UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Operative Medizin
Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki

Der 290Arg/Arg Polymorphismus im ECRG1 ist ein prognostischer Faktor für das Überleben der Patienten mit Ösophaguskarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Shanly Shahmiri
aus Teheran - Iran

Hamburg 2011

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.09.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. T. Strate

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. M. Bockhorn

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. G. Sauter

Inhaltsverzeichnis

1. Fragestellung ... 1
2. Einleitung ... 2
3. Material und Methoden ... 4
3.1 Patienten ... 4
3.2 Klinischpathologische Daten ... 4
3.3 DNA Extraktion ... 4
3.4 DNA- Amplifikation ... 5
3.4.1 Herstellung einer 1,25 mM dNTP- Lösung ... 5
3.4.2 Primer ... 6
3.4.3 Polymerase Kettenreaktion ... 6
3.5 Gelelektrophorese ... 7
3.5.1 Herstellung eines 2,5 %-igen Agarose-Gels ... 7
3.5.2 Durchführung der Gelelektrophorese ... 8
3.6 RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) ... 9
3.7 Statistische Auswertungen ... 10
4. Ergebnisse ... 11
4.1 Patientendaten ... 11
4.2 DNA-Polymorphismus ... 15
4.3 Korrelation zwischen DNA- Polymorphismus und den Patientendaten ... 17
4.4 Überlebensanalyse ... 20
4.4.1 DNA- Polymorphismus im ECRG1 (290 Arg/Arg, 290 Arg/Gln, 290 Gln/Gln) ... 20
4.4.2 DNA- Polymorphismus im ECRG1 (290 Arg/Arg / Präsenz Gln Allele) ... 21
4.4.3 Alter und Überleben der Patienten ... 22
4.4.4 N-Stadium und Überleben der Patienten ... 23
4.4.5 Tumorinvasionstiefe und Überleben der Patienten ... 24
4.4.6 Grading und Überleben der Patienten ... 25
4.4.7 Geschlecht und Überleben der Patienten ... 26
4.4.8 Histomorphologie und Überleben der Patienten ... 27
4.5. Cox-Regression ... 28
4.5.1 DNA-Polymorphismus ... 28
4.5.2 Präsenz eines Gln Allels ... 29
4.6 DNA-Polymorphismus ist ein prädiktiver Faktor ... 30
5. Diskussion ... 31
5.1 Ösophaguskarzinom ... 31
5.1.1 Anatomie und Physiologie des Ösophagus ... 31
5.1.2 Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms ... 33
5.1.3 Pathogenese und die histologische Einteilung des Ösophaguskarzinoms ... 33
5.1.4 Symptomatik und klinisches Bild ... 34
5.1.5 Diagnose des Ösophaguskarzinoms ... 35
5.1.6 Tumormarker ... 37
5.1.6.1 Tumormarker des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus ... 38
5.1.6.2 Tumormarker des Adenokarzinoms des Ösophagus ... 39
5.1.7 Therapeutische Ansätze beim Ösophaguskarzinom ... 40
5.1.7.1 Chirurgische Therapie ... 40
5.1.7.2 Radiotherapie ... 43
5.1.7.2.1 Präoperative (neoadjuvante) Radiotherapie ... 44
5.1.7.2.2 Postoperative Strahlenbehandlung ... 44

5.1.7.2.3 Palliative Strahlenbehandlung 45
5.1.7.3 Chemotherapie 45
5.1.7.3.1 Neoadjuvante (präoperative) Chemotherapie 45
5.1.7.3.2 Postoperative (adjuvante) Chemotherapie 46
5.1.7.4 Präoperative (neoadjuvante) kombinierte Radio-/Chemotherapie 47
5.1.7.5 Palliative Verfahren 48
5.1.8 Prognose des Ösophaguskarzinoms 50
5.2 Diskussionen von Material und Methodik 51
5.2.1 DNA Extraktion 51
5.2.2 Polymerase Kettenreaktion 51
5.2.2.1 Geschichte der PCR 51
5.2.2.2 Prinzip der PCR 52
5.2.3 Gelelektrophorese 54
5.2.3.1 Prinzip der Gelelektrophorese 54
5.2.4 RFLP 55
5.2.5 Statistische Auswertung 56
5.3 Molekularbiologische Daten über das Ösophaguskarzinom 56
5.3.1 Bisherige Erkenntnisse 56
5.3.2 ECRG 59
5.4 Diskussion der Ergebnisse 62
5.4.1 DNA- Polymorphismus und die Ergebnisse dieser Studie 62
5.4.2 Diskussion der klinischpathologischen Daten 63
5.4.3 Vergleich der Studien 63
6. Zusammenfassung 67
7. Literaturverzeichnis 68
8. Danksagung 79
9. Lebenslauf 80
10. Eidesstattliche Versicherung 81

Abkürzungsverzeichnis

ECRG	Esophageal Cancer Related Gene
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SSCP-PCR	Single-Strand Conformation Polymorphism PCR
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA
Arg	Arginin
Gln	Glutamin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
BPB	Bromphenolblau
TBE-Puffer	TRIS-BORAT-EDTA-Puffer
bp	Basenpaare
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
CI	confidence interval
RR	risk ratio
UICC	Union internationale contre le cancer
STR	Short Tandem Repeat
CEA	Carcinoembryogenic Antigen
SCC	Squamos-cell-carcinoma-Antigen
CA 72-4	Carbohydrate Antigen 72-4
CYFRA 21-1	Cytokeratinfragment 21-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
PEG	perkutane endoskopische Gastrostomie
PSG	perkutane sonografisch gesteuerte Gastrostomie
EGRF	epidermal growth factor receptor
COX2	Cyclooxygenase-2

TGF β	Transforming Growth Factor
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
p53	Protein 53
Miz-1	Myc- interacting zinc finger protein

1. Fragestellung

ECRG1 (Esophageal Cancer Related Gene 1) ist ein vor kurzem entdecktes Tumorsuppressorgen, das einen Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation und auf den Zellzyklus hat. Die vorhergehenden Analysen mit Hilfe der Reverse Transkiptase-PCR und des Northern-Blot zeigten, dass ECRG1 im gesunden Ösophagus, in Leber, Colon und Lunge vorhanden ist. Eine Unterregulation des ECRG1 wurde in Tumoren und besonders im Ösophaguskarzinom nachgewiesen (Katlik et al. 1990). Die Hochregulation des ECRG1 in vivo und vitro zeigte eine Hemmung der Tumorzellproliferation (Wang et al. 2000).

Mutationen und genetische Polymorphismen in der codierenden Sequenz des Gens können Funktionsänderungen verursachen. In einer vor kurzem durchgeführten Studie wurde ein Arg290Gln variantes Allel im Exon 8 des ECRG1 durch SSCP-PCR (Single-strand Conformation Polymorphism PCR) und DNA Sequenzierung gekennzeichnet, das für die Aminosäuren Arginin(Arg) oder Glutamin(Gln) im Codon 290 codiert. Dieses Allel ist in der Asp Serin-Protease Domän des ECRG1 lokalisiert. Ein Single Nukleotid Polymorphismus (Arg290Gln), der in der Entwicklung des Ösophaguskarzinoms eine Rolle spielen könnte, wurde in der codierenden Region des ECRG1 identifiziert (Shiokawa et al. 2005, Li et al. 2006). Der SNP (Single Nucleotide Polymorphism) im Exon 8 führt zu einem Arg→Gln Aminosäure Austausch am Codon 290. Der Polymorphismus im ECRG1 führt zu drei Varianten (290Arg/Arg, 290Arg/Gln und 290Gln/Gln). In einer Studie wurde der Zusammenhang zwischen diesen Polymorphismen im ECRG1 und dem Auftreten eines Ösophaguskarzinoms in der chinesischen Bevölkerung überprüft. Bei Patienten mit einem 290Gln Allel, d.h. bei den Patienten mit einem 290Arg/Gln oder 290Gln/Gln Genotyp, wurde ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Ösophaguskarzinoms nachgewiesen (Li et al. 2006). In der hier vorliegenden Studie wurde die Rolle des Single Nukleotid Polymorphismus (Arg290Gln) im ECRG1 in der europäischen Bevölkerung untersucht. Das Ziel der vorliegenden Studie war die mögliche Rolle des Nukleotid Polymorphismus (Arg290Gln) im ECRG1 bei der Entstehung des Ösophaguskarzinoms und seinen Einfluss auf die Prognose und das Überleben der Patienten mit Ösophaguskarzinom nach der totalen operativen Resektion zu überprüfen. Außerdem wurde der Einfluss klinischpathologischer Daten wie Alter, Geschlecht, Tumorinvasionstiefe, Lymphknotenmetastasierung und die histologische Differenzierung auf die Prognose der Patienten untersucht.

2. Einleitung

Das Ösophaguskarzinom ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen weltweit. Die Inzidenz des Ösophaguskarzinoms zeigt große geographische Unterschiede. Sowohl zwischen unterschiedlichen Ländern als auch innerhalb der verschiedenen Regionen eines Landes sieht man große Inzidenzschwankungen. Die bekanntesten Risikofaktoren sind Alkohol- und Nikotinabusus, scharfe Nahrungsmittel und ein Mangel an Vitaminen und Spurenelementen. Die chronische Refluxösophagitiden, Narbenstrikturen nach Verätzungen, das Plummer-Vinson-Syndrom und die Achalasie stellen die Präkanzerosen für das Ösophaguskarzinom dar.

Trotz fortgeschrittener chirurgischer Verfahren und Einsatz multimodaler Therapiekonzepte hat das Ösophaguskarzinom eine schlechte Prognose. Zum Zeitpunkt der ersten Vorstellung beim Arzt sind bereits 50 % der Patienten inoperabel und 60 % der Patienten inkurabel (Katlik et al. 1990, Mayoral et al. 1999). Diese häufig auftretende schlechte Prognose des Ösophaguskarzinoms beruht auf einer ausgedehnten lokalen Invasion und der schnellen Metastasierung in die benachbarten Lymphknoten.

Das Alter, die Lymphknotenmetastasierung, die Tumorinvasionstiefe, das Tumorstadium und das Grading des Tumors sind die bereits bekannten Prognosefaktoren. Neben diesen klinischpathologischen Daten wurde der Einfluss verschiedener molekularbiologischer Markern bei der Entstehung und Prognose des Ösophaguskarzinoms untersucht; bisher wurden jedoch nur wenige signifikante Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen gewonnen (Kuo et al. 2003, Kulke et al. 2005).

Studien in Regionen mit hoher Inzidenz haben ein vermehrtes Auftreten des Ösophaguskarzinoms bei Familienmitgliedern nachgewiesen. Es wurde angenommen, dass genetische Faktoren eine wichtige Rolle in der Ätiologie des Ösophaguskarzinoms spielen. Genetische Veränderungen in den Onkogenen und in den Tumorsuppressorgenen kommen häufig bei Patienten mit Ösophaguskarzinom vor. Die zu Grunde liegenden Mechanismen, die zur Transformation des normalen Ösophagusepithels zu malignen Tumorzellen führen, sind bisher nicht ausreichend verstanden. Viele kürzlich durchgeführte Studien über das Ösophaguskarzinom haben sich auf die Identifizierung der ECRG konzentriert, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Ösophaguskarzinoms spielen sollen. Mit der Hilfe der mRNA Differenzial Display Methode wurde das ECRG1 durch Vergleich der Genexpression

zwischen dem normalen Ösophagusepithel mit Ösophagustumorzellen identifiziert (Su et al. 1998, Liu et al. 1999).

3. Material und Methoden

3.1 Patienten

Die Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg hat diese Studie genehmigt. Die Studie untersucht 107 im Zeitraum zwischen 1997 und 2005 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie wegen eines Ösophaguskarzinoms operierte Patienten. In allen untersuchten Fällen war ein Ösophaguskarzinom durch histopathologische Untersuchungen festgestellt worden. Eine komplette Resektion des Tumorgewebes wurde bei allen Patienten durchgeführt. Die histopathologischen Untersuchungen zeigten tumorfreie Resektionsränder (R0). Die Tumorklassifikation und das Staging erfolgten nach der TNM-Klassifikation. Die Blutproben der Patienten wurden untersucht. Außerdem wurde die DNA von 100 gesunden Personen, die Knochenmark für Transplantationszwecke gespendet hatten, extrahiert und untersucht.

3.2 Klinischpathologische Daten

Alle Daten einschließlich des Geschlechts, der Histologie, der Tumorinvasionstiefe, der Lymphknotenmetastasierung, des Gradings und des Krankheitsstadiums wurden den klinischen und pathologischen Protokollen entnommen. Die für die Studie notwendigen Follow-up-Daten sind durch Überprüfung der Krankenhausunterlagen sowie durch Kontakt zu den zuständigen Hausärzten oder den Patienten selbst gewonnen worden. Die Gesamtüberlebenszeit des jeweiligen Patienten wurde vom Tag der operativen Resektion des Tumors (R0- Resektion) bis zum Tod des Patienten oder bis zur letzten Verlaufskontrolle berechnet.

3.3 DNA Extraktion

Am Tag der Operation wurde den Patienten jeweils 5 ml Blut abgenommen. Die DNA wurde von den Leukozyten extrahiert und gemäß standardisierten Protokollen mit Hilfe der QIAamp (Qiagen, Hilden, Germany) gereinigt. In der durchgeführten Studie war die DNA schon extrahiert, so dass mit der Polymerase Kettenreaktion weitergearbeitet werden konnte.

