitex, Berlin, Germany. Im Rahmen dieser Studie wurden im Kollektiv der Plattenepithelkarzinome des Ösophagus drei Mutationen (3/68: 4,4%) der Aspartat-kodierenden Sequenzen des Kodons 12 nachgewiesen. Es wurden keine Mutationen im Kodon 13 nachgewiesen.

4.3 Mutationsanalyse von p53

P53 Mutationen wurden in den Exons 5, 7 und 8 entdeckt. Es wurden keine Mutationen in Exon 6 nachgewiesen. Die Gesamtanzahl der im Tumor-Kollektiv detektierten p53 Mutationen war sieben (7/68: 10,3%). Im Einzelnen war die Verteilung in den Exons wie folgt: drei Mutationen in Exon 5 (3/68: 4.41%), drei Mutationen in Exon 7 (3/68: 4.41%), eine Mutation in Exon 8 (1/68: 1.48%). Tumore mit Mutationen in zwei oder mehr Exons wurden nicht beobachtet. Durch Auftragen der DNA-Produkte auf Agarosegele und Vergleich mit der Wildtyp (WT) Kontrolle LoVo wurde eine erfolgreiche PCR-Amplifikation nachgewiesen.

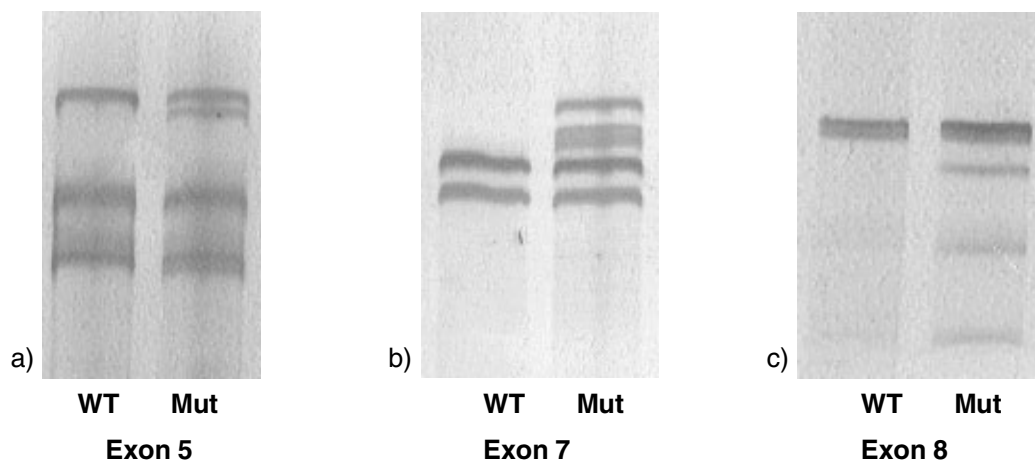


Abb. 4: SSCP-PCR von p53-Mutationen a) Exon 5, b) Exon 7, c) Exon 8 (Wildtyp (WT) versus Mutation)

4.4 Immunhistochemische Analyse von p53 Protein

Bei der immunhistochemischen Auswertung von p53 Protein zeigte sich sowohl zytoplasmatisches als auch nukleäres Expressionsmuster. In 37 (37/68: 54,4%) Karzinomen wurde dabei eine p53 Proteinexpression mit zytoplasmatischem und nukleärem Färbemuster nachgewiesen. 35 (35/68: 51,4%) von diesen waren ausschließlich nukleär, zwei (2/68: 3%) ausschließlich zytoplasmatisch gefärbt. Fünf Karzinome (5/68: 7,4%) zeigten eine p53 Expression in $\leq 10\%$ der Zellen und wurden als negativ klassifiziert. In 26 Karzinomen (26/68: 38,2%) zeigte sich keine Expression von p53.

Der mittlere Prozentsatz der zytoplasmatisch und nukleär p53-exprimierenden Zellen war $35,1\% \pm 19,36\%$ (range 1% bis 71%), der ausschließlich nukleären $33,85\% \pm 18,85\%$ (range 1% bis 71%) und der ausschließlich zytoplasmatischen $60\% \pm 14,14\%$ (50% und 70%).

Unter Einbeziehung der Färbeintensitäten ergab die Auswertung ein vergleichbares Ergebnis zum p53 Färbeindex (STI). 35 Karzinomen (35/68: 51,5%) hatten einen positiven STI, davon waren 33 (33/68: 48,5%) ausschließlich nukleär, zwei (2/68: 3%) ausschließlich zytoplasmatisch positiv. 33 Karzinome (33/68: 48,5%) hatten einen negativen STI.

4.5 Statistische Analyse von K-ras und p53

Für die statistische Auswertung wurden die Daten der 68 Patienten des Kollektivs von insgesamt 99 einbezogen. 31 Patienten waren zuvor aufgrund von drop outs (26 Patienten mit unbekanntem bzw. nicht Tumor-assoziierten Todesursachen) oder technischen Fehlern (fünf Patienten) aus der Analyse ausgeschlossen worden.

Zur statistischen Auswertung wurde das Statistik-Programm SPSS benutzt.

Es wurden getrennte Tests für die Prozentsätze an nukleär bzw. zytosolisch gefärbten Zellen durchgeführt. Auf eine Darstellung der Ergebnisse getrennt in nukleär bzw. zytosolisch gefärbter Zellen wurde jedoch aufgrund der geringen Fallzahl zytosolisch gefärbter Zellen verzichtet. Aufgeführt werden daher nur die Ergebnisse der gesamten, d.h. aller nukleär und zytosolisch, gefärbter Zellen. In allen Analysen ergab der Prozentsatz von gefärbten Zellen vergleichbare Ergebnisse zum Färbeindex (STI).

Orientierend wurden Box plots gerechnet und aufgrund der nicht normalen Verteilung der Messdaten, der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test gerechnet. Dabei wurden die folgenden biologischen und pathologischen Parameter in Beziehung zum p53 Färbeindex (STI = Färbeindex) nukleär bzw. nukleär und zytoplasmatisch gefärbter Zellen und zur p53 Expression nukleär gefärbter Zellen untersucht: T-Stadium (T1/T2 versus T3/T4), N-Stadium (N0 versus N1 versus N2), M-Stadium (M0 versus M1), Grading (G1 versus G2 versus G3), K-ras Mutation, Kodon 12 (Wildtyp (WT) versus Mutation), p53 Mutation (Wildtyp (WT) versus Mutation), UICC-Klassifikation (1/2 versus 3/4), AJCC-Klassifikation (1/2 versus 3/4).

Die Gesamt-Überlebenszeiten, beginnend vom Zeitpunkt der Operation, wurde mittels der Kaplan-Meier Methode geschätzt. Die Überlebenskurven wurden mit dem Log-Rang-Mantel-Cox-Test verglichen. Bekannte Todesursachen wurden entsprechend den Kaplan-Meier-Kriterien als unzensiertes Ereignis definiert, zum Zeitpunkt des Endes des Follow-Ups noch lebende Patienten wurden als zensiert definiert.

Die folgenden biologischen und pathologischen Variablen wurden als kategoriale Variablen für die Kaplan-Meier-Analyse benutzt: T-Stadium (T1/T2 versus T3/T4), N-Stadium (N0 versus N1 versus N2), M-Stadium (M0 versus M1), Grading (G1 versus G2 versus G3), K-ras Mutation, Kodon 12 (Wildtyp versus Mutation), p53 Mutation (Wildtyp versus Mutation), p53 Proteinexpression (\leq versus $>$ 10% nukleär gefärbter Zellen), p53

Färbeindex (\leq versus $>$ 10 nukleär gefärbter Zellen), UICC-Klassifikation (1/2 versus 3/4), AJCC-Klassifikation (1/2 versus 3/4).

Mit der Cox-Hazard-Funktion wurden univariate Faktorenanalysen erstellt. Es wurde das 95% Konfidenzintervall, der p-Wert und das relative Risiko angegeben, früh zu versterben. Die zur Kategorisierung eingesetzten Parametern sind wie folgt: p53 Expression ($>10\%$), p53 Färbeindex (>10), K-ras Mutation, p53 Mutation, UICC-Stadium (3/4), T-Stadium (T3/4), N-Stadium (N1/2), M-Stadium (M1), Grading (G2/3).

Die multivariate Überlebens-Regressionsanalyse wurde (Chi-Quadrat-Test und dem exakten Fischer-Test) durch schrittweise Auswahl von kategorialen Variablen errechnet, basierend auf wahrscheinlichen Assoziationen zwischen klinisch-pathologischen Parametern und zusätzlich mit den Beziehungen zwischen p53 Mutationsstatus, p53 Expression und K-ras Mutationsstatus.

4.5.1 Box Plot Analysen und Mann-Whitney U-Test

Die Box Plot Analyse und Ergebnisse des Mann-Whitney U-Tests zeigen den Vergleich von p53 Index (STI) für nukleär und zytosolisch gefärbte Zellen und den Vergleich dieser Expressionsdaten mit dem TNM-Stadium, Grading, K-ras und p53 Mutationen sowie der UICC- und AJCC-Klassifikation.

Im Ergebnis zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen p53 Färbeindex (STI) bzw. p53 Expression und den aufgeführten Parametern.

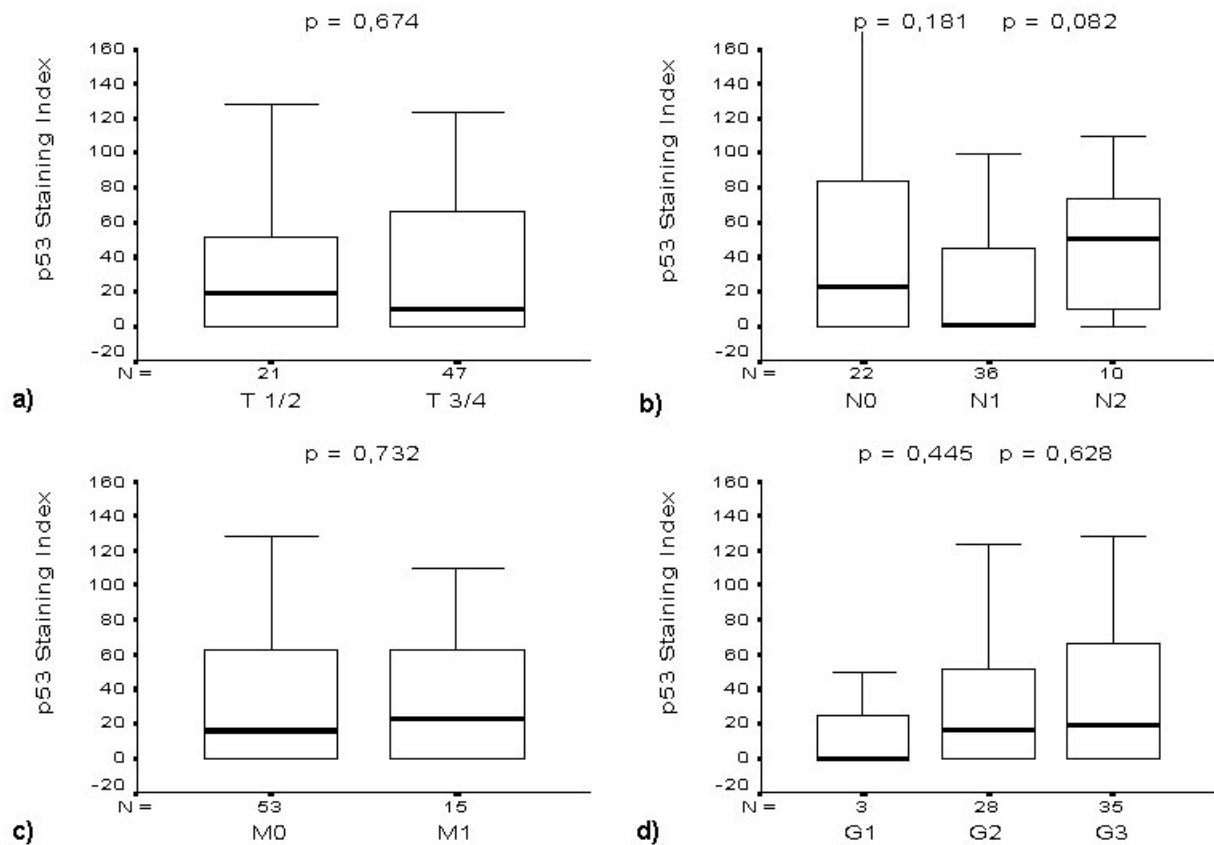


Abb. 5: Box Plot Analyse und Mann-Whitney U-Test für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus.