3.4 DNA- Amplifikation

Die extrahierte DNA wurde mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert. Zur Durchführung der PCR wurde zuerst einen Reaktionsansatz vorbereitet. Der so genannte Mastermix enthält alle Komponenten, die für die Synthese der DNA in vitro notwendig sind. Diese Komponenten sind vor allem Pufferlösung, Magnesiumchlorid, die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), die synthetischen Oligonucleotide (Primer) und die Taq-DNA-Polymerase. Wenige Mikroliter Nucleinsäureextrakt (DNA-Matrize) wird zum Mastermix gegeben. Zur Herstellung des Ansatzes mischt man 4,0 µl 1,25 mM dNTP- Mix, 0,25 µl Taq-Polymerase, 0,5 µl Vorwärts- Primer, 0,5 µl Rückwärts- Primer, 2,5 µl Puffer IV, 15 mM $MgCl^2$ und 16,25 µl H^2O zusammen.

Komponente	**Volumina**	
1.25 mM dNTP-Mix (invitrogen™)	4,0	µl
Taq-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH)	0,25	µl
Vorwärts- Primer (SIGMA-GENOSYS)	0,5	µl
Rückwärts- Primer (SIGMA-GENOSYS)	0,5	µl
Puffer IV mit 15 mM $MgCl^2$ (ABgene)	2,5	µl
H^2O	16,25	µl
DNA	1,0	µl
Ansatzvolumen	25,0	µl

3.4.1 Herstellung einer 1,25 mM dNTP- Lösung

Die 1,25 mM dNTP- Lösung wird durch Vermischung von 100 µl dTTP 100 mM (invitrogen™), 100 µl dCTP 100 mM (invitrogen™), 100 µl dGTP 100 mM (invitrogen™) und 100 µl dATP 100 mM (invitrogen™) hergestellt. Insgesamt bekommt man 400 µl 25 mM dNTP- Lösung. Die 25 mM dNTP- Lösung wird dann 1:20 verdünnt. Hierzu gibt man zu 25 µl dNTP- Lösung (25mM) 380 µl Aqua dest.. Dies resultiert in einer 400 µl 1,25 mM dNTP-Lösung.

Tab. 1 Herstellung einer 1,25 mM dNTP- Lösung

Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	**Volumen**
Desoxythymidintriphosphat (dTTP) 100 mM (invitrogen™)	100 µl
Desoxycytosintriphosphat (dCTP) 100 mM (invitrogen™)	100 µl
Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)100 mM (invitrogen™)	100 µl
Desoxyadenosintriphosphat (dATP) 100 mM (invitrogen™)	100 µl
Gesamt: dNTP- Lösung 25 mM	400 µl
Verdünnung 1:20	
dNTP- Lösung (25mM)	25 µl
Aqua dest.	380 µl
Gesamt: 1,25 mM dNTP- Lösung	400 µl

3.4.2 Primer

In der durchgeführten Studie wurden Primer der Firma SIGMA-GENOSYS verwendet. Die verwendeten Primer hatten die folgenden Sequenzen:

Oligo Name	Sequenz (5´-3´)
ECR1-F der Firma SIGMA-GENOSYS	CAGGGCTTAGCGCTCTGTTA
ECR1-R der Firma SIGMA-GENOSYS	GCTCATATACTTTGGGCAGCTT

Die Primer produzieren jeweils ein Fragment aus 354 Basenpaaren.

3.4.3 Polymerase Kettenreaktion

Bei Durchführung einer PCR sollte jegliche Kontaminationen der Proben möglichst vermieden werden. Bei Herstellung der Reaktionsansätze sind deshalb Handschuhe zu tragen. Außerdem sind alle in der PCR benutzten Substanzen vor Gebrauch gut zu vermischen. Von dem vorbereiteten Reaktionsansatz im Eppendorf Tube 0,5 ml (eppendorf®) wurde jeweils 24µl in 8- Tube Strip 0,2 ml (Micro Amp™) pipettiert und sodann dazu 1,0 µl von der vorher extrahierten DNA gegeben. Zusätzlich wurde eine Reaktion mit einer Negativkontrolle durchgeführt. Hierzu wurde die DNA durch ein entsprechendes Volumen an H_2O ersetzt.

Bei der Durchführung der PCR ist darauf zu achten, dass die Tubes gut verschlossen sind, um zu verhindern, dass der Inhalt der Tubes in dem PCR-Gerät verdampft. Die PCR wurde mit dem Thermocycler (Biometra®) durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

Tab. 2 PCR-Schema

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl
Pretreatment/ DNA-Denaturierung	94 ° C	2 Minuten	1
Denaturierung Annealing DNA- Synthese	94 ° C 58 ° C 72 ° C	30 Sekunden 30 Sekunden 30 Sekunden	35
Posttreatment/ Elongation	72 ° C	7 Minuten	1

3.5 Gelelektrophorese

Zur bildlichen Darstellung der in der PCR gewonnenen Amplifikate erfolgte eine Gel-Elektrophorese in einem 2,5 %-igen Agarose-Gel.

3.5.1 Herstellung eines 2,5 %-igen Agarose-Gels

Zur Herstellung eines 2,5 %-igen Agarose-Gels wird ein Kunststoffschlitten an beiden offenen Seiten mit einem Klebeband abgeklebt. Die passenden Kämme sind nach der gewünschten Trennstrecke auszuwählen. Der verwendete Erlmeyerkolben ist sodann mit 150 ml TBE-Puffer (TRIS-BORAT-EDTA-Puffer) aufzufüllen. Dazu gibt man 3,75 g Agarose (Seakem®). Der Ansatz wird mit einem Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt. Die Agarose-Lösung wird sodann in der Mikrowelle bei 600 W aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Nach einer kurzen Abkühlung der Agarose-Lösung werden 8,0 µl Ethidiumbromid zu der Agarose-Lösung pipettiert. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der zum Nachweis von Nukleinsäuren benutzt wird. Die Ethidiumbromid-Moleküle schieben sich zwischen benachbarte Basenpaare der DNA-Doppelhelix (Interkalation) und verändern dabei ihr Absorptionsspektrum. Bei ultraviolettem Licht werden die Stellen im Agarose-Gel sichtbar, an denen sich Nukleinsäuren befinden. Das Gel wird in die schon vorbereiteten

Gelträger gegossen. Nach dem Erstarren des Gels werden die Kämme entfernt und das Gel wird in die vorgesehenen Größen geschnitten.

3.5.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Zur bildlichen Darstellung der in der PCR gewonnenen Amplifikate erfolgte eine Gelelektrophorese in einem 2,5 %-igen Agarose-Gel.
Um eine Gelelektrophorese durchzuführen werden folgende Materialien benötigt:

- die amplifizierte DNA
- Marker VIII 19-1114 bp (ROCHE), zur Größenbestimmung und Quantifizierung der DNA- Stränge, die untersucht werden sollen
- TBE-Puffer (TRIS-BORAT-EDTA-Puffer)
- Agarose-Gel 2,5 %
- Bromphenolblau (ein niedermolekularer Farbstoff)
- Ethidiumbromid (Nukleinsäure-Farbstoff)

Nach der erfolgten Amplifikation werden jeweils 10 µl der Proben mit 2 µl Bromphenolblau (BPB) vermischt. Als DNA-Leiter wurde hier 1,0 µl Marker VIII (ROCHE), 9,0 µl TBE-Puffer und 2,0 µl BPB benutzt. Das Gel wird in die Laufkammer mit TBE-Puffer gelegt. Dabei ist darauf zu achten, dass alle Geltaschen ausreichend mit Flüssigkeit bedeckt sind. Nach einem festen Schema wird je 12 µl der Mischung von links nach rechts in die vorbereiteten Gel-Kammern eingefüllt. Die Elektrophorese wird über 30 Minuten bei 200 V, 100 W und 150 mA durchgeführt. Nach 30 Minuten wird das Agarose-Gel unter UV-Licht bestrahlt. Bei allen in diese Studie aufgenommenen Proben wurde im UV-Licht ein Signal bei 400 bp festgestellt.

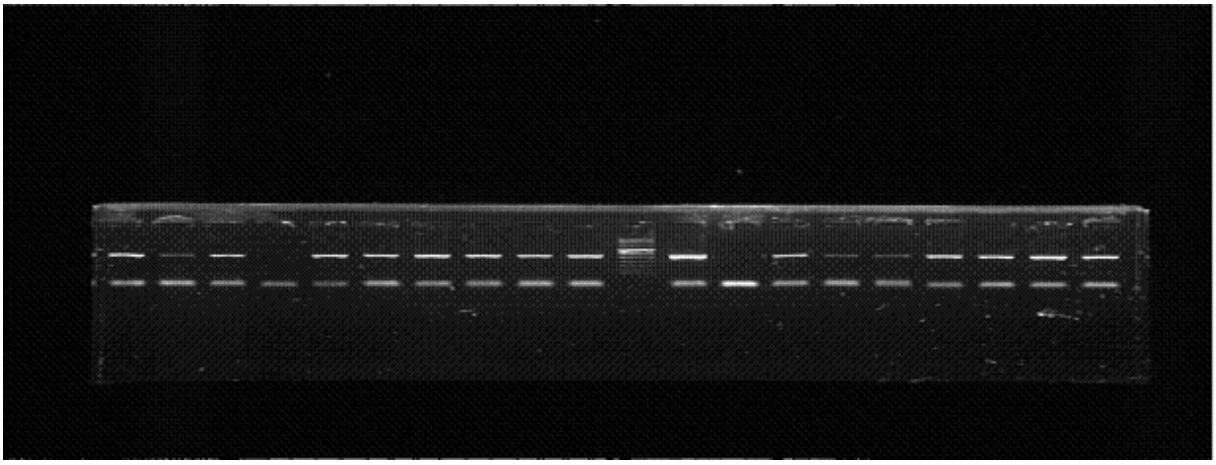

Abb. 1 Gelelektrophorese der PCR- Produkte

3.6 RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)

Die einzelnen Proben werden, wie oben beschrieben, durch die PCR amplifiziert und dann mit dem benötigten Enzym zusammen pipettiert. Auch hier muss jegliche Kontamination der Proben vermieden werden. Für die Herstellung der Reaktionsansätze sind 10 µl von den jeweiligen PCR- Produkten in 8- Tube Strip 0,2 ml (Micro Amp™) zu pipettieren. Dazu wird 1 µl Restriktionsenzym MspI (Biolabs ® New England) hinzugefügt. Restriktionsenzyme, genauer Restriktionsendonukleasen, sind Enzyme, welche DNA innerhalb einer Sequenz schneiden können. Der 8-Tube Strip wird mit einem 8-Cap Strip (Micro Amp™) geschlossen. Hier ist es auch wieder wichtig, dass die Tubes gut verschlossen sind, um ein Verdampfen des Inhalts zu verhindern. Die 8-Tube Strips mit den Reaktionsansätzen werden in Thermocycler (Biometra®) gestellt. Der Verdau dauert bei 37°C eine Stunde.

Nach einem festen Schema wurde je 10 µl der Reaktionsansätzen von links nach rechts in die vorbereiteten Gel-Kammern eingeführt. Dazu gibt man in jede Geltasche 2 µl Bromphenolblau. Die sich anschließende Elektrophorese dauert über 30 Minuten bei 200 V, 100 W und 150 mA. Nach 30 Minuten ist das Agarose-Gel mit UV-Licht zu bestrahlen.

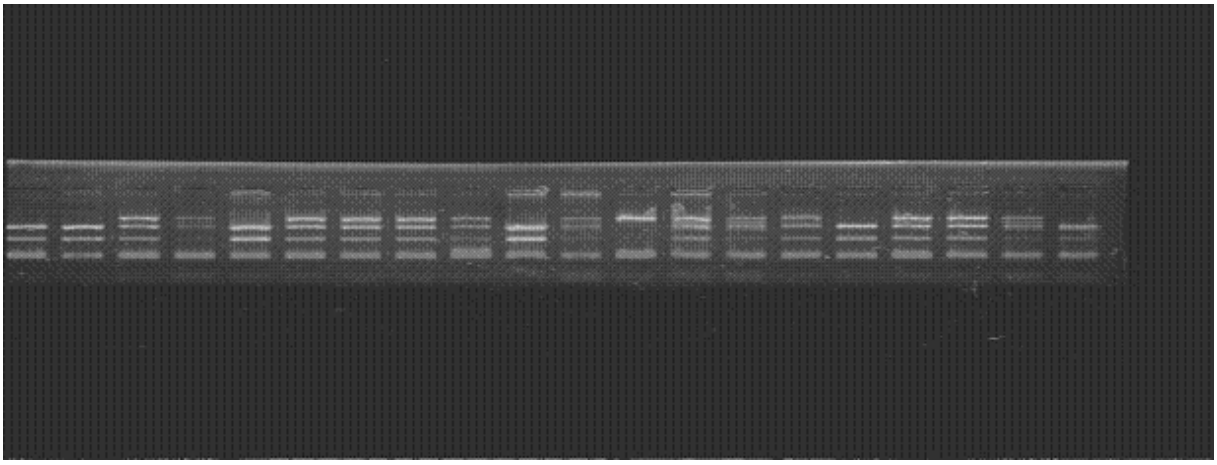

Abb. 2 Gelelektrophorese des ECRG1

3.7 Statistische Auswertungen

Für die statistische Analyse dieser Arbeit wurde SPSS® für Windows® (Version 11.5.1) (SPSS Inc., Chicago, IL) benutzt. Bei der statistischen Auswertung wurde für alle Variablen Kreuztabellen generiert und der Fischer-Test oder Chi-Quadrat-Test angewendet. Im Anschluss folgte die multivariante Cox-Regressionsanalyse. Die Überlebensanalyse wurde mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet und mit dem Log-Rang-Test analysiert. Mit der Hilfe des Log-Rang-Tests und der Kaplan-Meier Methode wurde die Rolle der einzelnen Faktoren für die Prognose und Überlebenszeit der Patienten untersucht. Ein Signifikanzniveau wurde für $P<0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Patientendaten

107 Patienten mit Ösophaguskarzinom wurden retrospektiv für diese Studie ausgesucht. Die Patienten wurden im Zeitraum zwischen 1997 und 2005 an dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie aufgrund eines Ösophaguskarzinoms operiert. Das Vorliegen eines Ösophaguskarzinoms wurde durch histopathologische Untersuchungen in allen Fällen bestätigt. Bei allen Operationen wurde eine R0-Resektion des Primärtumors angestrebt und histopathologisch nachgewiesen. Die histopathologischen Untersuchungen zeigten tumorfreie Resektionsränder (R0). Alle Daten einschließlich des Geschlechts, der Histologie, der Tumorinvasionstiefe, der vorliegenden Lymphknotenmetastasen, des Gradings und des Krankheitsstadiums wurden den klinischen und pathologischen Protokollen der betroffenen Patienten entnommen. Die für die Studie verwendeten Follow-up-Daten wurden unter Zuhilfenahme der Krankenhausunterlagen und durch Kontakt zu den Hausärzten oder den Patienten selbst gewonnen. Bei der Bewertung der Ergebnisse mussten 5 Patienten von der Studie ausgeschlossen werden, da keine Follow-up-Daten zu ermitteln waren.

50 in dieser Studie aufgenommene Patienten waren jünger als 62 Jahre und 57 Patienten waren älter als 62 Jahre. Das mittlere Alter der Patienten lag bei 65 Jahren.
Tabelle 3 zeigt die Altersverteilung der Patienten in dieser Studie.

Tab. 3 Altersverteilung der Patienten

Alter	Zahl der Patienten	Prozent %
≤ 62	50	46,7 %
> 62	57	53,3 %

Von den 107 untersuchten Patienten mit Ösophaguskarzinom waren 87 männliche und 20 weibliche Patienten.
Tabelle 4 zeigt die Geschlechtsverteilung der ausgewählten Patienten in dieser Studie.

Tab. 4 Geschlechtsverteilung der Patienten

Geschlecht	Zahl der Patienten	Prozent %
Männlich	87	81,3 %
Weiblich	20	18,7 %

Bei den Tumoren handelte es sich histomorphologisch um 66 Plattenepithelkarzinome und 41 Adenokarzinome.
Tabelle 5 zeigt die histomorphologische Einteilung des Ösophaguskarzinoms bei den ausgewählten Patienten.

Tab. 5 Histopathologische Einteilung

Histopathologie	Zahl der Patienten	Prozent %
Adenokarzinom	41	38,3 %
Plattenepithelkarzinom	66	61,7 %

Zudem wurden durch histopathologische Untersuchungen die Eindringtiefe des Tumors und das Stadium der Tumore klassifiziert. T bezeichnet die Ausdehnung des Primärtumors. Die Tumortiefe wird in vier Stadien eingeteilt: Der Tumor ist auf Lamina propria und submukosa (PT1) begrenzt, der Tumor infiltriert Muscularis propria (PT2), der Tumor infiltriert Adventitia (PT3), der Tumor infiltriert extraösophageale Strukturen (PT4). PT1 wurde bei 19, PT2 bei 30, PT3 bei 46 und PT4 bei 12 Patienten nachgewiesen.
Tabelle 6 zeigt die Verteilung der Patienten nach der Invasionstiefe des Tumors.

Tab. 6 Die Einteilung der Patienten nach der Tiefe des Karzinoms

Tumor Tiefe	Zahl der Patienten	Prozent %
PT1	19	17,8 %
PT2	30	28,0 %
PT3	46	43,0 %
PT4	12	11,2 %

Die histologische Aufarbeitung der Resektate durch die Pathologen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf ergab, dass 31 Patienten primär N0 (kein nachweisbarer Lymphknotenbefall) aufwiesen, während bei 76 Patienten Lymphknotenmetastasen (N1) nachgewiesen wurden.
Tabelle 7 zeigt die Verteilung der Patienten nach dem Befall der Lymphknoten.

Tab. 7 Einteilung der Patienten nach Lymphknotenmetastasierung

Lymphknotenmetastasen	**Zahl der Patienten**	**Prozent %**
PN0	31	29,0 %
PN1	76	71,0 %

Außerdem wurde das histopathologische Tumorgrading des jeweiligen Ösophaguskarzinoms bestimmt. Das Grading-System macht eine Aussage über die Malignität des Tumors und wird im Zusammenhang mit der Beurteilung des Tumors benutzt. Das Ösophaguskarzinom wird in hoch differenziert (G1), mäßig differenziert (G2) und wenig differenziert (G3) klassifiziert. In dieser Studie befanden sich 10 Patienten im G1 Stadium, 47 Patienten im G2 Stadium und 50 Patienten im G3 Stadium.
Tabelle 8 zeigt die Verteilung der Patienten nach dem Grading-System.

.

Tab. 8 Grading-System

Grading- System	**Zahl der Patienten**	**Prozent %**
G1	10	9,3 %
G2	47	43,9 %
G3	50	46,7 %

4.2 DNA-Polymorphismus

Die DNA wurde nach Vervielfältigung durch die Polymerasekettenreaktion mit dem Restriktionsenzym Msp1 abgebaut. Msp1 erkennt den Arg290Gln Polymorphismus. Ein Arg290Gln variantes Allel im Exon 8 des ECRG1 wurde in vorherigen Studien identifiziert (Shiokawa et al. 2005 und Li et al. 2006). Durch die SSCP-PCR wurde das Vorliegen des SNPs in Exon 8 nachgewiesen. Der SNP im Exon 8 des ECRG1 resultierte in einem Arg→Gln Aminosäure Wechsel im Codon 290. Durch den Aminosäure Wechsel ergeben sich drei Genotypen: 290Arg/Arg, 290Arg/Gln und 290Gln/Gln. Das Fragment aus 354 bp repräsentiert den Genotyp 290Gln/Gln. Die Variation 290 Arg/Arg hat zwei Fragmente aus 232 bp und 122bp. Der heterozygote Genotyp 290 Arg/Gln hat drei Fragmente aus 122 bp, 232 bp und 354 bp (Li et al. 2006).
Abbildung 3 zeigt die RFLP- PCR Analyse von ECRG1- Genotypen in der DNA nach der Abbau mit dem Restriktionsenzym Msp1.

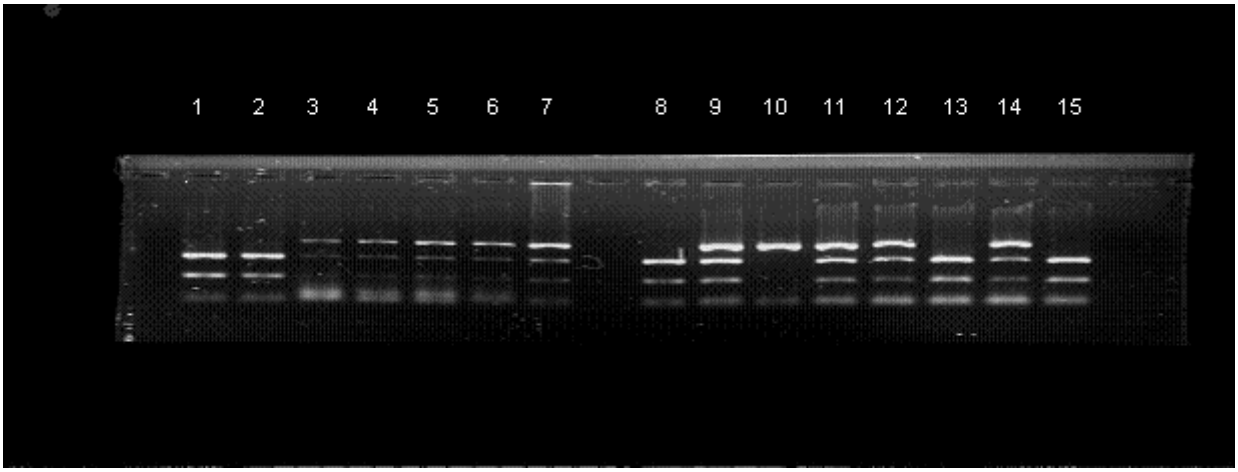

Abb. 3 Gelelektrophorese des ECRG1. Die Nummer 1, 2, 8, 13 und 15 zeigen zwei Fragmente und so den Genotyp Arg/Arg, die Nummer 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12 und 14 zeigen alle drei Fragmente, d.h. den Genotyp Arg/Gln und die Nummer 10 zeigt nur ein einziges Fragment und somit den Genotyp Gln/Gln.

Die Auswertung der im Labor erhaltenen Ergebnisse ergab folgende Resultate: Der Genotyp 290Arg/Arg wurde bei 51 Patienten (47,7 %), der Genotyp 290Arg/Gln bei 49 (45,8 %) und der Genotyp 290Gln/Gln bei 7 Patienten (6,5 %) gefunden. Anders ausgedrückt hatten 56 Patienten (52,3 %) mindestens ein Gln Allel.
Die Tabelle 9 zeigt die DNA- Polymorphismus Verteilung innerhalb der untersuchten Patienten.

Tab. 9 DNA- Polymorphismus Verteilung

Zahl der Patienten	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	Gln Allel
107 (100,0 %)	51 (47,7 %)	49 (45,8 %)	7 (6,5 %)	56 (52,3 %)

4.3 Korrelation zwischen DNA- Polymorphismus und den Patientendaten

Wie oben beschrieben waren 50 der in diese Studie aufgenommenen Patienten jünger und 57 älter als 62 Jahre. Von den 50 Patienten, die jünger als 62 Jahre waren, wurde bei 23 der Genotyp Arg/Arg, bei 23 der Genotyp Arg/Gln und bei 4 der Genotyp Gln/Gln nachgewiesen. 57 Patienten waren älter als 62 Jahre. Von diesen hatten 28 den Genotyp Arg/Arg, 26 den Genotyp Arg/Gln und 3 den Genotyp Gln/Gln. Es zeigte sich unter Verwendung des Chi-Quadrat-Testes ein signifikanter Zusammenhang (P=0,034).

Tab. 10 Verteilung der Genotypen Anhand des Alters der Patienten

Alter	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln
≤ 62	23 (46,0 %)	23 (46,0 %)	4 (8,0 %)
≥ 62	28 (49,1 %)	26 (45,6 %)	3 (5,3 %)

Von 51 Patienten mit dem Genotyp Arg/Arg waren 43 Männer und 8 Frauen. Der Genotyp 290Arg/Gln ist bei 49 und 290 Gln/Gln nur bei 7 Patienten vorgekommen. Von 49 Patienten mit dem Genotyp 290Arg/Gln waren 40 männliche und 9 weibliche Patienten. Von den 7 Patienten mit dem Genotyp 290Gln/Gln waren 4 Männer und 3 Frauen. Im Chi-Quadrat-Test zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Geschlecht der Patienten und dem Polymorphismus (P=0,058).

Tab. 11 Geschlechtsverteilung des ECRG1

Geschlecht	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln
Männlich	43 (49,4 %)	40 (46,0 %)	4 (4,6 %)
Weiblich	8 (40,0 %)	9 (45,0 %)	3 (15,0 %)

Histomorphologisch handelte es sich bei den Tumoren um 66 Plattenepithelkarzinome und um 41 Adenokarzinome. Von den 41 Patienten mit einem Adenokarzinom hatten 21 den Arg/Arg Genotyp, 18 den Arg/Gln Genotyp und 2 den Gln/Gln Genotyp. Von den 66 Patienten mit Plattenepithelkarzinom besaßen 30 den Genotyp Arg/Arg, 31 den Genotyp Arg/Gln und 5 den Genotyp Gln/Gln. Hier zeigte sich nach dem Chi-Quadrat-Test kein signifikanter Zusammenhang (P=0,175).

Tab. 12 Verteilung der Genotypen Anhand der histomorphologischen Verteilung

Entität	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln
Adenokarzinom	21 (51,2 %)	18 (43,9 %)	2 (4,9 %)
Plattenepithelkarzinom	30 (45,5 %)	31 (47,0 %)	5 (7,6 %)

Wie oben beschrieben wurde nach den histopathologischen Untersuchungen die Eindringtiefe des Tumors in vier Stadien eingeteilt. Von 19 Patienten im pT1 Stadium hatten 7 den Arg/Arg Genotyp, 10 den Arg/Gln Genotyp und 2 den Gln/Gln Genotyp. Von 30 Patienten im pT2 Stadium hatten 17 den Arg/Arg Genotyp, 11 den Arg/Gln Genotyp und 2 den Gln/Gln Genotyp. Von 46 Patienten im pT3 Stadium hatten 22 den Arg/Arg, 22 den Arg/Gln und 2 Patienten den Gln/Gln Genotyp. 5 Patienten im fortgeschrittenem Tumorstadium mit Infiltration der extraösophagealen Strukturen (pT4) hatten den Arg/Arg, 6 den Arg/Gln und ein Patient den Gln/Gln Genotyp. Hier konnte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (P=0,046).