- Vergleich von p53 Färbeindex (n + z) und T-Stadium. (T1/2 (n = 21), Median 19 [range 0 bis 213]; T3/4 (n = 47), Median 10 [range 0 bis 124]). Mann-Whitney U-Test p = 0,647.
- Vergleich von p53 Färbeindex (n + z) und N-Stadium. (N0 (n = 22), Median 23 [range 0 bis 198]; N1 (n = 36), Median 1 [range 0 bis 213]; N2 (n = 10), Median 50,5 [range 0 bis 110]). Mann-Whitney U-Test p0/1 = 0,181 bzw. p1/2 = 0,082.
- Vergleich von p53 Färbeindex (n + z) und M-Stadium. (M0 (n = 53), Median 16 [range 0 bis 213]; M1 (n = 15), Median 23 [range 0 bis 110]). Mann-Whitney U-Test p = 0,732.
- Vergleich von p53 Färbeindex (n + z) und Grading. (G1 (n = 3), Median 0 [range 0 bis 50]; G2 (n = 28), Median 16,5 [range 0 bis 124]; G3 (n = 35), Median 19 [range 0 bis 213]). Mann-Whitney U-Test p1/2 = 0,445 bzw. p1/3 = 0,628.

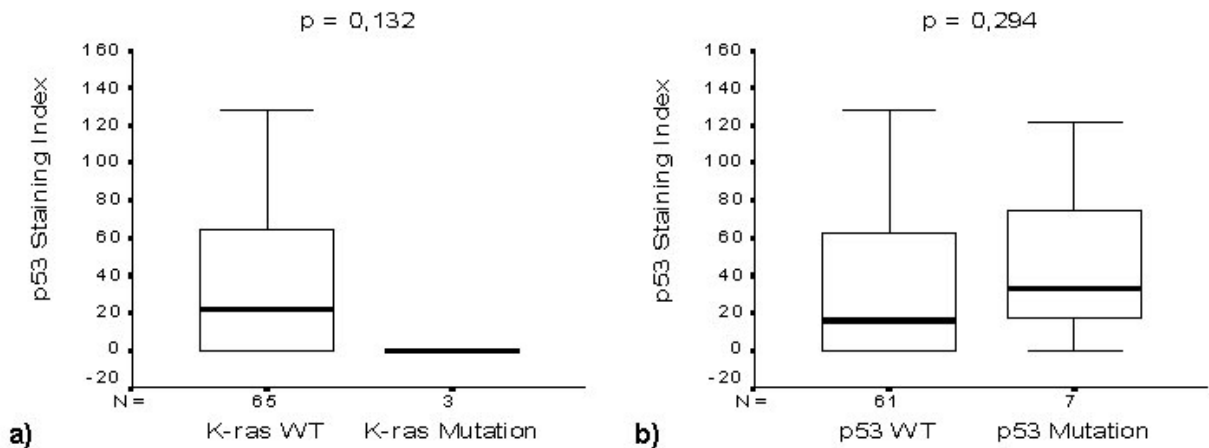


Abb. 6: Box Plot Analyse und Mann-Whitney U-Test für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus für den Vergleich von p53 Färbeindex (STI) nukleär und zytosolisch (n + z) gefärbter Zellen für a) K-ras Mutation und b) p53 Mutation.

- a) Vergleich von p53 Färbeindex (n + z) und K-ras Mutation, Kodon 12. (Wildtyp (WT) (n = 65), Median 22 [range 0 bis 213]; Mutation (n = 3), Median 0 [range 0 bis 1]). Mann-Whitney U-Test p = 0,132.
- b) Vergleich von p53 Färbeindex (n + z) und p53 Mutation. (Wildtyp (WT) (n = 61), Median 16 [range 0 bis 213]; Mutation (n = 7), Median 33 [range 0 bis 122]). Mann-Whitney U-Test p = 0,294.

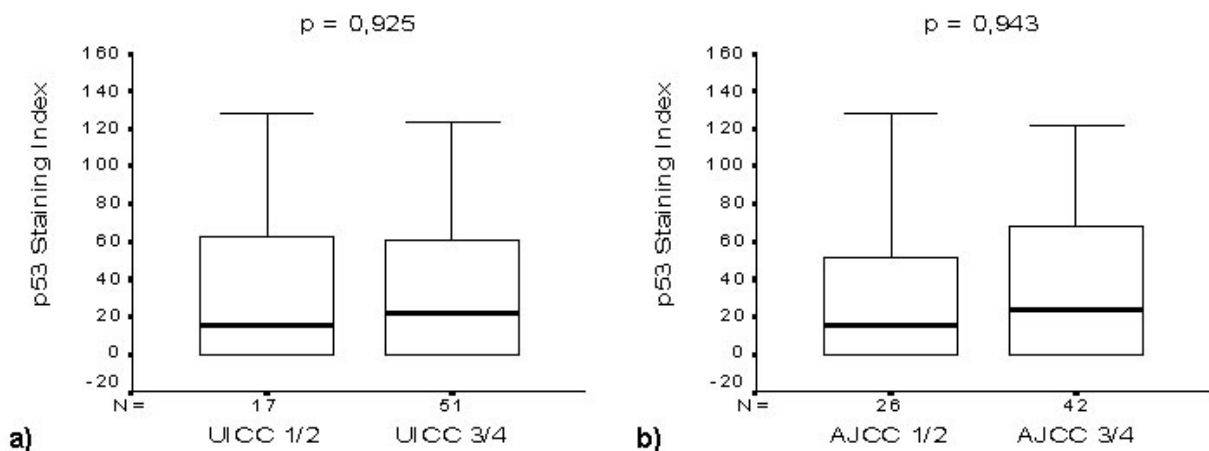


Abb. 7: Box Plot Analyse und Mann-Whitney U-Test für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus für den Vergleich von p53 Färbeindex (STI) nukleär und zytosolisch (n + z) gefärbter Zellen für a) UICC-Klassifikation, b) AJCC-Klassifikation.

- a) Vergleich von p53 Färbeindex (n + z) und UICC-Klassifikation. (1/2 (n = 17), Median 15 [range 0 bis 213]; 3/4 (n = 51), Median 22 [range 0 bis 124]). Mann-Whitney U-Test p = 0,925.
- b) Vergleich von p53 Färbeindex (n + z) und AJCC-Klassifikation. (1/2 (n = 26), Median 15,5 [range 0 bis 213]; 3/4 (n = 42), Median 23,5 [range 0 bis 122]). Mann-Whitney U-Test p = 0,943.

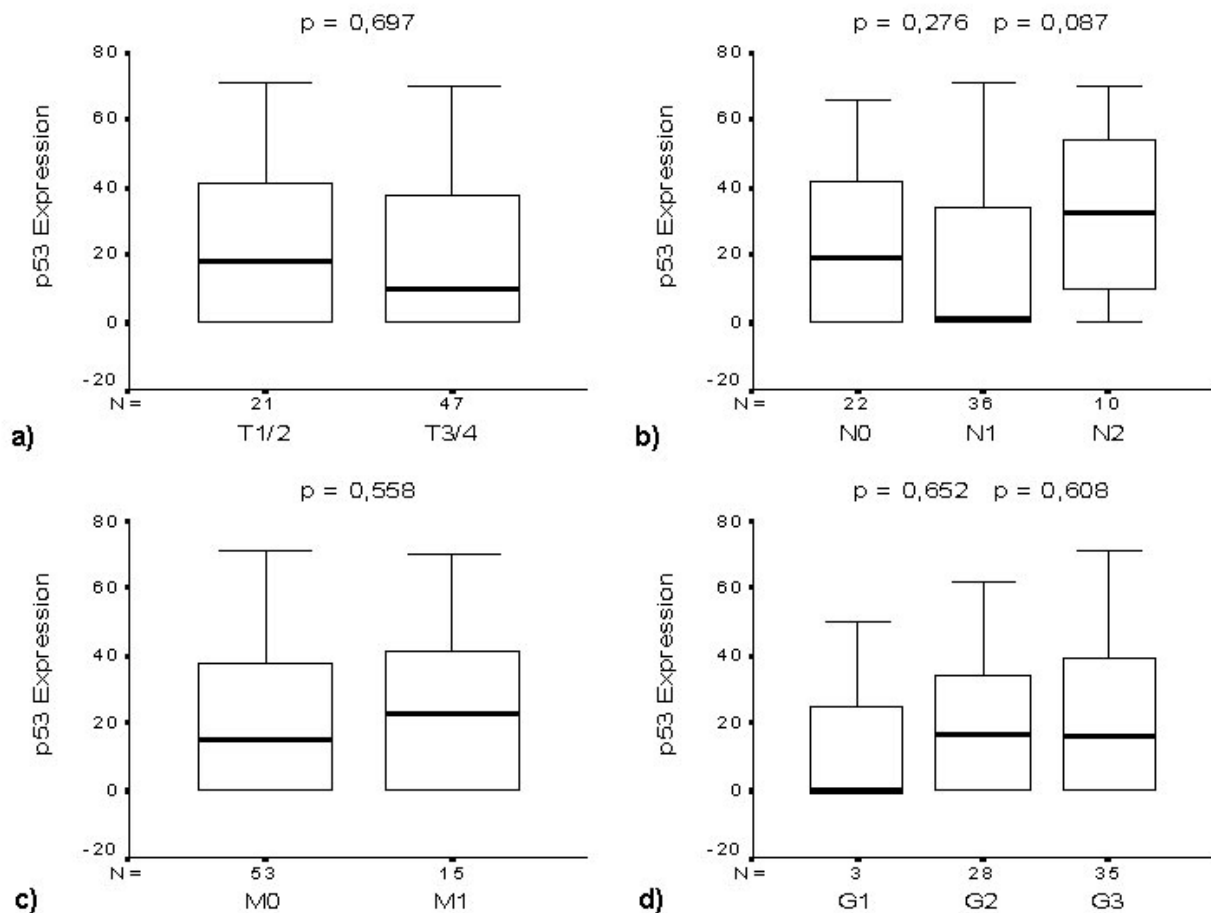


Abb. 8: Box Plot Analyse und Mann-Whitney-Test für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus zeigen den Vergleich von p53 Expression nukleär und zytoplasmisch (n + z) gefärbter Zellen für a) T-Stadium, b) N-Stadium, c) M-Stadium und d) Grading.

- Vergleich von p53 Expression (n + z) und T-Stadium. (T1/2 (n = 21), Median 18 [range 0 bis 71]; T3/4 (n = 47), Median 10 [range 0 bis 70]). Mann-Whitney U-Test $p = 0,697$.
- Vergleich von p53 Expression (n + z) und N-Stadium. (N0 (n = 22), Median 19,5 [range 0 bis 66]; N1 (n = 36), Median 1 [range 0 bis 71]; N2 (n = 10), Median 32,5 [range 0 bis 70]). Mann-Whitney U-Test $p_{0/1} = 0,276$ bzw. $p_{1/2} = 0,087$.
- Vergleich von p53 Expression (n + z) und M-Stadium. (M0 (n = 53), Median 15 [range 0 bis 71]; M1 (n = 15), Median 23 [range 0 bis 70]). Mann-Whitney U-Test $p = 0,558$.
- Vergleich von p53 Expression (n + z) und Grading. (G1 (n = 3), Median 0 [range 0 bis 50]; G2 (n = 28), Median 16,5 [range 0 bis 62]; G3 (n = 35), Median 16 [range 0 bis 71]). Mann-Whitney U-Test $p_{1/2} = 0,652$ bzw. $p_{1/3} = 0,608$.