Tab. 13 Verteilung der Genotypen nach der Tumortiefe

Tumortiefe	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln
pT1	7 (36,8 %)	10 (52,6 %)	2 (10,5 %)
pT2	17 (56,7 %)	11 (36,7 %)	2 (6,7 %)
pT3	22 (47,8 %)	22 (47,8 %)	2 (4,3 %)
pT4	5 (41,7 %)	6 (50,0 %)	1 (8,3 %)

31 Patienten in dieser Studie hatten keine Lymphknotenmetastasen, während bei 76 Patienten Lymphknotenmetastasen nachgewiesen wurden. Von den 31 Patienten ohne Lymphknotenmetastasen hatten 12 den Arg/Arg, 17 den Arg/Gln und 2 den Gln/Gln Genotyp. Von den Patienten mit Lymphknotenmetastasierung hatten 39 den Arg/Arg Genotyp, 32 den Arg/Gln und 5 den Gln/Gln Genotyp. Hier zeigte sich auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Lymphknotenmetastasierung und dem Polymorphismus der Patienten (P=0,024).

Tab. 14 Verteilung der Genotypen nach dem Lymphknotenstatus

LK-Metastase	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln
pN0	12 (38,7 %)	17 (54,8 %)	2 (6,5 %)
pN1	39 (51,3 %)	32 (42,1 %)	5 (6,6 %)

Nach dem Grading-System wird das Ösophaguskarzinom in G1, G2 und G3 eingeteilt. Von 10 Patienten im G1 Stadium hatten 4 den Arg/Arg, 5 den Arg/Gln und ein Patient den Gln/Gln Genotyp. Bei 22 Patienten im G2 Stadium wurde den Genotyp Arg/Arg, bei 21 der Genotyp Arg/Gln und bei 4 der Genotyp Gln/Gln nachgewiesen. Von 50 Patienten mit wenig differenziertem Tumor hatten 25 den Arg/Arg, 23 den Arg/Gln und 2 Patienten den Gln/Gln Genotyp. Es zeigte sich auch hier ein signifikanter Zusammenhang nach dem Chi-Quadrat-Test (P=0,047).

Tab. 15 Verteilung der Genotypen nach dem Grading- Stadium des Tumors

Grading	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln
G1	4 (40,0 %)	5 (50,0 %)	1 (10,0 %)
G2	22 (46,8 %)	21 (44,7 %)	4 (8,5 %)
G3	25 (50,0 %)	23 (46,0 %)	2 (4,0 %)

4.4 Überlebensanalyse

4.4.1 DNA- Polymorphismus im ECRG1 (290 Arg/Arg, 290 Arg/Gln, 290 Gln/Gln)

Mit der Hilfe des Kaplan-Meier-Verfahrens wurden die Überlebenskurven für den jeweiligen DNA-Polymorphismus dargestellt. Abbildung 4 zeigt die Gesamtüberlebenszeit für die DNA-Polymorphismen im ECRG1 (290Arg/Arg, 290Arg/Gln, 290 Gln/Gln). Die mittlere Überlebenszeit für Patienten mit 290Arg/Arg Genotyp war 17 Monate (95 % CI 9,6-24,4). Für den 290Arg/Gln Genotyp war die mittlere Überlebenszeit 30,8 Monate (95 % CI 20,7-40,9) und für den 290Gln/Gln Genotyp 39,9 Monate (95 % CI 6,8-72,9) bzw. 30,8 Monate (95 % CI 23,0-38,6) bei Vorliegen mindestens eines Gln Allels. Es zeigte sich eine signifikante kürzere Überlebenszeit für 290Arg/Arg Genotyp (P=0,038).

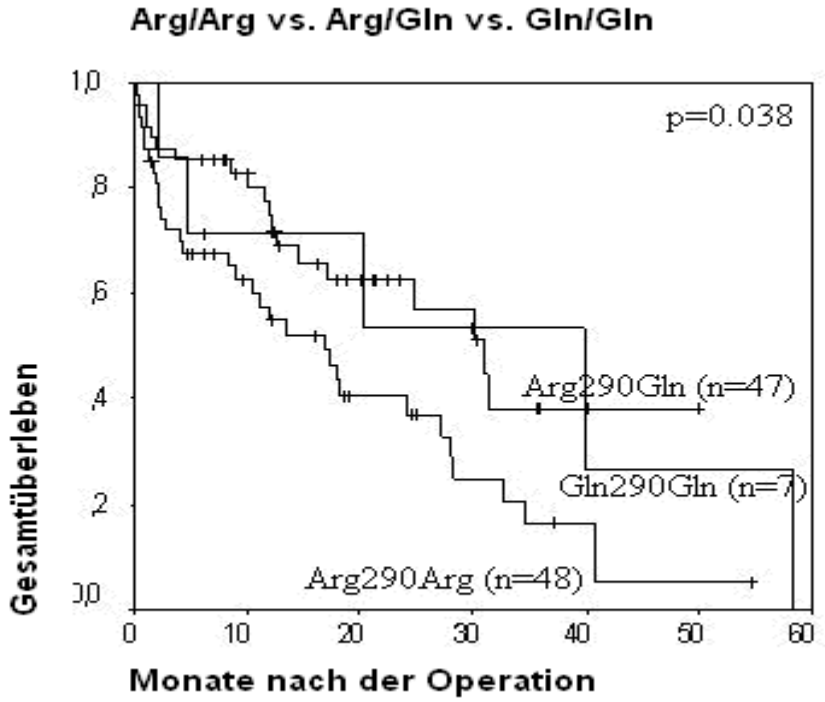

Abb. 4 Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenskurve für DNA- Polymorphismus in ECRG1. 48 Patienten hatten den Arg/Arg, 47 Patienten den Arg/Gln und 7 Patienten den Gln/Gln Genotyp. Die mittlere Überlebenszeit für den Arg/Arg Genotyp war 17 Monate (95 % CI 9,6-24,4). Für den 290Arg/Gln Genotyp betrug die mittlere Überlebenszeit 30,8 Monate (95 % CI 20,7-40,9) und für den Gln/Gln Genotyp 39,9 Monate (95 % CI 6,8-72,9).

4.4.2 DNA- Polymorphismus im ECRG1 (290 Arg/Arg / Präsenz Gln Allele)

Bei der anschließenden Analyse der Bedeutung der Präsenz von mindestens einem Gln Allel (bei 290 Gln/Gln n=7) erfolgte eine Zusammenfassung der 290 Arg/Gln und 290 Gln/Gln Genotype zu einer Gruppe. Die statistische Analyse mit der Hilfe des Log-Rang-Tests zeigte, dass die Patienten mit dem Arg/Arg Genotyp eine signifikant schlechtere Überlebensprognose haben. Die Analyse zeigte signifikante Unterschiede bei Vorliegen eines 290Arg/Arg Genotyps im Vergleich zur Präsenz mindestens eines Gln Allels im ECRG1 (p=0,01).

Die Abbildung 5 stellt die Überlebenskurve der Patienten mit Arg/Arg Genotyp der Überlebenskurve der Patienten mit mindestens einem Gln Allel gegenüber. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang (P=0,011).

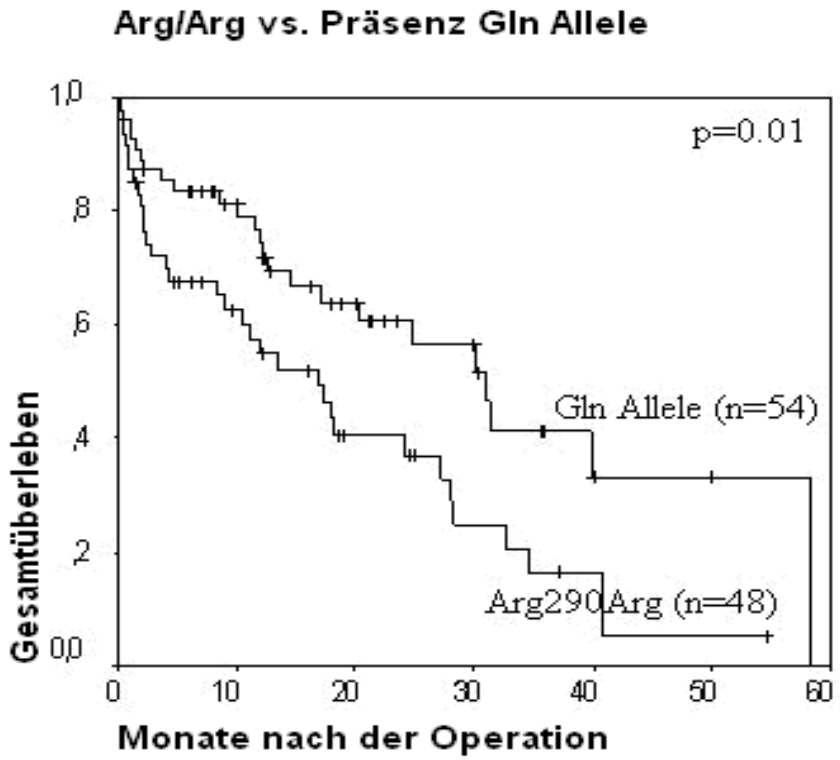

Abb. 5 Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenskurve bei Vorhandensein mindestens eines Gln Allels. 48 Patienten hatten den Arg/Arg Genotyp. Bei 54 Patienten konnte mindestens ein Gln Allel nachgewiesen werden. Die mittlere Überlebenszeit bei Patienten mit Arg/Arg war 17 Monate (95 % CI 9,6-24,4). Hingegen betrug die mittlere Überlebenszeit bei Vorhandensein mindestens eines Gln Allels 30,8 Monate (95 % CI 23,0-38,6).

4.4.3 Alter und Überleben der Patienten

50 der untersuchten Patienten waren jünger als 62 Jahre und 52 Patienten waren älter als 62 Jahre. Von der 50 Patienten, die jünger als 62 Jahre waren, sind 23 und von der älteren Patientengruppe 34 Patienten gestorben. Folglich hat 54 % der jüngeren und 34,6 % der älteren Patientengruppe überlebt. Mit der Hilfe der Kaplan-Meier Methode wurden die beiden Patientengruppen hinsichtlich des Alters und dessen Rolle für die Überlebenszeit der Patienten untersucht. Die mittlere Überlebenszeit betrug 30,2 Monate (95 % CI 22,8-37,60) für die Patienten die jünger als 62 Jahre waren und 19,7 Monate (95 % CI 14,6-24,8) für die ältere Patientengruppe. Es zeigte sich, dass Patienten mit einem höheren Lebensalter, d.h. Patienten, die älter als der Durchschnitt (62 Jahre) sind, eine schlechtere Prognose haben, als jüngere Patienten (p=0,034).
Die Abbildung 6 zeigt das Ergebnis der Kaplan-Meier-Analyse des Alters der Patienten zum Überleben.

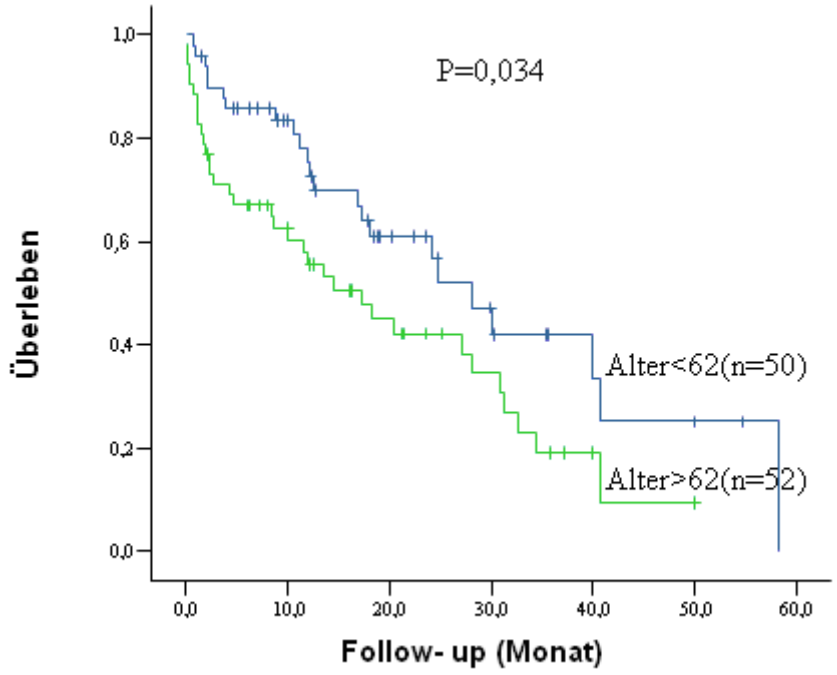

Abb. 6 Kaplan- Meier-Analyse der Überlebenskurve im Verhältnis zum Alter der Patienten. Die mittlere Überlebenszeit betrug 30,2 Monate (95 % CI 22,8-37,60) für die Patienten, die jünger als 62 Jahre waren und 19,7 Monate (95 % CI 14,6-24,8) für die Patienten, die älter als 62 Jahre waren.

4.4.4 N-Stadium und Überleben der Patienten

Zudem wurde auch der Zusammenhang zwischen der Lymphknotenmetastasierung und der Überlebensrate der Patienten mit der Hilfe der Kaplan-Meier Methode untersucht. 27 Patienten wiesen primär pN0 auf. Bei 75 Patienten wurden Lymphknotenmetastasen nachgewiesen. Während von der 27 Patienten im pN0 Stadium 6 Patienten gestorben sind, starben von den Patienten im pN1 Stadium 51. 21 Patienten (77,8 %) im pN0 Stadium und 24 Patienten (32,0 %) im pN1 Stadium überlebten. Die mittlere Überlebenszeit betrug 41,4 Monate (95% CI 32,0-50,9) für die Patienten im pN0 Stadium und 22,3 Monate (95 % CI 17,5-27,0) für die Patienten im pN1 Stadium. Insgesamt wurde bei den Patienten mit Lymphknotenmetastasen eine schlechtere Prognose beobachtet (p=0,024).
In der Abbildung 7 wird die Rolle der Lymphknotenmetastasierung für das Überleben der Patienten verdeutlicht.

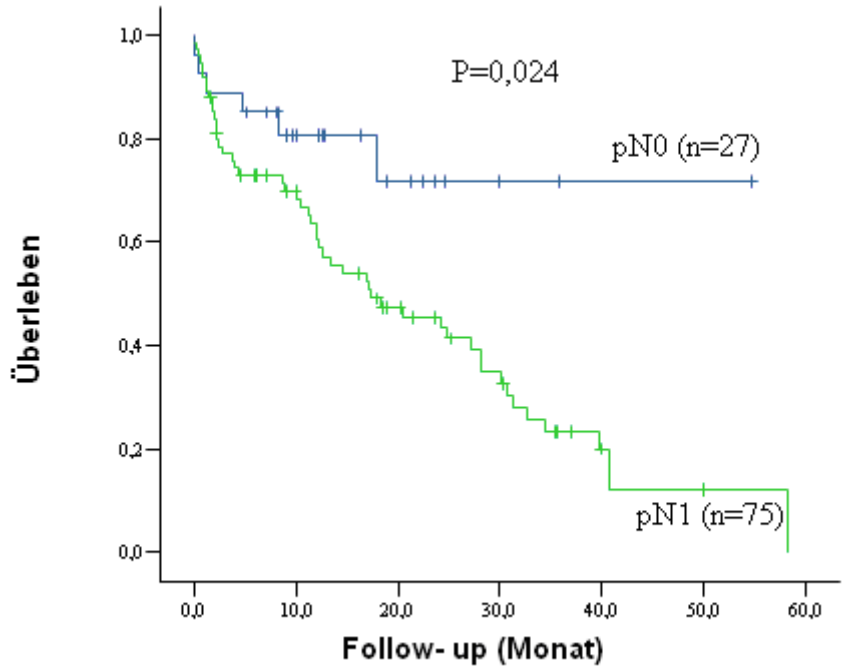

Abb. 7 Kaplan- Meier-Analyse der Überlebenskurve im Verhältnis zur Lymphknotenmetastasierung. Die mittlere Überlebenszeit betrug 41,4 Monate (95% CI 32,0-50,9) für die Patienten im pN0 Stadium und 22,3 Monate (95 % CI 17,5-27,0) für Patienten im pN1 Stadium.

4.4.5 Tumorinvasionstiefe und Überleben der Patienten

PT1 wurde bei 14, pT2 bei 30, pT3 bei 46 und pT4 bei 12 Patienten nachgewiesen. Von den 14 Patienten im pT1 Stadium sind zwei Patienten gestorben und 12 Patienten (85,7 %) haben überlebt. Im pT2 Stadium sind 18 Patienten gestorben und es gab 12 Überlebende (40,0 %). Von den 46 Patienten im pT3 Stadium starben 28 Patienten und dementsprechend überlebten 18 Patienten (39,1 %). Im fortgeschrittenem pT4 Stadium haben von 12 Patienten nur 3 (25,0 %) überlebt und 9 Patienten sind gestorben. Die mittlere Überlebenszeit betrug 24,6 Monate (95 % CI 17,8-31,34) für Patienten im pT1 Stadium, 29,6 Monate (95 % CI 21,29-37,96) für Patienten im pT2 Stadium, 21,0 Monate (95 % CI 15,39-26,62) für Patienten im pT3 Stadium und 13,7 Monate (95 % CI 6,86-20,61) für Patienten im pT4 Stadium. Es wurde nachgewiesen, dass Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium eine schlechtere Prognose (p=0,046) hatten.
Abbildung 8 zeigt das Verhältnis der Tumorinvasionstiefe und des Überlebens der Patienten.

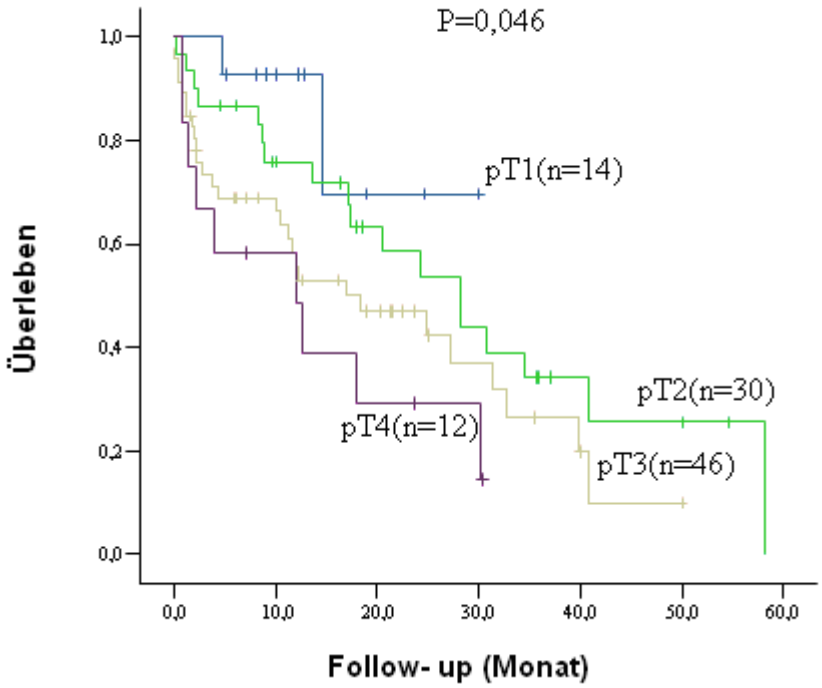

Abb. 8 Kaplan- Meier-Analyse der Überlebenskurve im Verhältnis zur Tumorinvasionstiefe. Die mittlere Überlebenszeit betrug 24,6 Monate (95 % CI 17,8-31,34) für Patienten im pT1 Stadium, 29,6 Monate (95 % CI 21,29-37,96) für Patienten im pT2 Stadium, 21,0 Monate (95 % CI 15,39-26,62) für Patienten im pT3 Stadium und 13,7 Monate (95 % CI 6,86-20,61) für Patienten im pT4 Stadium.

4.4.6 Grading und Überleben der Patienten

Außer dem Alter, dem Lymphknoten Status und der Tumorinvasionstiefe spielt auch das Grading des Tumors eine signifikante Rolle für die Überlebenszeit und die Prognose der Patienten. In dieser Studie befanden sich 8 Patienten im G1 Stadium, 45 Patienten im G2 Stadium und 49 Patienten im G3 Stadium. Die 8 Patienten im G1 Stadium haben alle überlebt. 25 Patienten im G2 Stadium sind gestorben und 20 Patienten (44,4 %) überlebten. Von 49 Patienten im G3 Stadium starben 32 Patienten und 17 Patienten (34,7 %) überlebten. Die mittlere Überlebenszeit betrug 35,1 Monate (95 % CI 32,10-38,26) für Patienten im G1 Stadium, 24,8 Monate (95 % CI 22,4-27,25) für Patienten im G2 Stadium und 23,6 Monate (95 % CI 19,72-27,73) für Patienten im G3 Stadium. Es wurde festgestellt, dass ein undifferenzierter Tumor mit einer schlechteren Prognose einhergeht (p=0,047).
In der Abbildung 9 wird das Verhältnis des Gradings des Tumors zum Überleben der Patienten verdeutlicht.

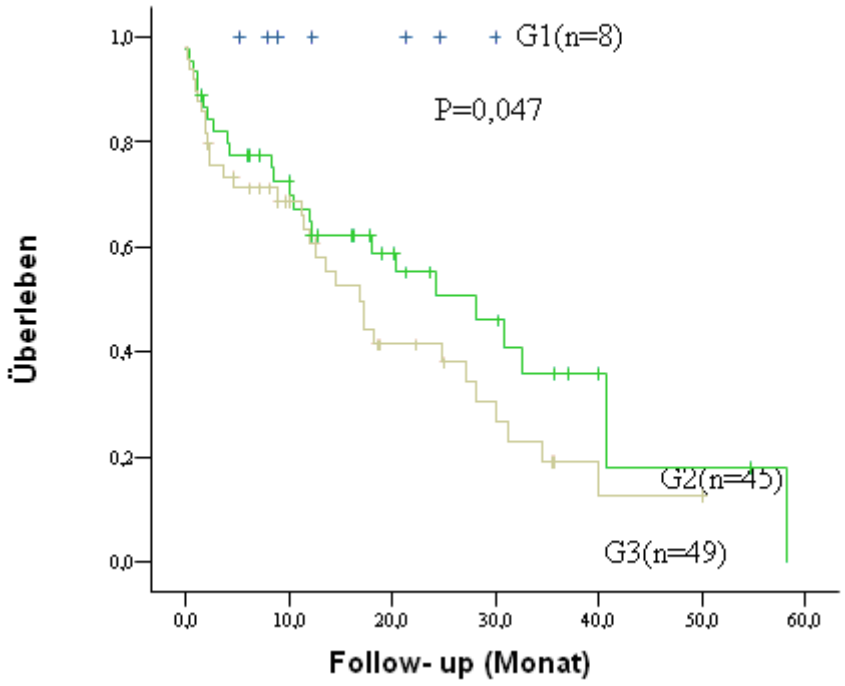

Abb. 9 Kaplan- Meier-Analyse der Überlebenskurve im Verhältnis zum Grading des Tumors. Die mittlere Überlebenszeit betrug 35,1 Monate (95 % CI 32,10-38,26) für Patienten im G1 Stadium, 24,8 Monate (95 % CI 22,4-27,25) für Patienten im G2 Stadium und 23,6 Monate (95 % CI 19,72-27,73) für Patienten im G3 Stadium.

4.4.7 Geschlecht und Überleben der Patienten

Im Gegensatz zum Alter, dem Lymphknoten Status, der Tumorinvasionstiefe und dem Grading sind das Geschlecht der Patienten und die Histomorphologie des Tumors (Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom) prognostisch nicht signifikante Faktoren. Von der Gesamtanzahl der Patienten mit Ösophaguskarzinom waren 82 männliche Patienten und 20 weibliche Patienten. Von den 82 männlichen Patienten überlebten 35 (42,7 %) Patienten und 47 Patienten starben. Von den weiblichen Patienten überlebte genau die Hälfte. Die mittlere Überlebenszeit betrug 23,1 Monate (95 % CI 18,1-28,1) für männlichen Patienten und 34,5 Monate (95 % CI 24,5-44,5) für weiblichen Patienten.
Abbildung 10 verdeutlicht, dass das Geschlecht der Patienten keine statistisch signifikante Rolle beim Überleben der Patienten spielte (p=0,058).

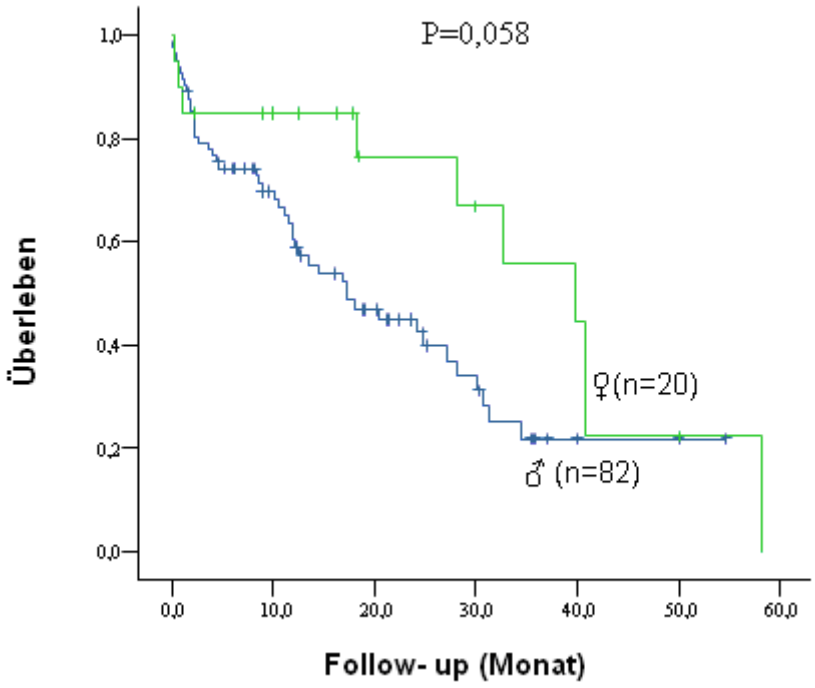

Abb. 10 Kaplan- Meier-Analyse der Überlebenskurve im Verhältnis zum Geschlecht der Patienten. Die mittlere Überlebenszeit betrug 23,1 (95 % CI 18,1-28,1) Monate für männlichen Patienten und 34,5 Monate (95 % CI 24,5-44,5) für weiblichen Patienten.

4.4.8 Histomorphologie und Überleben der Patienten

Histomorphologisch handelte sich um 64 Plattenepithelkarzinome und 38 Adenokarzinome. Von den Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom starben 39 Patienten und 25 Patienten (39,1 %) überlebten. 18 Patienten mit einem Adenokarzinom starben und 20 Patienten (52,6 %) überlebten. Die mittlere Überlebenszeit betrug 21,5 Monate (95 % CI 16,7-26,3) für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom und 29,2 Monate (95 % CI 21,3-37,2) für Patienten mit einem Adenokarzinom. Die Histomorphologie der Tumore hat sich als ein statistisch nicht signifikanter Faktor herausgestellt (p=0,175).
Abbildung 11 verdeutlicht, dass die Histomorphologie der Tumore keine signifikante Rolle beim Überleben der Patienten spielt.