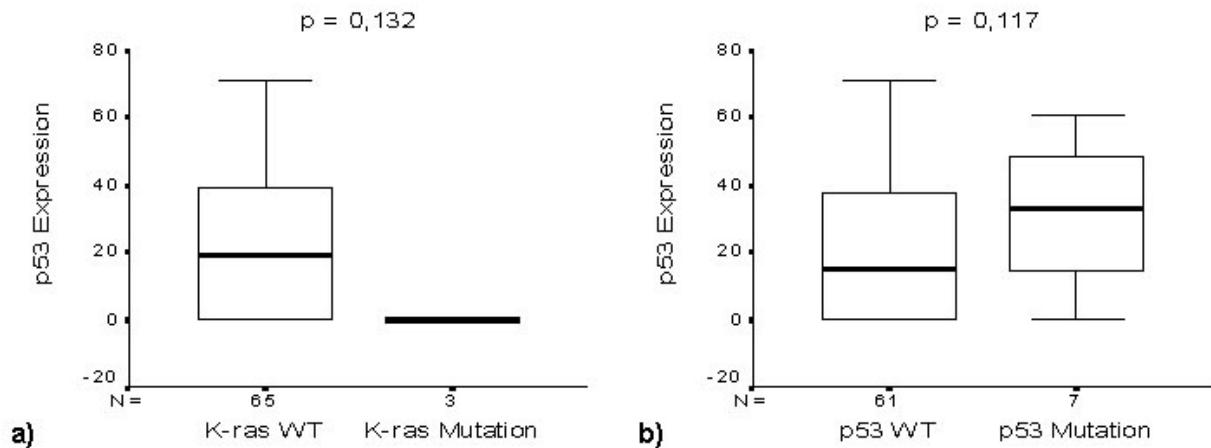


Abb. 9: Box Plot Analyse und Mann-Whitney U-Test für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus für den Vergleich von nukleärer und zytosolischer (n + z) p53 Expression für a) K-ras Mutation und b) p53 Mutation.

- a) Vergleich von p53 Expression (n + z) und K-ras Mutation, Kodon 12. (Wildtyp (WT) (n = 65), Median 19 [range 0 bis 71]; Mutation (n = 3), Median 0 [range 0 bis 1]). Mann-Whitney U-Test p = 0,132.
- b) Vergleich von p53 Expression (n + z) und p53 Mutation. (Wildtyp (WT) (n = 61), Median 15 [range 0 bis 71]; Mutation (n = 7), Median 33 [range 0 bis 61]). Mann-Whitney U-Test p = 0,117.

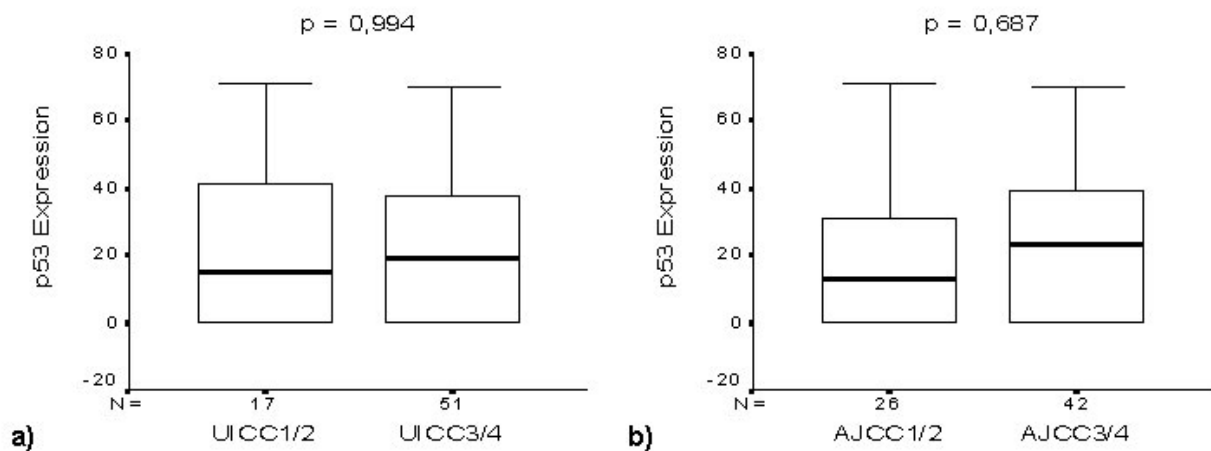


Abb. 10: Box Plot Analyse und Mann-Whitney U-Test für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus für den Vergleich von nukleärer und zytosolischer (n + z) p53 Expression für a) UICC-Klassifikation, b) AJCC-Klassifikation.

- a) Vergleich von p53 Expression (n + z) und UICC-Klassifikation. (1/2 (n = 17), Median 15 [range 0 bis 71]; 3/4 (n = 51), Median 19 [range 0 bis 70]). Mann-Whitney U-Test p = 0,994.
- b) Vergleich von p53 Expression (n + z) und AJCC-Klassifikation. (1/2 (n = 26), Median 13 [range 0 bis 71]; 3/4 (n = 42), Median 23,5 [range 0 bis 70]). Mann-Whitney U-Test p = 0,687.

4.5.2 Kaplan-Meier Überlebensanalyse

Mittels Kaplan-Meier Überlebensanalyse und Log-Rang-Test wurde das Gesamtüberleben verglichen mit T-Stadium, N- Stadium, M- Stadium, Grading, K-ras Mutation (Kodon 12), p53 Mutation, p53 Expression, p53 Färbeindex, UICC-Klassifikation, AJCC-Klassifikation.

Im Ergebnis der Überlebensanalyse zeigte sich eine signifikante Beziehung zwischen der Gesamtüberlebenszeit und dem N- Stadium ($p = 0,0418$), der UICC-Klassifikation ($p = 0,0072$) sowie der AJCC-Klassifikation ($p = 0,0420$).

Es zeigte sich hingegen keine prognostische Bedeutung für T- Stadium, M- Stadium, Grading, K-ras Mutation, p53 Mutation, p53 Expression und p53 Färbeindex und der Gesamtüberlebenszeit.

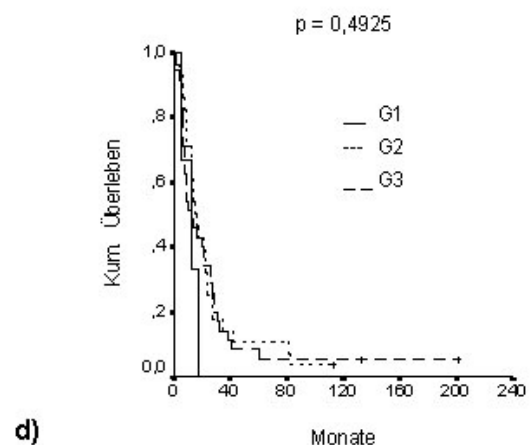
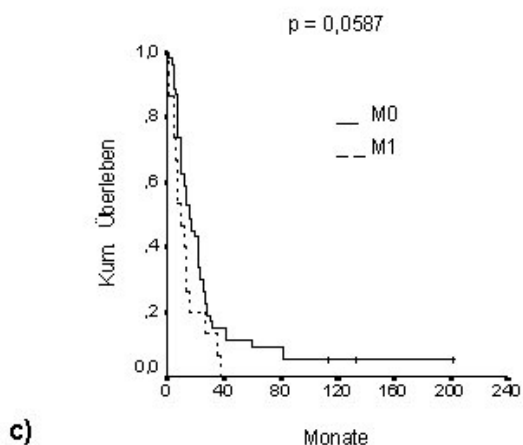
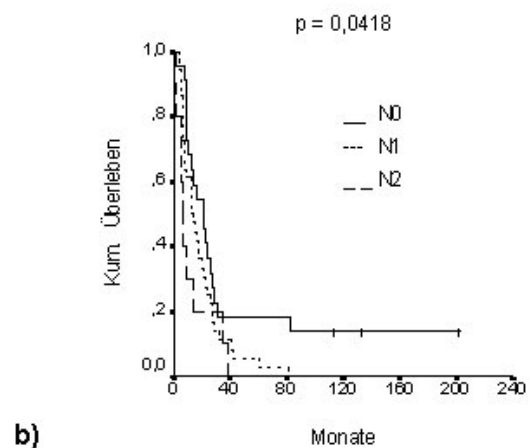
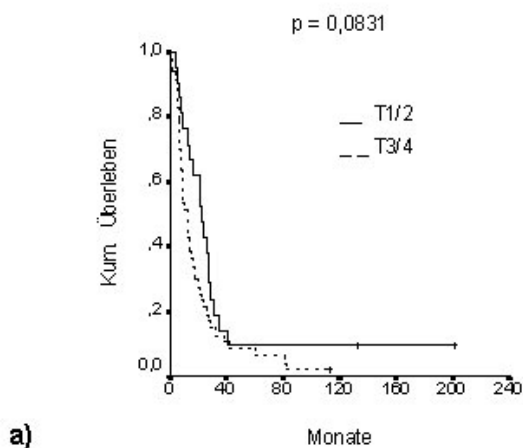


Abb. 11: Kaplan-Meier Überlebensanalyse von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus nach Resektion mit kurativer Absicht für a) T- Stadium, b) N- Stadium, c) M- Stadium, d) Grading.

- a) Kaplan-Meier Überlebenskurve für T-Stadium. (T1/2 (n = 21) versus T3/4 (n = 47)). Log-Rang-Test p = 0,0831. Mediane Überlebenszeit: T1/2 = 22 Monate, T3/4 = 12 Monate.
- b) Kaplan-Meier Überlebenskurve für N-Stadium (N0 (n = 22) versus N1 (n = 36) versus N2 (n = 10)). Log-Rang-Test p = 0,0418. Mediane Überlebenszeit: N0 = 21 Monate, N1 = 13 Monate, N2 = 6 Monate.
- c) Kaplan-Meier Überlebenskurve für M-Stadium (M0 (n = 53) versus M1 (n = 15)). Log-Rang-Test p = 0,0587. Mediane Überlebenszeit: M0 = 16 Monate, M1 = 9 Monate.
- d) Kaplan-Meier Überlebenskurve für Grading (G1 (n = 3) versus G2 (n = 28) versus G3 (n = 35)). Log-Rang-Test p = 0,4925. Mediane Überlebenszeit: G1 = 13 Monate, G2 = 15 Monate, G3 = 12 Monate.

In den Abbildungen ist zu sehen, dass sich Langzeitüberlebende vor allem unter den Patienten des T1/2-Stadium, des N0-Stadium, des M0-Stadium sowie des G3-Gradings befinden. Das Ergebnis bezüglich des Grading überrascht, ist aber mit großer Wahrscheinlichkeit auf die geringe Anzahl (n = 3) der Patienten im G3-Grading zurückzuführen.

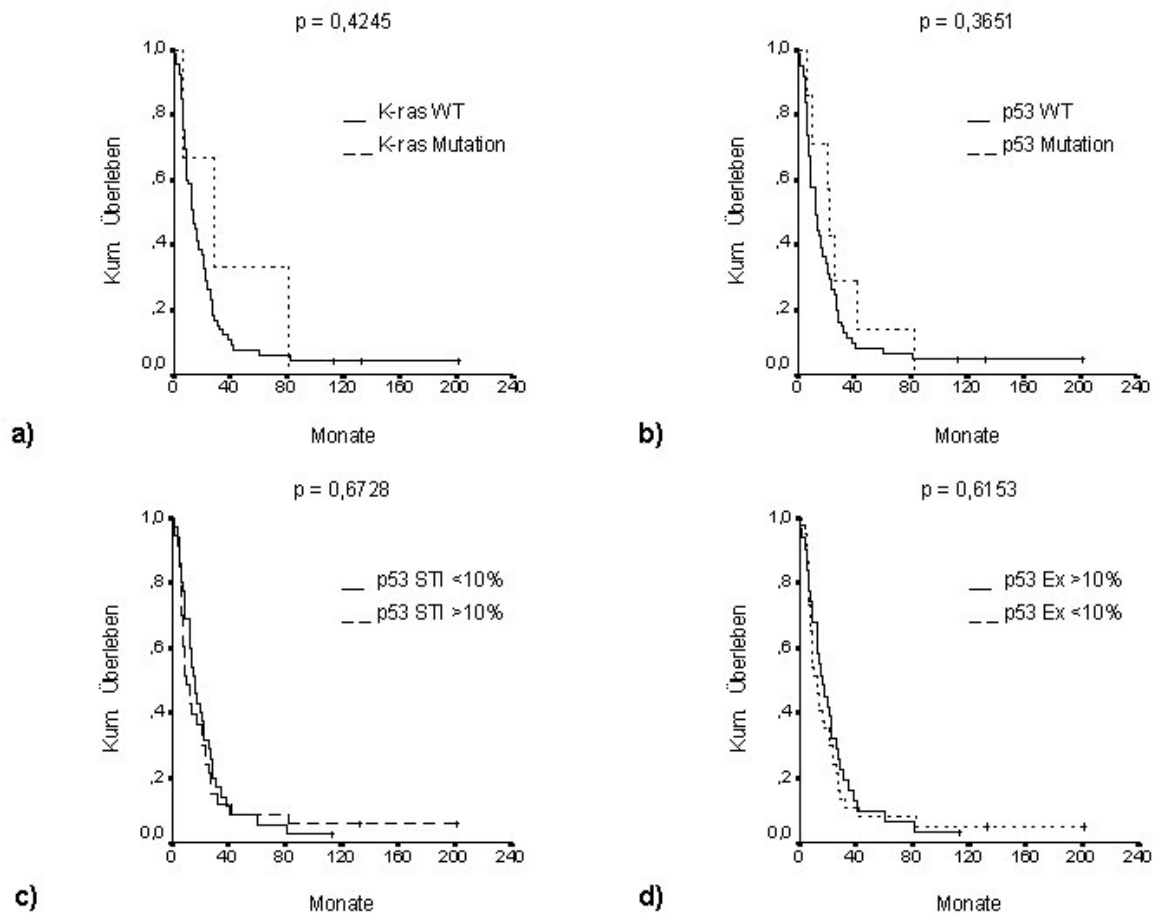


Abb. 12: Kaplan-Meier Überlebensanalyse von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus nach Resektion mit kurativer Absicht für a) K-ras Mutation, b) p53 Mutation.

- a) Kaplan-Meier Überlebenskurve für K-ras Mutation. (WT (n = 65) versus Mutation (n = 3)). Log-Rang-Test p = 0,4245. Mediane Überlebenszeit: WT = 14 Monate, Mutation = 28 Monate.
- b) Kaplan-Meier Überlebenskurve für p53 Mutation (WT (n = 61) versus Mutation (n = 7)). Log-Rang-Test p = 0,3651. Mediane Überlebenszeit: WT = 13 Monate, Mutation = 22 Monate.
- c) Kaplan-Meier Überlebenskurve für p53 Färbeindex (STI) nukleär und zytosolisch (n + z) gefärbter Zellen (<10 n = 35 versus ≥ 10 n = 33). Log-Rang-Test p = 0,6728. Mediane Überlebenszeit: <10 = 16 Monate, ≥ 10 = 10 Monate.
- d) Kaplan-Meier Überlebenskurve für p53 Expression nukleär und zytosolisch (n + z) gefärbter Zellen (<10% n = 31 versus ≥ 10 % n = 37). Log-Rang-Test p = 0,6153. Mediane Überlebenszeit: <10% = 16 Monate, ≥ 10 % = 12 Monate.

In den Abbildungen zeigt sich eine bessere Prognose für die Patienten mit K-ras Mutation und p53 Mutation, jedoch wird keine Signifikanz erreicht. Evtl. sind diese

Ergebnisse jedoch auf die geringen Anzahl der Patienten mit Mutationen zurückzuführen.

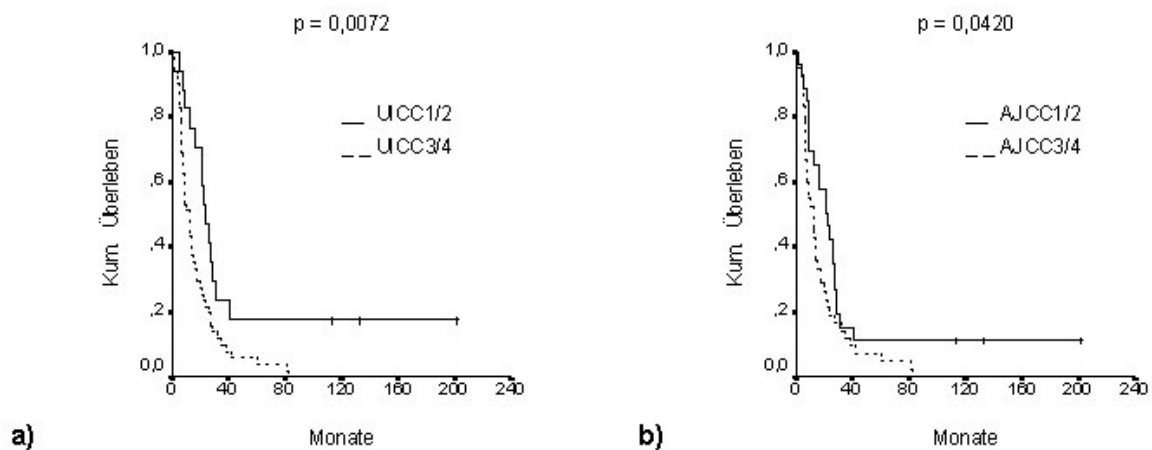


Abb. 13: Kaplan-Meier Überlebensanalyse von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus nach Resektion mit kurativer Absicht für a) UICC-Klassifikation, b) AJCC-Klassifikation.

- a) Kaplan-Meier Überlebenskurve für UICC-Klassifikation. (1/2 (n = 17) versus 3/4 (n = 51)). Log-Rang-Test $p = 0,0072$. Mediane Überlebenszeit: 1/2 = 23 Monate, 3/4 = 12 Monate.
- b) Kaplan-Meier Überlebenskurve für AJCC-Klassifikation (1/2 (n = 26) versus 3/4 (n = 42)). Log-Rang-Test $p = 0,0420$. Mediane Überlebenszeit: 1/2 = 21 Monate, 3/4 = 12 Monate.

In den Abbildungen ergeben sich auf der Basis der beiden Klassifikationen unterschiedliche Überlebensdaten. Dies könnte auf die unterschiedliche Verteilung der pathologischen Parameter auf die klinischen Stadien, besonders des Lymphknotenstatus, zurück zu führen sein. In der UICC-Klassifikation werden Lymphknotenmetastasen erst in das Stadium III eingruppiert; Patienten im Stadium II könnten daher, trotz fortgeschrittenem Primärtumor, eine wie hier ausgewertete längere mediane Überlebenszeit aufweisen.

4.5.3 Uni- und multivariate Analyse

Mittels Regressionsanalyse nach dem Cox-Proportional-Hazard Model wurde das relative Risiko früher zu versterben und das 95% Konfidenzintervall errechnet für den nukleären und zytoplasmatischen (n + z) p53 Färbeindex (STI) (> 10), K-ras Mutation (Mutation n = 3/68: 4,4%), p53 Mutation (Mutation n = 7/68: 10,3%), UICC-Klassifikation (3/4), T-Stadium (T3/4), N- Stadium (N1/2), M- Stadium (M1) und Grading (G2/3). Die Ergebnisse sind in Tab. 9. zusammengestellt.

Tab. 9: *Univariate Regressions-Analyse nach dem Cox-Proportional-Hazard Model bei Plattenepithelkarzinom des Ösophagus*

Parameter	Relatives Risiko	95% Konfidenzintervall	P-Wert
p53 STI (n + z) (>10%)	1,108	0,679-1,809	0,681
K-ras Mutation (Mutation)	0,631	0,197-2,027	0,440
p53 Mutation (Mutation)	0,702	0,319-1,544	0,379
UICC-Klassifikation (III/IV)	1,036	1,008-1,065	0,011
T-Stadium (T3/4)	1,021	0,996-1,046	0,094
N-Stadium (N1/2)	1,051	1,003-1,100	0,035
M-Stadium (M1)	1,724	0,958-3,101	0,069
Grading (G2/3)	0,972	0,922-1,026	0,307

Mittels des Chi-Quadrat-Tests und des exakten Fischer-Tests wurden Kreuztabellen erstellt, um eine mögliche beziehung zwischen p53 und K-raas Mutationen zu analysieren. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Vorhandensein einer K-ras und einer p53 Mutation (Tab. 10) bzw. der p53 Expression hinsichtlich des Färbeindexes (Tab. 11) oder des Prozentsatzes positiver Zellen (Tab. 12).

Tab. 10: Kreuztabelle zu K-ras (WT versus Mutation) und p53 (WT versus Mutation)

		p53		Gesamt
		WT	Mutation	
K-ras	WT	58	7	65
	Mutation	3		3
Gesamt		61	7	68

Chi-Quadrat nach Pearson = 0,548, Exakter Test nach Fisher = 0,718.

Tab. 11: Kreuztabelle zu K-ras (WT versus Mutation) und p53 STI (<10% versus ≥10%)

		p53 Färbeindex		Gesamt
		<10%	≥10%	
K-ras	WT	32	33	65
	Mutation	3		3
Gesamt		35	33	68

Chi-Quadrat nach Pearson = 0,085, Exakter Test nach Fisher = 0,131.

Tab. 12: Kreuztabelle zu K-ras (WT versus Mutation) und p53 Expression (<10% versus ≥10%)

		p53 Expression		Gesamt
		<10%	≥10%	
K-ras	WT	28	37	65
	Mutation	3		3
Gesamt		31	37	68

Chi-Quadrat nach Pearson = 0,053, Exakter Test nach Fisher = 0,090.

5. Diskussion

5.1 K-ras Mutation

Mutationen des Onkogens K-ras werden als frühes Ereignis mit hoher Frequenz in der kolorektalen Tumorgenese beschrieben. Sie treten in den meisten Fällen in den Kodons 12 und 13 auf und resultieren in einer konstitutiven Aktivierung des ras Proteins. Daten zu Ösophaguskarzinomen sind wenig beschrieben. Neben der Rolle des Onkogens K-ras in der Entstehung und Progression von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus, ist auch die Frequenz an Mutationen in diesen Karzinomen unklar. Während Studien von Mutationsfrequenzen im Kodon 12 in Adenokarzinomen von bis zu 40% berichten (65), konnten in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen keine oder geringe Anzahlen an K-ras Mutationen gefunden werden (48). Die geringe Häufigkeit der K-ras Mutationen steht dabei häufig im Kontrast zu höheren Frequenzen an p53 Mutationen, verglichen in gleichen ösophagealen Tumorkollektiven (2). Eine solche Konstellation mit niedrigeren Frequenz von K-ras (3/68: 4,4%) im Verhältnis zu p53 (7/68: 10,3%) Mutationen, konnte auch in dem hier untersuchten Tumorkollektiv nachgewiesen werden. In der statistischen Analyse zeigte sich jedoch kein Zusammenhang zwischen K-ras und p53 Mutation bzw. veränderter p53 Expression.

5.2 p53 Mutation

Das Tumorsuppressorgen p53 ist bekannt als „Wächter des Genoms“ (33). Es spielt eine bedeutende Rolle in der zellulären Signaltransduktion von Wachstumsarrest und Apoptose nach zellulärem Stress, wie DNA-Schädigung, Hitze oder Hypoxie.(68) Wildtyp p53 aktiviert über Transkription nachgeschaltete Effektorgene, die G1- und G2/M-Restriktions-Punkte des Zellzyklus regulieren. Es vermittelt Stressreaktionen der Zelle, die entweder zu Zellzyklusarrest in der G1-Phase führen und DNA-Reparaturmechanismen aktivieren, oder induziert Apoptose. Mutationen von p53 können die Funktion des p53 Proteins beeinträchtigen und folglich die Aktivierung der Effektorgene verhindern (69). Wildtyp p53 erhält also die Stabilität des Genoms und die Integrität der Zelle oder des Gewebeverbandes, während mutiertes p53 diese Rolle nicht mehr erfüllen kann.

Mutationen des p53 Tumorsuppressorgens wurden in einer Vielzahl humaner Tumoren beschrieben (68). In der Tumorgenese werden sie als spätes Ereignis beobachtet und

stehen meist im Zusammenhang mit fortgeschrittenen, invasiven Stadien der Erkrankung. Für Studien zur Identifizierung und Charakterisierung von p53 Mutation und zur Bewertung der diagnostischen bzw. prognostischen Bedeutung steht die Untersuchung der genetischen Ebene und der Proteinexpression, basierend auf Mutations-Analysen und immunhistochemischen Methoden, im Vordergrund.

Es ist bekannt, dass Mutationen im p53 Gen in Plattenkarzinomen des Ösophagus neben den verschiedenen Lokalisationen, insbesondere im Exon 5 – 8, unterschiedliche Typen aufweisen. In der IARC TP53 Mutations Datenbank (International Agency for Research on Cancer (IARC) als Teil der WHO) wuchs in den Jahren von 1989 bis 2001, durch die Sammlung von mehr und mehr Publikationen pro Jahr, die veröffentlichte Anzahl an p53 Mutationen von wenigen 100 auf ca. 17 000 Mutationen. Im Jahr 2002 enthält sie 17 689 somatische Mutationen und 225 Keimzell Mutationen. Die somatische Mutations-Datenbank enthält p53 Mutationen, die durch Sequenzanalyse identifiziert und direkt eingereicht oder aus Veröffentlichungen gewonnen wurden. Dies schließt Mutationen in humanen Tumorproben als auch in humanen Zelllinien ein.