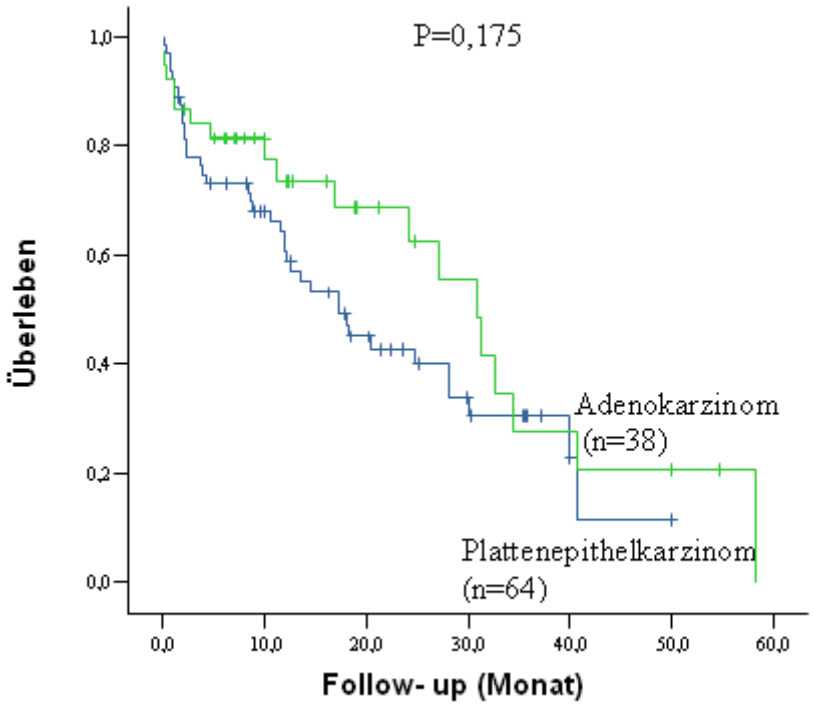

Abb. 11 Kaplan- Meier-Analyse der Überlebenskurve im Verhältnis zur Histomorphologie der Tumore. Die mittlere Überlebenszeit betrug 21,5 Monate (95 % CI 16,7-26,3) für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom und 29,2 Monate (95 % CI 21,3-37,2) für Patienten mit einem Adenokarzinom.

4.5. Cox-Regression

4.5.1 DNA-Polymorphismus

Die multivariante Analyse mit dem Cox-Regressionsmodell bestätigte, dass der DNA-Polymorphismus ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben ist (p=0,046). Dabei wurde für Arg/Arg ein relatives Risiko von 1,630 (95 % CI 1,009 - 2,633) festgestellt. Tabelle 16 zeigt die Analyse des DNA-Polymorphismus. Neben diesen Parametern waren das Alter, das Grading und die Tumorinvasionstiefe unabhängige Faktoren für das Überleben der Patienten.

Tab. 16 Analyse mit dem Cox-Regressionsmodell für das Gesamtüberleben bei verschiedenen Varianten (n=102) für DNA- Polymorphismus im ECRG1

Gesamtüberleben	**RR* / 95 % CI****	**P- Werte**
Alter	1,814 (1,035 – 3,179)	0,037
Tumor Invasionstiefe	1,635 (1,104 – 2,412)	0,014
LK- Metastasierung	1,346 (0,546 – 3,320)	0,519
Grading	1,716 (1,009 – 2,917)	0,046
AA vs AG vs GG	1,630 (1,009 – 2,633)	0,046

*RR = risk ratio, **CI = confidence interval. Die statistischen Analysen wurden mit dem Cox-Regressionsmodell durchgeführt. RRs beziehen sich auf das Gesamtüberleben.

4.5.2 Präsenz eines Gln Allels

Tabelle 17 zeigt die multivariante Cox-Regressionsanalyse für die Präsenz mindestens eines Gln Allels. Wie die dargestellten Ergebnisse in der Tabelle zeigen, ist die Abwesenheit eines Gln Allels (Arg/Arg) ein unabhängiger prognostischer Faktor gegen ein Überleben (p=0,012) und hat ein relatives Risiko von 2,016 (95 % CI 1,164 – 3,493).

Tab. 17 Analyse mit dem Cox-Regressionsmodell für das Gesamtüberleben bei verschiedenen Varianten (n=102) bei Präsenz mindestens eines Gln Allels

Gesamtüberleben	**RR* / 95 % CI****	**P- Werte**
Alter	1,831 (1,047 – 3,202)	0,034
Tumor Invasionstiefe	1,687 (1,135 – 2,510)	0,010
LK- Metastasierung	1,266 (0,511 – 3,133)	0,610
Grading	1,765 (1,034 – 3,015)	0,037
AA vs AG und GG	2,016 (1,164 – 3,493)	0,012

*RR = risk ratio, **CI = confidence interval. Die statistischen Analysen wurden mit dem Cox-Regressionsmodell durchgeführt. RRs beziehen sich auf das Gesamtüberleben.

4.6 DNA-Polymorphismus ist ein prädiktiver Faktor

Die Rolle des DNA-Polymorphismus im ECRG1 als ein Prognosefaktor und seine Rolle als ein Risikofaktor für die Entstehung eines Ösophaguskarzinoms wurden untersucht. Bei den Untersuchungen wurden die Patienten mit einem DNA-Polymorphismus mit der gesunden Population verglichen. Während der DNA-Polymorphismus 290Arg/Arg in 34 (34 %) und der DNA-Polymorphismus 290Arg/Gln in 58 (58 %) der Proben gefunden wurde, besaßen nur 8 Fälle (8 %) der gesunden Knochenmarkspender einen 290Gln/Gln DNA-Polymorphismus.

Es konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem 290Arg290 Genotyp und der Entwicklung eines Ösophaguskarzinoms gezeigt werden (p=0,012). Das Quotenverhältnis (Odds Ratio) betrug beim Vorhandensein des 290Arg290 Genotyps 1,77 (CI 1,01 – 3,10). Hieraus konnte geschlossen werden, dass der 290Arg290 Genotyp ein Risikofaktor für Entwicklung des Ösophaguskarzinoms ist.

Tabelle 18 vergleicht die DNA- Polymorphismen im ECRG1 bei der Kontrollgruppe mit den DNA-Polymorphismen bei Patienten mit Ösophaguskarzinom.

Tab. 18 Kreuztabelle für Präsenz mindestens eines Gln Allels vs. Arg/Arg im ECRG1

Variablen	**Arg/Arg**	**Gln Allel**	**Zahl der Patienten**
Kontrollgruppe	34 (34 %)	66 (66 %)	100 (100 %)
Ösophaguskarzinom	51 (47,66 %)	56 (52,34 %)	107 (100 %)
Insgeasamt	85 (41,06 %)	122(58,94 %)	207 (100 %)

RR = 1,77 (95 % CI 1,01 – 3,10); p= 0,012

5. Diskussion

5.1 Ösophaguskarzinom

5.1.1 Anatomie und Physiologie des Ösophagus

Der Ösophagus entwickelt sich wie der Magen und der Darm aus der entodermalen Darmanlage und dem Splanchnopleuramantel. Der Ösophagus wird durch das Septum oesophagotracheale von der Trachea getrennt.

Der Ösophagus ist ca. 25 cm. lang und breitet sich vom Pharynx bis zum Magen aus. Der Ösophagus verläuft dorsal der Luftröhre und ventral der Wirbelsäule. Er gliedert sich in eine Pars cervicalis, eine Pars thoracica und eine Pars abdominalis. Die Pars cervicalis beginnt mit dem Ösophagusmund in Höhe des 6. oder 7. Halswirbels und ist an der Ringknorpelplatte befestigt. Die Pars thoracica beginnt mit dem Durchtritt des Ösophagus durch die obere Thoraxapertur und endet im Hiatus Ösophagus des Zwerchfells. Die Pars thoracica ist mit 16 cm. der längste Abschnitt des Ösophagus. Die Pars abdominalis ist je nach der Körperlage 1 bis 4 cm. lang und mündet im Ostium cardiacum in den Magen.

Der Ösophagus ist in drei Stellen eingeengt. Die erste physiologische Enge ist mit ca. 13 mm die engste Stelle des Ösophagus und liegt hinter der Cartilago cricoidea. Die zweite Enge, auch die Aortenenge genannt, liegt in Höhe des 4. Brustwirbels und wird durch den Aortenbogen hervorgerufen. In der Höhe des 10. Brustwirbels kommt es im Hiatus Ösophagus durch den Tonus der Ösophagusmuskulatur zur letzten physiologischen Enge. Die Engen des Ösophagus sind die Prädilektionsstellen für Karzinome. Fremdkörper können hier bevorzugt eindringen und außerdem Verätzungen gravierender auftreten.

Der Wandaufbau des Ösophagus ist für alle Abschnitte des Verdauungstrakts repräsentativ. Die Tunica mucosa ist wegen der hohen mechanischen Beanspruchung beim Schlucken mit einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel ausgekleidet. Die Lamina propria mucosae besteht aus einem lockeren Bindegewebe, den Drüsen und vielen Blut- und Lymphgefäßen. Die Lamina muscularis mucosae ist eine zirkulärschraubig angeordnete Schicht glatter Muskulatur zur Feinanpassung an den Inhalt. Die Tela submucosa wirkt als eine Verschiebeschicht, die aus lockerem Bindegewebe mit Blutgefäßen und

Nervengeflechten (Plexus submucosus) besteht. In der Tela submucosa breitet sich ein dichter Venenplexus aus, dessen Gefäße mit denen in der Lamina propria in Verbindung stehen. Die Tunica muscularis besteht in den oberen zwei Dritteln aus quergestreifter Muskulatur, im unteren Drittel hingegen aus glatter Muskulatur. Die quergestreifte Muskulatur kontrahiert schneller als die glatte Muskulatur. Die beiden Muskelgewebsarten kommen in einer Übergangszone im mittleren Drittel nebeneinander vor. Nur im abdominalen Anteil des Ösophagus findet sich eine Serosaüberzug, sonst stellt die Adventitia die Verbindung zum mediastinalen Bindegewebe her.
Tabelle 19 stellt die Schichtenfolge von innen nach außen dar:

Tab. 19 Histomorphologischer Aufbau des Magen-Darm-Traktes

Tunica mucosa	- Lamina epithelialis mucosae - Lamina propria mucosae - Lamina muscularis mucosae
Tela submucosa	Eine Bindegewebsverschiebeschicht, die Plexus submucosus enthält.
Tunica muscularis	Dient der Motorik, aus zwei Schichten aufgebaut: - Stratum circulare - Stratum longitudinale
Tunica adventitia	Bindegewebe zum Einbau oder Serosaüberzug
Tunica serosa	An freien, in der Bauchhöhle liegenden Abschnitten

Die Speiseröhre hat die Aufgabe, den bereits zerkleinerten Bissen weiter zu transportieren. Zum Transport und zur Durchmischung dienen Kontraktionswellen, die mit einer Verkürzung der Speiseröhre einhergehen und das Lumen derselben verengern. Die quergestreifte Muskulatur ist proximal durch ihre andauernde Kontraktion für den proximalen Verschluss (oberer Ösophagussphinkter) zuständig. Beim Schlucken lässt die Kontraktion der quergestreiften Muskulatur nach und es kommt zu peristaltischen Muskelbewegungen, die vom Nervus Vagus koordiniert werden. Den Übergang bildet der untere Ösophagussphinkter (Kardiasphinkter). Der Mechanismus beruht einerseits auf den unterschiedlichen Druckverhältnissen im Pleura- und Bauchraum und andererseits auf der speziellen Anordnung der Muskulatur.

5.1.2 Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms

Unter dem Begriff Ösophaguskarzinom versteht man alle Typen von epithelialen malignen Neubildungen in Bereich der Speiseröhre. Das Ösophaguskarzinom ist einer der häufigsten Tumoren weltweit und ist mit einer schlechten Prognose verbunden (Sugimachi et al. 1988, Parkin et al. 1993). Das Ösophaguskarzinom ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 10 bis 20 % selbst nach Resektion mit kurativer Intention ein aggressiver Tumor (Herskovic et al. 1992). Die Häufigkeit der Neuerkrankungen pro Jahr beträgt bei Männern 6,8 Fälle pro 100.000 Einwohner und bei Frauen 0,84 Fälle pro 100.000 Einwohner (Meyer et al. 2004). Das Geschlechtsverhältnis liegt bei m:w 7:1 (Herold et al. 2006). Hinsichtlich der Inzidenz sind jedoch deutliche regionale Unterschiede nachweisbar (Parkin et al. 1997). Am häufigsten kommt diese Erkrankung in China und in Südafrika vor. Der Altersgipfel liegt um das 65. Lebensjahr. Ein wichtiger prognostischer Faktor ist die lymphogene Metastasierung. Zum Zeitpunk der Diagnosestellung liegen zu 60 % Lymphknotenmetastasen vor. Ca. 5 % aller Malignome des Gastrointestinaltraktes sind im Ösophagus gelegen. Davon 15 % im oberen, 50 % im mittleren und 35 % in unterem Drittel. Es handelt sich meist um Plattenepithel- oder undifferenzierte Karzinome, sehr selten um Sarkome und neuroendokrine Tumore des ADUP-Systems. Plattenepithelkarzinome treten zu 50 % im mittleren, zu 30 % im unteren und zu 20 % im oberen Bereich des Ösophagus auf. Adenokarzinome kommen hingegen hauptsächlich im unteren Ösophagusdrittel vor (Anderson et al. 1982).