Im Vergleich der Daten der IARC TP53 Datenbank sowie einzelner Studien (1) sieht man, dass die Prävalenz von p53 Mutationen beim Ösophaguskarzinom bei ca. 48% liegt. Typen an somatischen p53 Mutationen sind mit 24% G:C > A:T – Basenaustausch an CpG-Stellen am häufigsten, gefolgt von 20% G:C > A:T – Basenaustausch, 15% G:C > T:A – Basenaustausch, 11% A:T > G:C – Basenaustausch, 9% Deletionen, 7% G:C > C:G – Basenaustausch, 5% A:T > T:A – Basenaustausch, 4% A:T > C:G – Basenaustausch, 3% Insertionen, je 1% CC bzw. Tandem-Substitutionen und zu weniger als 1% komplexe Mutationen. Typen an somatischen p53 Mutationen sind mit 73% am häufigsten Missense-Mutationen, gefolgt von 9% Frameshift-Mutationen, 7% Nonsense-Mutationen, 5% stille Mutationen und 2% Mutationen an Splice-Stellen. Die Kodon-Verteilung von Missense und Nonsense Mutationen ist mit 8,5% am Kodon 248 am höchsten, gefolgt von 8% am Kodon 278, 6% am Kodon 175, 4% am Kodon 245, 3,5% am Kodon 282, 3% am Kodon 249 und je 2% am Kodon 213 und 220. Diese „Hotspot“-Mutationen betreffen sonst vorwiegend die DNA-Bindedomäne.

Studien zu Ösophaguskarzinomen zeigen, dass die beiden Typen, Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome, unterschiedliche molekulargenetische Merkmale aufweisen (66), wobei in Adenokarzinomen u.a. höhere Prävalenzen an p53 Mutationen

gefunden werden. Diese Unterschiede können auf unterschiedlichen Genesen ösophagealer Tumore, verschiedenen auslösenden Faktoren, der untersuchten Population und deren genetischen Merkmalen und Gewohnheiten sowie letztlich auf der technischen Handhabung der gewählten Methoden beruhen.

Die dargestellten Differenzen in den Mutationstypen spiegeln sich z.T. auch in geographischen Regionen wieder. Obwohl sich keine sicheren charakteristischen geographischen Mutationsprofile in Plattenepithelkarzinome aufstellen lassen, zeigt sich doch im Vergleich der Literatur, dass von Autoren einzelne Zusammenhänge zwischen bestimmten Mutationen und Umweltfaktoren beobachtet werden. Möglicherweise spiegeln sich hier z.B. CpG-Mutationen in Folge der Mutagenität von Tabak-Inhaltsstoffen und die DNA-Reparatur inhibierenden Aktivitäten von Ethanol-Metaboliten wieder (16). Basen-Substitutionen könnten durch die Wirkungen von N-Nitrosaminen bzw. anderen N-Nitroso-Verbindungen entstehen, welche in Speisen enthalten sind oder durch endogene Metaboliten erzeugt werden. U.a. bildet die induzierbare Stickoxid (NO) Synthase (NO-Synthase (NOS)), aus welchem dann endogene Nitrosamine entstehen. NO scheint dabei auch die Fähigkeit zu besitzen, eine p53 Akkumulation zu induzieren (19). Ferner werden Zusammenhänge mit O⁶-Alkydeoxyguanosin, einem Substrat der DNA-Alkylierung, und bestimmten Umwelt-Karzinogenen vermutet (2). Transitionen an CpG-Stellen können jedoch auch spontan durch Deaminierung von 5-Methylcytosin zu Thymin oder Mismatch Reparatur, chronische Entzündungen oder hohe Spiegel an Stickoxid, entstehen (16).

5.3 p53 Expression

Immunhistochemische Studien mit monoklonalen Antikörpern in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus unterliegen einer hohen Variabilität, abhängig z.B. von den Interpretatoren und dem von ihnen gewählten Material, bestimmter Patientenpopulationen mit entscheidenden Kriterien, wie den ethnischen Differenzen, den klinisch-pathologischen Stadien, den durchgeführten Operationen und der angewandten Therapie. Differenzen können weiter auf den verwendeten Labortechniken, der Bevorzugung bestimmter diagnostischer und prognostischer Methoden der zytogenetischen oder immunhistochemischen Analyse, wie

verschiedenen monoklonalen Antikörpern und Färbeverfahren, und der statistischen Analyse beruhen (74).

Innerhalb der Schichten des Epithels können sich diffuse angefärbte Verteilungsmuster, z.B. in heterogenen Klustern, zeigen, welche mögliche Hinweise entweder auf eine Streuung oder einen multifokalen Ursprung der Läsionen geben (7). Gut-differenzierte Plattenepithelkarzinome des Ösophagus zeigen z.B. eine intensive Färbung in der Peripherie, nicht jedoch in Zentrum des Tumornestes. Schwach differenzierte Tumore erscheinen oft homogen gefärbt und zeigen demnach auch in verschiedenen Bereichen des Tumornestes gleiche Mutationen. Verschiedene oder fehlende Mutationen sind hingegen Charakteristika heterogen gefärbter Karzinome. Diese könnten eine Einheit von Plattenepithelkarzinomen darstellen, in welchen die p53 Veränderungen ein spätes Ereignis sind, in denen sich infolge der Tumorprogression und sekundärer genetischer Veränderungen in verschiedenen Bereichen verschiedene Klone mit unterschiedlichem p53 Status entwickeln (58).

Die hier gewonnenen Ergebnisse wurden in Anlehnung an verfügbare Daten zur Bewertung der p53 Expression in präneoplastischen und neoplastischen Läsionen des Ösophagus interpretiert. Wichtig war daher die Relation zur Tumorprogression und der Vergleich mit klinisch-pathologischen Merkmalen.

Im Normalgewebe wird die Expression von p53 beobachtet, unabhängig vom Grad der Differenzierung, in basalen Zellen, innerhalb des Kernes. In gesunden ungeschädigten Zellen ist die Expression des Wildtyp p53 Proteins, auf Grund seiner kurzen Halbwertszeit, niedrig bzw. nicht nachzuweisen. Das von mutierten Genen stammende p53 Protein akkumuliert hingegen im Kern u.a. als Konsequenz seiner Bindung zu onkogenen Proteinen, welche seine Halbwertszeit verlängern. Die Akkumulation entsteht damit nicht durch induzierte p53 Gentranskription, sondern ist Folge einer Stabilisierung des p53 Protein. In der Theorie nimmt man an, dass Tumore mit p53 Mutationen aus diesem Grund eine Tendenz zu erhöhter p53-Protein-Expression bzw. – Akkumulation in 20-90% der Fälle aufweisen. Erhöhte p53 Proteinexpression zeigt sich häufiger bei Adenokarzinomen als bei Plattenepithelkarzinomen (7) sowie bei Tumoren in fortgeschrittenen Stadien (26). Obwohl nicht alle Mutationen erhöhte Synthese von p53-Protein zeigen, wurde beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ein Zusammenhang zwischen Mutation des p53 Gen und Akkumulation des p53 Proteins

zu beschrieben (58). Eine solche Korrelation zwischen p53 Mutation und erhöhter p53 Expression zeigt sich hingegen in neueren Studien nicht mehr (97) und wurden auch im vorliegenden Tumorkollektiv nicht beobachtet.

5.4 Diagnostische und prognostische Bedeutung von p53

Nach Identifizierung und detaillierter Analyse des Tumorsuppressorgens p53 wurde klar, dass die isolierte Mutation von p53, trotz der zentralen Rolle von p53 in Zellzyklus- und Apoptoseregulation und Tumorphagenese, in den meisten Tumorentitäten kein prognostischer Faktor ist. Klar ist heute auch, dass die Überexpression des p53-Proteins nicht mit dem p53-Mutationsstatus korreliert (79).

Frühere Studien, welche für die Bedeutung von p53 als negativer prognostischer Faktor sprechen, wurden u.a. in Hoch-Risiko Regionen durchgeführt. Dort wurde ein Zusammenhang zwischen Mutationen des p53 Gens und der Überlebensrate von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen beobachtet. Der Vergleich der Ergebnisse zeigt dabei, dass ösophageale Tumore mit mutiertem p53 eine größere Kapazität haben, Metastasen zu bilden. Neben der Mutationsanalyse sprechen auch einige immunhistochemische Studien dafür, dass eine möglicherweise durch p53 Mutationen ausgelöste Überexpression und Akkumulation von p53 Protein mit niedrigeren Überlebensraten verbunden sein könnte (74). In diesen Fällen stand die Überexpression des p53 Proteins mit einer erhöhten proliferativen Aktivität im Zusammenhang und erhöhte sich mit fortschreitenden Stadien von der BCH (basal cell hyperplasia), der DYS bis hin zum Karzinom (9).

Im Gegensatz dazu widersprechen jedoch neuere Daten der Theorie der p53-Mutation-bedingten Akkumulation des p53 Protein. Sie weisen darauf hin, dass allein aufgrund der erhöhten Expression des p53 Protein nicht zuverlässig auf eine auslösende Mutation geschlossen werden könne. Eine Überexpression sei demnach nur ein bedingt sicheres indirektes Zeichen einer Mutation. Auch zeigt sich häufig hinsichtlich der Überexpression von p53 alleine kein Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf, d.h. der Prognose. Unter Berücksichtigung des TNM-Stadiensystems z.B. zeigt sich, dass die Inzidenz von p53-positiven Tumoren nicht zuverlässig in fortgeschrittenen Stadien ansteigt. Selbst dann, wenn Mutationen des p53 Gens als frühes Ereignis in Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden, stehe die Beobachtung der p53

Expression nicht immer im Zusammenhang mit der Tumorprogression und der metastatischen Streuung (3). Diesen Ergebnissen zufolge ist in Plattenepithelkarzinomen häufig die Anzahl p53-überexprimierender Karzinome im Verhältnis zu p53-mutierten Karzinomen höher. Diese Daten - erhöhte Expressionsrate im Verhältnis zu niedriger Mutationsrate, sowie die fehlende Korrelation zu klinisch-pathologischen Parametern - stimmen mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen überein.

Die Theorie der Mutations-bedingten Akkumulation des p53 Proteins ist auch deshalb nicht ausreichend zuverlässig, da erhöhte Spiegel von p53 Protein, einer Akkumulation entsprechend, auch in histologisch gesunden Zellen asymptomatischer Personen ohne Vorliegen einer p53 Mutation gefunden werden. Möglicherweise deuten solche Fälle auf erhöhten zellulären Stress, eventuell aber doch auch auf frühe Stadien der Tumorgenese und ein erhöhtes Risiko, Ösophaguskarzinome zu entwickeln, hin (24). Da die Nachweise von p53 mittels immunhistochemischer Methoden nicht mit dem Mutationsstatus korrelieren, besteht die Gefahr, die Anzahl p53-mutierter Karzinome zu überschätzen und folglich die Prognose falsch zu bewerten (86). Zusammenfassend lässt sich in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten sagen, dass die Anfärbarkeit von p53 nicht zwangsläufig mit vorhandenen p53 Mutationen, dem Grad der Differenzierung oder dem apoptotischem Index korreliert (39). Fälle von Akkumulation ohne nachweisbare p53 Mutation können hingegen auch durch eine Stabilisierung des p53 Wildtyps oder durch p53-bindende Proteine, wie Mdm-2 oder Onkogene, wie HPV-E6, erklärt werden, wenn Bindungen solcher Art zum Funktionsverlust des Tumorsuppressors führen. Zuletzt besteht die Möglichkeit, dass es sich bei der Akkumulation um ein noch ungeklärtes Phänomen handelt, das keinen Hinweis auf ein dysfunktionales Protein gibt (3).

Im hier untersuchten Kollektiv der Plattenepithelkarzinome des Ösophagus wurden p53 Mutationen in den Exons 5, 7 und 8 nachgewiesen, welche für die DNA Bindungs-Domäne von p53 kodieren und im Allgemeinen (zusammen mit Exon 6) die Lokalisation von >95% aller p53 Mutationen sind. Im Vergleich zu den genannten Daten wurde eine relativ niedrige Frequenz an p53 Mutationen (7/68: 10,3%) gefunden. Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen p53 Mutationen und der p53 Proteinexpression nachgewiesen. Nicht in allen Tumoren mit p53 Mutationen konnte immunhistochemisch

p53 Protein entdeckt werden. Damit unterstützen die Ergebnisse erstens die Theorie, dass die Funktion des p53 Proteins möglicherweise auch durch andere Mechanismen als die der Mutation inaktiviert werden kann. Auch wenn die erhöhte Expression und Anfärbbarkeit des p53 Proteins, Wildtyp p53 Protein ist in gesunden normalerweise nicht nachweisbar, auf eine Veränderung der Regulation hinweisen kann, so ist doch die Funktion von p53 dadurch nicht notwendigerweise beeinträchtigt (3). Zweitens bestätigen sie die Vermutung, dass eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens nicht mit klinisch-pathologischen Parametern in Zusammenhang stehen muss und damit dessen Stellenwert für die klinische Prognose in Frage gestellt ist. Zumindest bei isolierter Betrachtung des p53 Gens ohne Berücksichtigung vor- und nachgeschalteter oder redundanter Regulatoren.

5.5 Therapeutische Bedeutung

Die Analyse apoptotischer Prozesse in humanen Tumoren ist ein Ansatz, die prognostische Bedeutung von Apoptosegenen zu definieren. Invasive Karzinome des Ösophagus haben meist eine schlechte Prognose. Trotz Fortschritten in der Therapie ist die 5-Jahresüberlebensrate gering. Neben einer frühzeitigen Entdeckung, Diagnose und sinnvollen adjuvanten Therapie, kann ein signifikanter Fortschritt in der Verbesserung der Überlebenschancen durch zunehmendes Verständnis der Tumorbio­logie und deren Berücksichtigung bei der Entwicklung und Anwendung von Therapiestrategien erreicht werden. Ziel neuerer Studien ist daher, frühe und späte molekulare Ereignisse in der Entstehung und Progression ösophagealer Plattenepithelkarzinome zu identifizieren. So ist beschrieben, dass durch zytotoxische, chemotherapeutische Wirkstoffe oder Bestrahlung Apoptose in Tumoren induziert werden kann. Ferner ist nachgewiesen, dass ein Teil humaner Tumore eine reduzierte Fähigkeit zur Induktion von Apoptose aufweist. Eine Resistenz von Tumoren gegenüber Chemotherapie kann primär vorliegen oder auch im Rahmen der Therapie erworben werden, wie dies für p53 beschrieben wurde (78). Verschiedene Formen von Resistenzmechanismen sind u.a. bedingt durch erhöhten Zytostatikaexport aus der Zelle (Multi-drug-resistance, MDR), erhöhte Targetproduktion infolge von Genamplifikation, verminderte Bindung von Zytostatika an veränderte Targets, erhöhte Inaktivierung des Zytostatikums oder aktiver Metabolite, erhöhte DNA-Reparatur,

verminderter Zytostatikatransport in die Zelle (28). Allerdings haben diese Mechanismen klinische Therapieresistenz nur unzureichend erklären können. Aus diesem Grund erscheint die Untersuchung zentraler Apoptosegene auf Defekte in der genetischen Struktur sowie auf Fehler in der Proteinexpression als eine vielversprechende Möglichkeit, prognostische und prädiktive Faktoren für Tumore zu charakterisieren (1).

Tierexperimentelle Daten und tumorbiologische Experimente sowie einige wenige solide Studien in Kohorten von Tumorpatienten zeigen, dass die Inaktivierung des p53-Signalwegs und der vor- und nachgeschalteten Regulatoren, v.a. von DNA-Reparatur, Zellzykluscheckpunktregulatoren und der nachgeschalteten Apoptosesignalkaskaden von besonderem Interesse für die Entstehung von Therapieresistenz (81). Die Frage nach sinnvollen und gezielten Therapien zur Überwindung solcher Signalwegsdefekte ist daher der Hintergrund vieler Studien unter anderem auch bei ösophagealen Plattenepithelkarzinomen von besonderem Interesse ist hierbei der Bezug zum p53 Gen. Die Induktion von Apoptose in p53 defizienten Zellen ist häufig schwierig. Wie oben dargestellt, sind p53 mutierte Zellen oft resistenter gegenüber chemisch induziertem Zelltod, da die Wirkung zytotoxischer Wirkstoffe und der Bestrahlung über p53 vermittelt werden kann. P53 moduliert die Sensitivität bzw. Empfänglichkeit von Tumorzellen. Eine solche Resistenz gegen die Wirkung von Zytostatika kann daher auch ein Grund für das klinische Versagen von Tumortherapien sein. Unsere hier gezeigten Daten weisen allerdings darauf hin, dass p53 beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus kein entscheidender Regulator für Therapieansprechen bzw. Resistenz ist.

Die Beurteilung des Zusammenhanges zwischen dem p53-Status und der Sensitivität von Plattenepithelkarzinomen gegenüber der Radiotherapie, der Bestrahlung, ist zum Zeitpunkt noch nicht geklärt (77). Da die Radiotherapie das wichtigste nicht-operative Element der derzeitigen Ösophaguskarzinom-Therapie ist, ist auch die Wirkung von p53 in diesem Kontext von hohem Interesse. Ziel ist, vor allem den Zusammenhang zwischen p53 Inaktivierung und Radiosensitivität in fortgeschrittenen Stadien zu bestimmen, die einer kurativen Tumorresektion nicht mehr zugänglich sind. P53 Mutationen sowie die Proteinexpression geben dort möglicherweise Hinweis auf eine Regulation der zellulären Antwort auf Bestrahlung über p53 und der Bedeutung von p53

für das Therapieansprechen. Karzinome mit p53 Mutationen oder p53 Expression von mutiertem p53 Protein zeigen sich häufig resistent gegenüber Radiochemotherapie. Patienten mit P53-negativen Tumoren könnten daher von postoperativen Radiotherapien profitieren. Obwohl die Radioresistenz mit Defekten im Rahmen der apoptotischen Antwort korreliert, zeigen die vorliegenden Daten und andere Arbeiten an Plattenepithelkarzinomen, dass der Status von p53 in monogenetischen Analysen keine Vorhersage über das Überleben nach Bestrahlung zulässt. Weder der relative noch der absolute Gehalt des p53 Protein korreliert, wie auch hier in der vorliegenden Arbeit, mit der Sensitivität gegenüber Bestrahlungstherapie (23).

Ein weiterer Grund für die unzureichende prognostische Relevanz von einzig auf p53 beschränkten Analysen für Therapieansprechen auf zytotoxische Tumorthera­pien dürfte zudem in der Tatsache begründet sein, dass nicht alle Tumorthera­peutika über p53-abhängige Signalwege wirken. Bei Vergleich des p53-Status mit der Empfindlichkeit von primären B-CLL-Zellen für ein Panel von Zytostatika sowie ionisierende Bestrahlung zeigte sich, dass p53-Mutation mit Resistenz gegenüber Bestrahlung, Alkylanzien und Nukleosidanaloga wie z.B. Fludarabin bzw. Cladribin korreliert. Hingegen zeigte sich kein Einfluss bezüglich der Apoptoseinduktion durch Anthrazykline wie z.B. Doxorubicin, Vinca-Alkaloide wie z.B. Vincristin sowie Glukokortikoide (91). Vergleichbare Daten liegen uns auch für die funktionellen Konsequenzen einer Inaktivierung von Bax vor, wobei sich interessanterweise das Resistenzprofil von dem p53-mutierter B-CLL-Zellen unterscheidet. Verlust von Bax war mit Resistenz gegenüber Anthrazyklinen, Alkylanzien und Vincristin assoziiert, wohingegen Nukleosidanaloga und Glukokortikoide unabhängig von Bax Apoptose induzierten (92). Diese Daten zur Nutzung selektiver Zelltodsignalwege durch zytotoxische Tumorthera­peutika werden unterstützt von präklinischen Untersuchungen, die zeigten, dass auch Taxane ihre Antitumorwirkung unabhängig von p53 entfalten (93). Für die p53-Unabhängigkeit des Taxan-induzierten Zelltods sprechen auch klinische Daten, die gute Wirksamkeit von Taxanen in Ovarial- und Mammakarzinomen mit gestörtem p53 zeigen (94, 95, 96). Diese Daten belegen, dass spezifische Signalwegdefekte durch die rationale Wahl eines geeigneten Therapeutikums umgangen und – trotz Vorliegens zentraler genetischer Defekte – das klinische Ansprechen maligner Tumoren bereits

heutzutage durch Einsatz geeigneter, konventioneller zytotoxischer Tumortherapien erreicht werden kann (79).

Durch Hinzunahme anderer Komponenten des Signalwegs, wie z.B. p21 oder Bax könnte aber, allerdings beim kolorektalen Karzinom, eine prognostische und prädiktive Bedeutung gezeigt werden (98).

Eine interessante Strategie der rationalen Entwicklung von Antitumormitteln konzentriert sich auf die Revertierung biochemischer Defekte, die durch defektes p53 ausgelöst werden und die exklusiv in Tumorzellen gefunden werden. So kann durch Einsatz von solchen neuartigen Pharmaka ein mutiertes p53 Protein wieder korrekt gefaltet und biologisch aktiv sein. Dieser Ansatz verspricht Tumorselektivität (28). In der Chemotherapie sollen solche Wirkstoffe die Wiederherstellung der DNA-Bindungsfähigkeit von mutierten p53 Molekülen erleichtern und Resistenz überwinden.

Ein anderer Ansatz zur Korrektur von p53 Defekten ist der Gentransfer von Wildtyp p53 in Tumorzellen mit Hilfe viraler und nicht-viraler Expressionssysteme. Ziel solcher gentherapeutischer Ansätze ist z.B. die Induktion von Apoptose durch Gentransfer des p53 Wildtypgens.

Andere Möglichkeiten der molekularen Therapie betreffen mutierte oder anderweitig deregulierte Signalwegkomponenten in Tumoren, wie das hier untersuchte K-ras. Aktivierende Punktmutationen von K-ras sind eine der am häufigsten Genveränderungen in Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Ras-Proteine werden als biologisch inerte Proteine synthetisiert, die, um volle biologische Aktivität zu erlangen, eine Reihe posttranslationaler Modifikationen durchmachen. Von diesen Modifikationen ist u.a. die Farnesylierung und Prenylierung für die biologische Funktion wichtig. Inhibitoren dieser Reaktionen katalysierenden Enzyms, der Farnesyltransferase, bewirken einen Maturationsblock von zellulärem ras-Protein und inhibieren das Wachstum ras-transformierter Tumorzellen (82).

Allerdings zeigte die vorliegende Arbeit, dass Mutationen von K-ras ein seltenes Ereignis beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus darstellen und K-ras somit als therapeutisches Target für Farnesyltransferaseinhibitoren des Ras-Signalwegs in diesen Tumoren mit hoher Wahrscheinlichkeit ungeeignet ist.

Allerdings zeigte sich als interessanter Nebenbefund, dass K-ras mutierte Tumore eine bessere klinische Prognose haben können und K-ras Mutationen mit einem p53 Wildtyp und fehlender p53 Überexpression einhergehen. Aufgrund der geringen Fallzahl waren diese Befunde aber nicht signifikant.

5.6 Fazit

Der Wissensfortschritt der letzten Jahre hat erste tiefgreifende Einblicke in die komplexen Regelwerke geliefert, die Zellvermehrung, Zellüberleben und genetische Stabilität regulieren. Dieser Erkenntnisse haben v.a. einer gelehrt: Die Zusammenhänge sind ungeheuer komplex und werden durch eine Vielzahl, in ihrer Funktion bislang erst ansatzweise erkannter Faktoren reguliert. Für die Entwicklung neuer, selektiver Therapiestrategien von Tumoren ist das genaue Verständnis dieser regulatorischen Zusammenhänge zwischen Zellzyklus und Apoptose jedoch Grundvoraussetzung. Durch die Entschlüsselung des humanen Genoms und die Übertragung von Forschungsergebnissen aus anderen Organismen ergeben sich derzeit eine Vielzahl neuer Zusammenhänge, die auf einen rascheren Fortschritt nicht nur im Verständnis der funktionellen Zusammenhänge, sondern auch neuer, innovativer Therapien hoffen lassen. Hier besteht Grund zu Optimismus: Erste wichtige Regelwerke sind in ihren Grundzügen erkannt. Durch die Sequenzierung weiterer kompletter Genome von z.B. *C.elegans*, *Drosophila* und Hefen sowie deren funktionelle Analyse werden bereits bekannte und auch neue Zusammenhänge und Mechanismen auf den Menschen leichter zu übertragen sein. Gerade Erkenntnisse aus der Hefegenetik haben wesentlich zum besseren Verständnis der Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur humaner Zellen und deren Störung in Tumoren beigetragen.