5.1.3 Pathogenese und die histologische Einteilung des Ösophaguskarzinoms

Die bekanntesten Risikofaktoren für Ösophaguskarzinom sind Alkohol- und Nikotinabusus, heiße oder scharfe Nahrungsmittel, ionisierende Strahlen, Nitrosamine (Obstschnäpse) und ein Mangel an Vitaminen und Spurenelemente. Die chronische Refluxösophagitiden mit Endobrachyösophagusbildung, die Entstehung von Narbenstrikturen nach Verätzungen, das Plummer-Vinson-Syndrom und die Achalasie stellen die Präkanzerosen für das Ösophaguskarzinom dar. Die Adenokarzinome entstehen auf dem Boden eines Barrett-Ösophagus (Zylinderzellmetaplasie) als Komplikation einer Refluxösophagitis. Es kommt durch langjährige Refluxösophagitis zum Ersatz des Plattenepithels durch Zylinderepithel. Es kann mit einer Dysplasie und damit mit einer Entartung zum Adenokarzinom einhergehen. Umgekehrt zeigt Vitamin C einen protektiven Effekt (Barone et al. 1992). Das

Ösophaguskarzinom entsteht meist an physiologischen Engen (Ösophagusmund, Trachealbifurkation, Zwerchfelldurchtritt).
Das Ösophaguskarzinom geht zu 60-70 % vom ösophagealen Plattenepithel aus. Im distalen Drittel finden sich in ca. 30 % Adenokarzinome. Weniger als 5 % der Tumore sind anaplastische bzw. kleinzellige Karzinome, Zylindrome, Karzinoide oder Leiomysarkome (Fukunaga et al. 2000).

Weltweit gesehen ist das Plattenepithelkarzinom etwa 5- bis 10-mal so häufig wie das Adenokarzinom. Die Inzidenz des Adenokarzinoms hat jedoch insbesondere in den USA und in Westeuropa in den letzten drei Jahrzehnten deutlich zugenommen. Die Ursachen für die deutliche Häufigkeitszunahme des Adenokarzinoms bei gleichbleibender Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms sind nicht bekannt. Während den letzten 20 Jahren hat man eine Tendenz zu weniger gut differenzierten Tumoren mit einer vermehrten lymphogenen Metastasierung bei den Adenokarzinomen beobachtet (Walsh et al. 1996).

Tab. 20 Häufigkeit der Subtypen des Ösophaguskarzinoms

Histologische Subtypen	**Häufigkeit**
Plattenepithelkarzinome (meist in oberen und unteren Drittel)	60-70 %
Adenokarzinome (meist im unteren Drittel)	30-40 %
Andere Karzinome	< 5 %

Das Ösophaguskarzinom wächst polypös, ulzerierend oder diffus infiltrierend (intramural). Beim intramuralen Wachstum kann eine zirkuläre Stenose mit steigender Rigidität der Wand entstehen. Das Plattenepithelkarzinom variiert mikroskopisch zwischen der häufiger auftretenden undifferenzierten und kleinzelligen Form und der seltener auftretenden hoch differenzierten und verhornenden Form (Bühling et al. 2004).

5.1.4 Symptomatik und klinisches Bild

Die Leitsymptome sind Dysphagie, Gewichtsverlust, retrosternaler Schmerz, Regurgitation, Singultus (Infiltration des N. Vagus), Heiserkeit (Rekurrensparese), Reizhusten, pulmonale Beschwerden beim Auftreten von Fisteln zum Tracheobronchialtrakt und gelegentlich Hämatemesis. Die Symptome treten aber leider erst in einem fortgeschrittenen Stadium auf.

Die Hauptsymptome des fortgeschrittenen Tumorleidens sind Dysphagie (80 %) und Gewichtverlust (50 %). Das klassische Symptom ist die zunehmende Dysphagie, zunächst mit Schluckstörungen für feste Speisen, später auch für Flüssigkeiten. Die Dysphagie kann man erst bei einem Obstruktion von zwei Dritteln des Ösophaguslumens feststellen (Barier et al. 1998, Mayer et al. 1986) und wird als Spätsymptom gewertet, auch wenn sie meist das erste für die Patienten bemerkbare Symptom überhaupt darstellt. Die Dysphagie tritt meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium auf, zu dieser Zeit sind mehr als die Hälfte der Patienten bereits inoperable (Katlik et al. 1990). Ein Frühkarzinom ist in 40 % der Fälle unsymptomatisch (Adachi et al. 1993).

5.1.5 Diagnose des Ösophaguskarzinoms

Der Goldstandard für die Diagnose des Ösophaguskarzinoms ist die Ösophagoskopie mit Entnahme von Biopsien für die nachfolgende histologische Untersuchung. Wegweisend ist der endoskopische Befund mit einer Aussage über die Lokalisation, die Höhe und die Längenausdehnung des Tumors. Im Falle einer nicht passierbaren Stenose sollte eine Bougierung erfolgen, um mindestens die Stenose und die distal davon gelegenen Abschnitte mit einem Kinder-Endoskop beurteilen zu können. Die intramukösen Tumoranteile, die von der Haupttumormasse durch die intakte Schleimhaut getrennt sein können und häufig der radiologischen Diagnostik entgehen, lassen sich durch Stufenbiopsien im Rahmen der Endoskopie erkennen. Bei der Ösophagogastroskopie steht neben der Möglichkeit der Gewebeentnahme und der Größenbestimmung noch die endoskopische Sicht unter einer Vitalfärbung im Falle eines Frühkarzinoms als zusätzliche Möglichkeit zur Verfügung (Weiser und Lange 1986, Schmassmann 1999). Die Röntgenkontrastuntersuchung der Speiseröhre ist für die Gesamtdarstellung der pathologischen Veränderung im anatomischen Gesamtzusammenhang, insbesondere zur Beurteilung einer Stenosierung, wichtig und ermöglicht die Lokalisation des Tumors in Bezug auf den oberen Ösophagussphinkter, zur Trachealbifurkation und zur Kardia. Die Endosonographie dient zur Beurteilung der Ausdehnung und der Größe des Tumors (T-Stadium). Sie hat im Zusammenhang mit der Computertomographie die größte Aussagekraft über das N-Stadium des Tumors (Takemoto et al. 1986, Pokieser et al. 1999). Zum Staging des Tumors werden weitere diagnostische Verfahren benötigt. Die Tracheo-Bronchoskopie schließt eine Infiltration des benachbarten Bronchialsystems aus (Schmassmann 1999). Die Computertomographie von Thorax und Abdomen dient zum Ausschluss von Fernmetastasen und zum Ausschluss einer Infiltration

der benachbarten Organe (Rice 2000). Bei Knochenschmerzen kann eine Skelettszintigraphie durchgeführt werden. Eine diagnostische Laparoskopie kann zum Ausschluss einer Peritonealkarzinose oder kleineren intraabdominalen Metastasen insbesondere beim Adenokarzinom sinnvoll sein, um eine unnötige Operation zu vermeiden (Meyenberger et al. 2000, Benhidjeb et al. 2001).

Das therapeutische Vorgehen nach der Diagnosestellung hängt primär vom Stadium der Erkrankung ab. Das präoperative Staging hat eine wichtige Bedeutung in der Therapieplanung, da nur eine vollständige Tumorresektion eine Verbesserung der Prognose nach sich zieht. Das klinische Staging und Grading des Ösophaguskarzinoms nach dem TNM-System der Union internationale contre le cancer (UICC) ist international etabliert.
Die Tabelle 21 zeigt die TNM- Klassifikation des Ösophaguskarzinoms. Das Ösophaguskarzinom wird nach dem Grading-System in das hoch differenzierte G1, mäßig differenzierte G2 und wenig differenzierte G3 Stadium eingeteilt.

Tab. 21 Tumor-Nodus-Metastase (TNM)-Stadieneinteilung des Ösophaguskarzinoms nach UICC

T	**Primärtumor**
Tis	Carcinoma in situ/ High grade Dysplasie
T1	Lamina propria oder Submucosa
T1a	Lamina propria oder Muscularis mucosae
T1b	Submucosa
T2	Muscularis propria
T3	Adventitia
T4	Tumor infiltriert extraösophageale Strukturen
T4a	Infiltration von Pleura, Perikard, Zwerchfell und Peritoneum
T4b	Infiltration anderer benachbarten Organe, z.B. Aorta, Trachea
N	**Regionäre Lymphknoten**
N0	Keine Evidenz für Befall regionärer Lymphknoten
N1	Evidenz für Befall 1 bis 2 regionärer Lymphknoten
N2	Evidenz für Befall 3 bis 6 regionärer Lymphknoten
N3	Evidenz für Befall mehr als 6 regionärer Lymphknoten

M	**Fernmetastasen**
M0	Keine Evidenz für Fernmetastasen
M1	Evidenz für Fernmetastasen
R	**Tumorresektionsränder**
R0	Resektionsränder mikroskopisch und makroskopisch Tumorfrei
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Tab. 22 Anatomische Stadieneinteilung der Ösophaguskarzinome nach UICC

Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1, T2	N1	M0
Stadium IIIA	T4a T3 T1, T2	N0 N1 N2	M0 M0 M0
Stadium IIIB	T3	N2	M0
Stadium IIIC	T4a T4b Jedes T	N1, N2 Jedes N N3	M0 M0 M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

5.1.6 Tumormarker

Tumormarker werden heute bei einer Vielzahl von malignen Tumoren in der klinischen Diagnostik eingesetzt. Tumormarker im Serum sind in der Früherkennung der Karzinome, in der Prognose und in der Nachsorge der Patienten von Bedeutung. Sie können bei hoher Spezifität und Sensivität zur Früherkennung von Karzinomen eingesetzt werden. Außerdem können sie eine prognostische Relevanz für die Patienten haben und dienen der Verlaufskontrolle sowie dem Erkennen eines Rezidives.

Aufgrund der niedrigen Sensitivität und Spezifität spielen Tumormarker bei den Speiseröhrenkarzinomen eine geringere Rolle als bei den anderen Karzinomen; Beispielsweise Ovarial-, Prostata- und Kolorektalen Karzinome.

5.1.6.1 Tumormarker des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus

Als Tumormarker für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus sind Carcinoembryogenic Antigen (CEA) (Brockmann et al. 2000, Kawaguchi et al. 2000), Squamos-cell-carcinoma-Antigen (SCC) (Yamamoto et al. 1997, Brockmann et al. 2000), Carbohydrate Antigen 72-4 (CA 27-4) (Brockmann et al. 2000) und im Serum nachweisbare Fragmente von Zytokeratin 19 (CYFRA 21-1) beschrieben (Brockmann et al. 2000, Kawaguchi et al. 2000, Yamamoto et al. 1997).

Nach den vorliegenden Studien ist CYFRA 21-1 der Tumormarker mit der höchsten Sensitivität (ca. 50 %) für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Brockmann et al. 2000, Kawaguchi et al. 2000). Die Spezifität von CYFRA 21-1 wird mit 90 % angegeben (Kawaguchi et al. 2000, Yamamoto et al. 1997). Trotz dieser hohen Spezifität ist der Einsatz von CYFRA 21-1 als Screeninguntersuchung zum Nachweis des Plattenepithelkarzinoms in der klinischen Routine wegen der niedrigen Sensitivität weniger sinnvoll. Der Marker CYFRA 21-1 scheint aber auch im Hinblick auf die prognostische Aussagekraft ein bedeutsamer Tumormarker für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zu sein. Es muss aber erwähnt werden, dass für CYFRA 21-1 in keiner Arbeit bisher eine unabhängige prognostische Relevanz belegt werden konnte.

Für CEA, SCC und CA 72-4 konnte bis jetzt kein Zusammenhang mit der Progression des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus nachgewiesen werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keiner der bis jetzt untersuchten Tumormarker als Screeninguntersuchung für den Nachweis des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus sinnvoll erscheint.

Neben CEA, SCC, CA 72-4 und CYFRA 21-1 wurden in der letzten Zeit auch im Serum der Interleukin-2-Rezeptor und der vascular endothelial growth factor (VEGF) (Oka et al. 1999, Shimada et al. 2001) analysiert. Es zeigte sich, dass ein hoher Interleukin-2-Rezeptor Spiegel im Serum mit Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen einhergeht, aber keine Korrelation mit der T-Klassifikation und dem Grading des Tumors aufweist (Oka et al. 1999). Auch für den Interleukin-2-Rezeptor konnte kein unabhängiger prognostischer Wert festgestellt werden (Oka et al. 1999). Ein hoher VEGF-Spiegel im Serum ist bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus häufiger zu finden als in der Kontrollgruppe (Shimada et al. 2001). Dieser Marker korreliert mit allen bekannten prognostischen Parametern der TNM- Klassifikation.

Auch in Hinblick auf die Nachsorge sind CYFRA 21-1 und VEGF von Bedeutung. Die Erhöhung des Serumspiegels von CYFRA 21-1 während der Nachsorge operierter Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ist häufig der erste Indikator für ein Rezidiv. In der Nachsorge scheint der CYFRA 21-1 Spiegel bei 50 % der Patienten, bei denen präoperativ eine Erhöhung des Spiegels beobachtet wurde, für die Erkennung eines Rezidives hilfreich zu sein (Yamamoto et al. 1997). Nach den vorläufigen Daten zeigen bei Patienten, die neoadjuvant behandelt wurden, die Responder einen niedrigen und die Nonresponder einen erhöhten VEGF-Spiegel (Shimada et al. 2001). Responder sind die Patienten, die von einem multimodalen Therapiekonzept profitieren. Hingegen haben die Nonresponder ein schlechteres Ergebnis als primär operierte Patienten. Weitere Studien sind allerdings wünschenswert, da die Erfahrungen in diesem Bereich noch nicht ausreichend sind.