Dieser Fortschritt im Wissen um die genetischen Veränderungen, die das Ansprechen auf Tumorthapie determinieren, wird uns – gemeinsam mit innovativen Analysetechniken zur Erfassung der komplexen genetischen Zusammenhänge – mit geeigneteren Behandlungsmethoden und Therapiestrategien ausstatten, um gezielter die Signaldefekte in malignen Tumoren bezüglich der Zellzyklus- und Apoptoseregulation zur Therapie dieser Erkrankungen zu nutzen (79).

6. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Peter Daniel, sowie Frau Dr. Sandra Herrmann und Frau Dr. Isrid Sturm für die Betreuung und Unterstützung der Arbeit. Ich bedanke mich bei Jana Roßius und Sylvia Scheele für technische Assistenz und bei Dr. Bernd Gillissen, Dr. Philipp Hemmati, Lilian Stärck, Dr. Thomas Wieder und Frau Dr. Clarissa von Haefen für inhaltlich Hilfe und Bereitstellung von Zelllinien.

Ich danke Dr. Timo Hillebrand und Frau Wiesener der Firma Invitek, Gesellschaft für Biotechnik und Biodesign mbH für die Kooperation, technische Assistenz und Bearbeitung des Materials.

Ich danke weiterhin Dr. Hans Scherübl und Frau Dr. Patricia Grabowski für die Kooperation und Bereitstellung der Patienten-Proben der Ösophaguskarzinome.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Sturm I, Petrowsky H, Volz R, Lorenz M, Radetzki S, Hillebrand T, Wolff G, Hauptmann S, Dörken B, Daniel P: Analysis of p53/BAX/p16(ink4a/CDKN2) in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16(ink4a/CDKN2) identifies patients with good prognosis. *J Clin Oncol.* 2001, *19(8)*, S.2272-81.
- (2) Casson AG, Wilson SM, McCart JA, O'Malley FP, Ozcelik H, Tsao MS, Chambers AF: ras mutation and expression of the ras-regulated genes osteopontin and cathepsin L in human esophageal cancer. *Int J Cancer.* 1997, *72(5)*, S.739-45.
- (3) Coggi G, Bosari S, Roncalli M, Graziani D, Bossi P, Viale G, Buffa R, Ferrero S, Piazza M, Blandamura S, Segalin A, Bonavina L, Peracchia A: p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. A molecular and immunohistochemical study with clinicopathologic correlations. *Cancer.* 1997, *79(3)*, S.425-32.
- (4) Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C: Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 1999, *9(12)*, S.M57-60.
- (5) Kenneth, W., Kinzler, BV.: Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell.* 1996, *87*, S.159-170.
- (6) Yang G, Zhang Z, Liao J, Seril D, Wang L, Goldstein S, Yang CS: Immunohistochemical studies on Waf1p21, p16, pRb and p53 in human esophageal carcinomas and neighboring epithelia from a high-risk area in northern China. *Int J Cancer.* 1997, *72(5)*, S.746-51.
- (7) Tian D, Feng Z, Hanley NM, Setzer RW, Mumford JL, DeMarini DM: Multifocal accumulation of p53 protein in esophageal carcinoma: evidence for field cancerization. *Int J Cancer.* 1998, *78(5)*, S.568-75.
- (8) Chino O, Makuuchi H, Shimada H, Machimura T, Mitomi T, Osamura RY: Assessment of the proliferative activity of superficial esophageal carcinoma using MIB-1 immunostaining for the Ki-67 antigen. *J Surg Oncol.* 1998, *67(1)*, S.18-24.
- (9) D'Amico, TA., Harpole, DH.: Molecular biology of esophageal cancer. *Chest Surg Clin N Am.* 2000, *10(3)*, S.451-69.
- (10) Phillips, DH.: Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature.* 1983, *303(5917)*, S.468-72.

- (11) Hager G, Formanek M, Gedlicka C, Knerer B, Kornfehl J: Ethanol decreases expression of p21 and increases hyperphosphorylated pRb in cell lines of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001, *25(4)*, S.496-501.
- (12) Gaus W, Hingst V, Mattern R u.a.: *Ökologisches Stoffgebiet, Duale Reihe.* Thieme, MLP: 1999, 3. Auflage.
- (13) He D, Zhang DK, Lam KY, Ma L, Ngan HY, Liu SS, Tsao SW: Prevalence of HPV infection in esophageal squamous cell carcinoma in Chinese patients and its relationship to the p53 gene mutation. *Int J Cancer.* 1997, *72(6)*, S.959-64.
- (14) Vita, d.: *Cancer of the Esophagus.* 1998.
- (15) Huang J, Hu N, Goldstein AM, Emmert-Buck MR, Tang ZZ, Roth MJ, Wang QH, Dawsey SM, Han XY, Ding T, Li G, Giffen C, Taylor PR: High frequency allelic loss on chromosome 17p13.3-p11.1 in esophageal squamous cell carcinomas from a high incidence area in northern China. *Carcinogenesis.* 2000, *21(11)*, S.2019-26.
- (16) Biramijamal F, Allameh A, Mirbod P, Groene HJ, Koomagi R, Hollstein M: Unusual profile and high prevalence of p53 mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern Iran. *Cancer Res.* 2001, *61(7)*, S.3119-23.
- (17) Kato H, Miyazaki T, Yoshikawa M, Nakajima M, Fukai Y, Tajima K, Masuda N, Tsutsumi S, Tsukada K, Nakajima T, Kuwano H: Nitrotyrosine in esophageal squamous cell carcinoma and relevance to p53 expression. *Cancer Lett.* 2000, *153(1-2)*, S.121-7.
- (18) Terry P, Lagergren J, Ye W, Nyren O, Wolk A: Antioxidants and cancers of the esophagus and gastric cardia. *Int J Cancer.* 2000, *87(5)*, S.750-4.
- (19) Ralhan R, Arora S, Chattopadhyay TK, Shukla NK, Mathur M: Circulating p53 antibodies, p53 gene mutational profile and product accumulation in esophageal squamous-cell carcinoma in India. *Int J Cancer.* 2000, *85(6)*, S.791-5.
- (20) Fong LY, Lau KM, Huebner K, Magee PN: Induction of esophageal tumors in zinc-deficient rats by single low doses of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA):

- analysis of cell proliferation, and mutations in H-ras and p53 genes. *Carcinogenesis*. 1997, *18(8)*, S.1477-84.
- (21) Schlemper RJ, Dawsey SM, Itabashi M, Iwashita A, Kato Y, Koike M, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, Sipponen P, Stolte M, Watanabe H: Differences in diagnostic criteria for esophageal squamous cell carcinoma between Japanese and Western pathologists. *Cancer*. 2000, *88(5)*, S.996-1006.
- (22) Yang HL, Dong YB, Elliott MJ, Liu TJ, McMasters KM: Caspase activation and changes in Bcl-2 family member protein expression associated with E2F-1-mediated apoptosis in human esophageal cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2000, *6(4)*, S.1579-89.
- (23) Rigberg DA, Kim FS, Blinman TA, Cole MA, Lane JS, So J, McFadden DW: p21 expression is increased by irradiation in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Res*. 1998, *76(2)*, S.137-42.
- (24) Kanamoto A, Kato H, Tachimori Y, Watanabe H, Nakanishi Y, Kondo H, Yamaguchi H, Gotoda T, Muro K, Matsumura Y: No prognostic significance of p53 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*. 1999, *72(2)*, S.94-8,
- (25) Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J: Erratum: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*. 1999, *83(6)*, S.18-29,870-73.
- (26) Natsugoe S, Nakashima S, Matsumoto M, Xiangming C, Okumura H, Kijima F, Ishigami S, Takebayashi Y, Baba M, Takao S, Aikou T: Expression of p21WAF1/Cip1 in the p53-dependent pathway is related to prognosis in patients with advanced esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1999, *5(9)*, S.2445-9.
- (27) Daniel P, Wieder T, Sturm I, Schulze-Osthoff K: The kiss of death: Promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. Review. *Leukemia*. 2001, *15(7)*, S.1022-32.
- (28) *Klinische Pharmakologie: ein Leitfaden für die Praxis*. Hrsg.: Rietbrock, Staib, Loew: 1996.
- (29) Wadler S, Haynes H, Beitler JJ, Hu X, Fell S, Camacho M, Levine B, Wiernik PH: Phase II clinical trial with 5-fluorouracil, recombinant interferon- alpha-2b, and

- cisplatin for patients with metastatic or regionally advanced carcinoma of the esophagus. *Cancer*. 1996, *78(1)*, S.30-34.
- (30) Damle S, Beitler JJ, Haynes H, Camacho M, Wolf E, Wadler S: Phase I-II study of 5-fluorouracil, recombinant interferon alpha2a, and cisplatin in combination with external beam radiation therapy followed by surgery in patients with locally advanced carcinoma of the esophagus. *Am J Clin Oncol*. 1999, *22(4)*, S.391-5.
- (31) Adham M, Baulieux J, Mornex F, de La Roche de Bransat E, Ducerf C, Souquet JC, Gerard JP: Combined chemotherapy and radiotherapy followed by surgery in the treatment of patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*. 2000, *89(5)*, S.946-54.
- (32) Hannun YA: Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*. 1997, *89(6)*, S.1845-53.
- (33) Lpane D: Cancer. p53, guardian of the genom. *Nature*. 1992, *358*, S.15-26.
- (34) Noguchi H, Naomoto Y, Kondo H, Haisa M, Yamatsuji T, Shigemitsu K, Aoki H, Isozaki H, Tanaka N: Evaluation of endoscopic mucosal resection for superficial esophageal carcinoma. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*. 2000, *10(6)*, S.343-50.
- (35) Benhidjeb T, Moesta KT, Schlag PM: Staging and neoadjuvant therapy of squamous cell carcinoma of esophagus. *Ther Umsch*. 2001, *58(3)*, S.165-73.
- (36) Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*. 1997, *326(Pt 1)*, S.1-16.
- (37) Angelastro JM, Moon NY, Liu DX, Yang AS, Greene LA, Franke TF: Characterization of a novel isoform of caspase-9 that inhibits apoptosis. *J Biol Chem*. 2001, *276(15)*, S.12190-200.
- (38) Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, Cohen GM: Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem*. 2000, *275(9)*, S.6067-70.

- (39) Azmi S, Dinda AK, Chopra P, Chattopadhyay TK, Singh N: Bcl-2 expression is correlated with low apoptotic index and associated with histopathological grading in esophageal squamous cell carcinomas. *Tumour Biol.* 2000, *21(1)*, S.3-10.
- (40) Bos JL: Ras Oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989, *49*, S.4682-89.
- (41) Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C: The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochem.* 1991, *30*, S.4637-48.
- (42) Maher J, Baker DA, Manning M, Dibb NJ, Roberts IA: Evidence for cell-specific differences in transformation by N-, H- and K-ras. *Oncogene.* 1995, *11*: 1639-47
- (43) McCormick F: Signal transduction. How receptors turn ras on. *Nature.* 1993, *36*. 315-16.
- (44) Bos JL: P21 ras: an oncoprotein functioning in growth factor-induced signal transduction. *Eur J Cancer.* 1995. *31A* : 1051-54.
- (45) de Vries JE, ten Kate J, Bosman FT : P21ras in carcinogenesis. *Pathol Res Pract.* 1996, *6*: 58-68.
- (46) Grand RJ, Owen D: The biochemistry of ras p21. *Biochem J.* 1991, *60*: 9-31.
- (48) Arber N, Shapira I, Ratan J, Stern B, Hibshoosh H, Moshkowitz M, Gammon M, Fabian I, Halpern Z: Activation of c-K-ras mutations in human gastrointestinal tumors. *Gastroenterology.* 2000, *118(6)*: 1045-50.
- (49) Keohavong, P., Gao, WM., Siegfried, JM., Luketich, JD., Melhem, MF. Topographic analysis of K-ras mutations in histologically normal lung. *Br J Cancer.* 2001, *85(2)*: 235-41.
- (50) Miyashita, T., Reed, JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995, *80(2)*: 293-9.
- (51) Kobayashi S, Koide Y, Endo M, Isono K, Ochiai T: The p53 gene mutation is of prognostic value in esophageal squamous cell carcinoma patients in unified stages of curability. *Am J Surg.* 1999, *177(6)*: 497-502.

- (52) Gartel AL, Serfas MS, Gartel M, Goufman E, Wu GS, el-Deiry WS, Tyner AL: p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. *Exp Cell Res.* 1996, *227(2)*: 171-81.
- (53) Yang G, Zhang Z, Liao J, Seril D, Wang L, Goldstein S, Yang CS: Immunohistochemical studies on Waf1p21, p16, pRb and p53 in human esophageal carcinomas and neighboring epithelia from a high-risk area in northern China. *Int J Cancer.* 1997, *72(5)*: 746-51.
- (54) Bos JL: Ras Oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989, *49*: 4682-89.
- (55) Capella G, Cronauer-Mitra S, Pienado MA, Perucho M: Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect.* 1991, *93*: 125-31.
- (56) Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein IB, Williams GM, Tomita N, Ronai Z: Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via "enriched" PCR amplification. *Oncogene.* 1991, *6*: 1079-83.
- (57) Levi S, Urbano-Ispizua A, Gill R, Thomas DM, Gilbertson J, Foster C, Marshall CJ: Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res.* 1991, *51*: 3497-3502.
- (58) Shi ST, Yang GY, Wang LD, Xue Z, Feng B, Ding W, Xing EP, Yang CS: Role of p53 gene mutations in human esophageal carcinogenesis: results from immunohistochemical and mutation analyses of carcinomas and nearby non-cancerous lesions. *Carcinogenesis.* 1999, *20(4)*: 591-7.
- (60) Shimada H, Takeda A, Arima M, Okazumi S, Matsubara H, Nabeya Y, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Kobayashi S, Ochiai T: Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2000, *89(8)*:1677-83.

- (61) Hagiwara N, Onda M, Miyashita M, Sasajima K: Detection of Circulating Anti-p53 Antibodies in Esophageal Cancer Patients. *J Nippon Med Sch.* 2000, *67(2)*:110-117.
- (62) Crisan D, Mattson JC: Retrospective DNA analysis using fixed tissue specimens. *DNA Cell Biol.* 1993, *12(5)*: 455-64.
- (63) Newton, CR.: PCR, 1994
- (64) Janice, A., Bourne, D. Handbuch der Immunperoxidase Färbemethoden.
- (65) Lord RV, O'Grady R, Sheehan C, Field AF, Ward RL: ras codon 12 mutations in Barrett's oesophagus and adenocarcinomas of the oesophagus and oesophagogastric junction. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000, *15(7)*: 730-6.
- (66) Galiana C, Lozano JC, Bancel B, Nakazawa H, Yamasaki H: High frequency of Ki-ras amplification and p53 gene mutations in adenocarcinomas of the human esophagus. *Mol Carcinog.* 1995, *14(4)*: 286-93.
- (67) Barch DH, Jacoby RF, Brasitus TA, Radosevich JA, Carney WP, Iannaccone PM: Incidence of Harvey ras oncogene point mutations and their expression in methylbenzyl nitrosamine-induced esophageal tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 1991, *12(12)*: 2373-7.
- (68) Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997, *88*: 323-31.
- (69) Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B: Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* 1998, *282*: 1497-501.
- (70) Ribeiro U Jr, Finkelstein SD, Safatle-Ribeiro AV, Landreneau RJ, Clarke MR, Bakker A, Swalsky PA, Gooding WE, Posner MC: p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma. *Cancer.* 1998, *83(1)*: 7-18.
- (71) Lam KY, Tsao SW, Zhang D, Law S, He D, Ma L, Wong J: Prevalence and predictive value of p53 mutation in patients with oesophageal squamous cell carcinoma: a prospective clinico-pathological study and survival analysis of 70 patients. *Int. J Cancer.* 1997, *74*: 212-19.

- (72) Hollstein MC, Metcalf RA, Welsh JA, Montesano R, Harris CC: Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, *87*(9): 958-61.
- (73) Wagata T, Shibagaki I, Imamura M, Shimada Y, Toguchida J, Yandell DW, Ikenaga M, Tobe T, Ishizaki K: Loss of 17p, mutation of the p53 gene, and overexpression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res*. 1993, *53*: 846-50.
- (74) Ikeda G, Isaji S, Chandra B, Watanabe M, Kawarada Y: Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*. 1999, *86*(8): 1396-405.
- (75) Sarbia M, Stahl M, Fink U, Willers R, Seeber S, Gabbert HE: Expression of apoptosis-regulating proteins and outcome of esophageal cancer patients treated by combined therapy modalities. *Clin Cancer Res*. 1998, *4*(12): 2991-7.
- (76) Itoshima T, Fujiwara T, Waku T, Shao J, Kataoka M, Yarbrough WG, Liu TJ, Roth JA, Tanaka N, Kodama M: Induction of apoptosis in human esophageal cancer cells by sequential transfer of the Wildtype p53 and E2F-1 genes: involvement of p53 accumulation via ARF-mediated MDM2 down-regulation. *Clin Cancer Res*. 2000, *6*(7): 2851-9.
- (77) Ikeguchi M, Saito H, Katano K, Kondou A, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N: Radiochemosensitivity and expression of p53 in patients with esophageal cancer treated by absolute noncurative resection. *Anticancer Res*. 1998, *18*(1B): 493-7.
- (78) Sturm I, Bosanquet AG, Hermann S, Guner D, Dörken B, Daniel PT: Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DANN-damaging chemotherapy. *Cell Death and Differentiation*. 2003, *10*: 477-84.
- (79) Daniel P, Sturm I, Hemmati PG, Güner D: Pharmakogenomik maligner Tumoren: Bedeutung von Zellzyklus- und Apoptosedefekten für Therapieansprechen und Krankheitsprognose. *Onkologe*. 2004, *10*: 46-54.
- (80) Schelwies K, Sturm I, Grabowski P, Scherubl H, Schindler I, Hermann S, Stein H, Buhr HJ, Riecken EO, Zeitz M, Dörken B, Daniel PT: Analysis of p53/BAX in

- primary colorectal carcinoma: low BAX protein expression is a negative prognostic factor in UICC stage III tumors. *Int J Cancer*. 2002, *99*: 589-96.
- (81) Daniel P: Zellzyklus und Apoptose: Molekulare Grundlagen von hämatologischen Neoplasien. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2003.
- (82) Beaupre DM, Kurzrock R: RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. *J Clin Oncol*. 1999, *17*: 1071-79.
- (83) Kuida K: Caspase-9. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000, *32(2)*: 121-4.
- (84) Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH: Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 1999, *68*: 383-424.
- (85) Gamielien W, Victor TC, Mugwanya D, Stepien A, Gelderblom WC, Marasas WF, Geiger DH, van Helden PD: p53 and p16/CDKN2 gene mutations in esophageal tumors from a high-incidence area in South Africa. *Int J Cancer*. 1998, *78(5)*: 544-9.
- (86) Tolbert DM, Noffsinger AE, Miller MA, DeVoe GW, Stemmermann GN, Macdonald JS, Fenoglio-Preiser CM: p53 immunoreactivity and single-strand conformational polymorphism analysis often fail to predict p53 mutational status. *Mod Pathol*. 1999, *12(1)*: 54-60.
- (87) Tumor Zentrum Berlin e.V., Robert-Koch-Platz 1, 10115 Berlin: Leitlinien für Ösophaguskarzinom
- (88) Informationszentrum für Standards in der Onkologie (ISTO), Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2002 für Ösophaguskarzinom
- (89) Tumorzentrum Freiburg, Klinikum der Albert-Ludwigs-Universität. Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Ösophaguskarzinoms. 2001. www.tumorzentrum-freiburg.de.
- (90) Sturm I, Kohne CH, Wolff G, Petrowsky H, Hillebrand T, Hauptmann S, Lorenz M, Dörken B, Daniel PT: Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol*. 1999, *17(5)*: 1364-74.

- (91) Sturm I, Bosanquet AG, Hermann S, Güner D, Dörken B, Dankiel PT: Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA damaging chemotherapy. *Cell Death Differ.* 2003, *10*: 477-484.
- (92) Bosanquet AG, Sturm I, Wieder T, Essmann F, Bosanquet MI, Head DJ, Dörken B, Daniel PT: Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, dadribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2002, *16*: 1035-1044.
- (93) Blagosklonny MV: Sequential activation and inactivation of G2 checkpoints for selective killing of p53-deficient cells by microtubule-active drugs. *Oncogene.* 2002, *21*: 6249-6254.
- (94) Gaducci A, Ciani C, Cosio S, Carnino F, Fanucchi A, Buttitta F, Conte PF, Genazzani AR: p53 status is neither a predictive nor a prognostic variable in patients with advanced ovarian cancer treated with a paclitaxel-based regimen. *Anticancer Res.* 2000, *20*: 4793-4799.
- (95) Sjöström J, Blomqvist C, Heikkilä P, Boguslawski KV, Räsänen-Sokolowski A, Bengtsson NO, Mjaaland I, Malmström P, Ostenstad B, Bergh J, Wist E, Valvere V, Saksela E: Predictive value of p53, mdm-2, p21, and mib-1 for chemotherapy response in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000, *6*: 3103-3110.
- (96) Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C, Schlagbauer-Wadl H, Mittlbock M, Gnant M, Steger G, Jakesz RT: P53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin cancer Res.* 2000, *6*: 50-56.
- (97) Mrozek A, Petrowsky H, Sturm I, Kraus J, Hermann S, Hauptmann S, Lorenz M, Dörken B, Daniel PT: Combined p53/Bax mutation results in extremely poor prognosis in gastric carcinoma with low microsatellite instability. *Cell Death Differ.* 2003, *10(4)*:461-7.
- (98) Rau B, Sturm I, Lage H, Berger S, Schneider U, Hauptmann S, Wust P, Riess H, Schlag PM, Dörken B, Daniel PT: Dynamic expression profile of p21WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J Clin Oncol.* 2003, *21(18)*:3391-401.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Ort, Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Lisa, Katinka, Barbara Holper
Geburt 15.10.1977 in München
Familienstand ledig
Anschrift Sudenburger Str. 4
D – 39112 Magdeburg

Schulbildung

1984-1997 Oskar-von-Miller- und Luise-Gymnasium, München; Abitur 1997

Hochschulstudium

1998–2004 Studium der Humanmedizin, Charité, Humboldt-Universität Berlin
2000 Physik-Zweitstudium, Humboldt-Universität Berlin (1 Semester)
04/2000 Ärztliche Vorprüfung/Physikum
03/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2004 Approbation als Ärztin

Promotion

2000–2003 Promotionsthema: „Mutationsanalyse von K-ras und p53 an Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus“, Leitung Prof. Dr. P. Daniel, Experimentelle Molekulargenetik, Robert-Rössle-Klinik, Berlin-Buch

Prkatisches Jahr

2003 Pädiatrie, Faculté de Médecine Necker-Enfants Malades, Université René Descartes, Paris, Frankreich (8 Wochen)
Pädiatrie, Great Ormond Street Hospital for Children, University College London, Großbritannien; (8 Wochen)
Neurochirurgie, Allgemein-/Gefäßchirurgie, Akademisches Lehrkrankenhaus Dresden-Neustadt, TU-Dresden (16 Wochen)
2004 Innere Medizin, Abteilung für Rheumatologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin (16 Wochen)

Assistenzärztin

- 07/ 2004 Assistenzärztin im Institut für Arbeitsmedizin, Direktor: o.Prof. Dr. med. Schäcke, Zentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften der Berliner Hochschulmedizin, Charité-Universitätsmedizin, Humboldt-Universität zu Berlin & Freie Universität Berlin, Ostpreußendamm 111, 12207 Berlin
- 01/2005 Assistenzärztin in Neurologie II, Klinik für Neurologie II, Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Heinze, Otto-von-Guericke-Universität, Leipziger Str. 44, D-39120 Magdeburg
- 01/2006 Assistenzärztin in Hämatologie/Onkologie, Klinik für Innere Medizin, Direktor: Frau Prof. Dr. med. Franke, Otto-von-Guericke-Universität, Leipziger Str. 44, D-39120 Magdeburg