Tab. 23 Tumormarker des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus

Plattenepithelkarzinom des Ösophagus				
Marker	**Sensitivität %**	**Früherkennung**	**Prognostische Relevanz**	**Nachsorge**
CYFRA 21-1	50	-	(+)	(+)
VEGF	<50	-	+	(+)
SCC	<30	-	-	-
CEA	<20	-	-	-
-; keine Aussagekraft; (+): fragliche Aussagekraft; +: aussagekräftig.				

5.1.6.2 Tumormarker des Adenokarzinoms des Ösophagus

Für die Früherkennung der Adenokarzinome des Ösophagus gibt es keinen sicheren Tumormarker im Serum. Auch in Hinblick auf die prognostische Aussagekraft und Relevanz ist kein bedeutsamer Tumormarker zu erkennen. Dies liegt an der Tatsache, dass bis heute keine publizierten Studien vorliegen, die die Wertigkeit der Serumtumormarker für die Adenokarzinome des Ösophagus analysieren. Weitere Daten in diesem Bereich sind wünschenswert. Ein erhöhter CEA-Wert liegt bei jedem 5. Patienten mit Fernmetastasen vor. Eine Untersuchung über die Wertigkeit des CEA-Werts im Serum bei den Patienten mit einem Adenokarzinom zeigte bei etwa 20 % dieser Patienten erhöhte CEA-Werte (Kim et al. 1995). Die wenigen Patienten mit Adenokarzinom, die CEA positiv sind, können im postoperativen Verlauf durch die Bestimmung des Tumormarkers überwacht werden.

5.1.7 Therapeutische Ansätze beim Ösophaguskarzinom

Eine frühe Erkennung der Erkrankung ist die beste Möglichkeit, die Prognose zu verbessern. Bei der Behandlung des Ösophaguskarzinoms wird ein multimodales Therapiekonzept eingesetzt, das die total operative Resektion, die Chemotherapie und die Radiotherapie beinhaltet. Das Ziel jeder Behandlung sollte in erster Linie die Kuration des Patienten sein. Bei jeder Behandlung ist zudem die Wiederherstellung der Schluckfähigkeit des Patienten in zweiter Linie anzustreben. Eine Indikation zur Operation ist bei fast jedem Patienten gegeben. Nur bei Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium, d.h. bei der Infiltration der Nachbarorgane (T4-Stadium) und bei einer diffusen Fernmetastasierung ist eine radikal operative Therapie nicht indiziert. In diesem Fall stellt eine Operation als eine rein palliative Therapie eine oftmals zu große Belastung im Verhältnis zu der kurzen zu erwartenden Überlebenszeit des Patienten dar. Patienten in den Stadien I und IIA können unter kurativer Zielsetzung radikal operiert werden. Bei den primär nicht operablen Patienten wird durch die neoadjuvante Radio-/Chemotherapie ein Downstaging erhofft, wodurch ein Teil der Patienten doch noch mit kurativer Zielsetzung operiert werden kann. Eine postoperative adjuvante Radio-/Chemotherapie soll die zum Operationszeitpunkt bestehenden Mikrometastasen eliminieren. Bei fortgeschrittenem Tumorleiden und bei Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand stehen palliative Maßnahmen zur Verfügung. Bei diesen Patienten ist das endoskopisches Einlegen eines Kunststofftubus oder eines Metallstents, eine Beseitigung der Stenosen durch wiederholte endoskopische Beamer-/Lasertherapie und eine frühzeitige Ernährung über PEG (perkutane endoskopische Gastrostomie) oder PSG (perkutane sonografisch gesteuerte Gastrostomie) anzustreben.

5.1.7.1 Chirurgische Therapie

Die operative Therapie des Ösophaguskarzinoms sollte in Zentren mit besonderer Erfahrung in der Ösophaguschirurgie erfolgen, da das Risiko der Operation auch von der Erfahrung des Operationsteams abhängig ist (Benhidjeb et al. 2001). In einer Studie von 23 Krankenhäusern in Süd- und Westengland von Juli 1996 bis Juni 1997 wurde gezeigt, dass mit zunehmender Erfahrung des Operateurs die 30-Tages-Letalität um 40 % gesenkt werden kann. Sie führte damit zu einer verbesserten Überlebensrate (Bachmann et al. 2002).

Die Prognose von Patienten mit Ösophaguskarzinom hängt von der Tumorinfiltration und vom Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ab. Nur eine R0-Resektion (radikale

Tumorentfernung mit dem regionalen Lymphabflussgebiet) kann die Prognose der Patienten mit Ösophaguskarzinom verbessern und ist in den Leitlinien (Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften) als die wesentliche Voraussetzung für einen kurativen Behandlungserfolg definiert. Deswegen kommt der präoperativen Stadieneinteilung des Tumors eine große Bedeutung zu. Vor jedem operativen Eingriff muss das Risiko des geplanten Eingriffs und die Wahrscheinlichkeit einer kompletten makroskopischen und mikroskopischen Tumorentfernung (R0-Resektion) abgewogen werden. Die Entscheidung über die Operationsindikation bzw. die Indikation zu einer neoadjuvanten oder rein palliativen Therapie hängt vom Tumorstadium und dem Allgemeinzustand des Patienten ab. Im Gegensatz dazu ist das Ausmaß der durchzuführenden Lymphadenektomie von der Lokalisation des Tumors abhängig.

Im Falle der Resektabilität besteht die chirurgische Therapie in der subtotalen Resektion des Ösophagus. Das Ösophaguskarzinom breitet sich insbesondere intramural in longitudinaler Richtung aus; deswegen ist für eine radikale Resektion einen Sicherheitsabstand von mehreren Zentimetern anzustreben.

Das Ösophaguskarzinom wird unter therapeutisch-prognostischen und operationstechnischen Aspekten klassifiziert. Anhand des Bezugs zum Tracheobronchialsystem wird das Ösophaguskarzinom topographisch-anatomisch in infrabifurkale Ösophaguskarzinome (unterhalb der Trachealbifurkation), suprabifurkale Ösophaguskarzinome (oberhalb der Trachealbifurkation) und Tumore, die auf dem zervikalen Ösophagusanteil beschränkt sind (zervikal) unterteilt. Man grenzt außerdem die lokal beschränkten, potentiell resektablen Tumore (T1-3/N0-1/M0) von lokal fortgeschrittenen Tumoren (T3-4/N0-1/M0) ab.

Nach dem neuen Stand der Leitlinien (Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaft) bzw. nach der Konsensuskonferenz geht man beim Ösophaguskarzinom in Abhängigkeit von der Lokalisation vor. Beim infrabifurkalen Ösophaguskarzinom ist eine subtotale Ösophagusresektion mit abdominaler und mediastinaler Lymphadenektomie (2-Feld-Dissektion) die Therapie der Wahl. In einem fortgeschrittenen Tumorstadium kann man auch eine subtotale Ösophagusresektion mit abdominaler und mediastinaler Lymphadenektomie (2-Feld-Dissektion) anstreben. Im Stadium T4 ist aber mit einem erhöhten Operationsrisiko zu rechnen.

Eine subtotale Ösophagusresektion mit abdominaler und mediastinaler Lymphadenektomie ist ebenfalls bei suprabifurkalen Tumoren indiziert. Eine 3-Feld-Dissektion, die auch das zervikale Kompartiment einschließt, ist in diesem Fall zu bevorzugen, jedoch kein notwendiger Bestandteil der Operation.

Beim zervikalen Ösophaguskarzinom liegen noch keine genauen Leitlinien vor. Bezüglich des therapeutischen Vorgehens sind weitere Studien wünschenswert.

Beim thorakalen Plattenepithelkarzinom kann beim hohen Risiko eines transthorakalen Vorgehens, eine transmediastinale (stumpfe) Dissektion des Ösophagus durchgeführt werden. Die stumpfe Dissektion ist aber umstritten, da diese Methode die Ansprüche an einen chirurgischen-onkologischen Eingriff nicht sicher erfüllt.

Eine komplette Tumorresektion ist beim Adenokarzinom des distalen Ösophagus bis zum T3 Stadium mit einer großen Wahrscheinlichkeit möglich. Im T4 Stadium kann mittels primärer Resektion teilweise kein R0-Stadium mehr erreicht werden. Die distalen Adenokarzinome (Barret Karzinome) werden ebenfalls thorakoabdominal durch die radikale 2-Feld-Lymphadenektomie behandelt.

Die Kontinuität der Speisepassage wird durch die Transposition des Magens oder durch eine Koloninterposition bzw. eine Jejunuminterposition erreicht. Die Anastomose erfolgt intrathorakal oder extrathorakal im zervikalen Anteil der Speiseröhre (Kollare Anastomose). Der Magenhochzug ist die bevorzugte Methode zur Rekonstruktion der Speisepassage. Die Koloninterpositionsmethode ist vor allem dann durchzuführen, wenn der Magen nicht mehr zur Verfügung steht. Bei Magenvoroperationen, zum Beispiel beim Zustand nach einer Gastrektomie, bei Karzinomen des ösophagogastralen Übergangs oder bei einer zu hohen Anastomose, wird eine Koloninterposition durchgeführt. Ein Jejunuminterponat ist bei benignen Tumoren, Frühkarzinomen oder bei fortgeschrittenen Tumoren in palliativen Situationen indiziert. Scheidet der Magen oder Colon aus, kann ein gestieltes Jejunuminterponat mit einem mikrochirurgischen Gefäßanschluß an den cervicalen Gefäßen indiziert sein.

Bei gutem Allgemeinzustand und bei einem lokal begrenzten Ösophaguskarzinom (T1-T2/N0-N1/M0) ist eine en bloc. Ösophagektomie mit radikaler 2-Feld-Lymphadenektomie (abdominal/mediastinal) in der gleichen Sitzung indiziert. Eine 5-Jahres-Überlebensrate von

ca. 45 bis 60 % kann nach einer en bloc. Ösophagektomie mit radikaler Lymphadenektomie bei den submukosal gewachsenen Tumoren und von 100 % bei den intramukosalen Tumoren erreicht werden (Kato et al. 1990, Moghissi 1992, Nabeya et al. 1993, Sugimachi et al. 1993). Bei Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Tumorleiden (T3-T4/N1/M0) ist wegen der frühen mediastinalen Infiltration in Anbetracht des Bezugs zum Tracheobronchialsystem und der Anatomie des hinteren Mediastinums eine kurative Resektion nicht zu erreichen. Bei diesen Patienten kann ein Downstaging des Tumors durch eine neoadjuvante Radio-/Chemotherapie erzielt werden. Die neoadjuvante Radio-/Chemotherapie kann den Anteil der R0-Resektion und das rezidivfreie Intervall erhöhen, sie geht aber häufig mit einer erhöhten postoperativen Morbidität und Mortalität einher (Nakano et al. 2001, Benhidjeb et al. 2001).

5.1.7.2 Radiotherapie

Die Radiotherapie des Ösophaguskarzinoms wird als präoperative Radio- oder Radio-/ Chemotherapie, als postoperative Bestrahlung in Kombination mit einer Chemotherapie, als kurative Therapie oder als palliative Behandlung durchgeführt. Die Radiotherapie wird in der Regel mit anderen therapeutischen Verfahren, insbesondere mit einer Operation und einer Chemotherapie, kombiniert (Oliver et al. 1990, Diel 1991, Harter 1992, Sargeant et al. 1992, Coia 1993). Im Gegensatz zum Adenokarzinom, das wenig strahlensensibel ist, führt die Radiotherapie beim Plattenepithelkarzinom oft zu guten Resultaten. Beim Plattenepithelkarzinom lässt sich durch Strahlentherapie oftmals zumindest eine Teilremission erreichen. Für die Radiotherapie stehen zwei Verfahren zur Verfügung: die perkutane oder die lokale Applikation der Strahlung. Bei der lokalen Applikation wird eine mit 192-Iridium oder 137-Cäsium beschichtete Afterloadingsonde in den Ösophagus eingeführt und intraluminal bestrahlt (Brachytherapie). Bei diesem Verfahren erreicht man eine sehr hohe Lokaldosis im Zielvolumen. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die regionären Lymphknoten von der Strahlenaktivität nicht erreicht werden. Deswegen wird die Indikation für eine Brachytherapie sehr selten gestellt (Sander et al. 1991). Die beiden Verfahren können auch in Kombination angewandt werden. Für eine radikale Radiotherapie wird eine Dosis von 50 Gy benötigt. Bei einer Standardradiotherapie werden tägliche Einzeldosen von 2 Gy für 5 Tage pro Woche über insgesamt 5 Wochen eingesetzt (Lambert 1994). Die Nebenwirkungen der Strahlentherapie (Hautverbrennungen, Leukopenie, Ösophagitis oder Ösophagusstriktur) treten erst bei Strahlendosen über 60 Gy auf (Barbier et al. 1982).

5.1.7.2.1 Präoperative (neoadjuvante) Radiotherapie

Mit dem Ziel einer sekundär erreichbaren Resektabilität bei lokal fortgeschrittenen Tumoren oder einer Tumorverkleinerung bei primär resektablen Tumoren kommen die neoadjuvanten Radiotherapieansätzen meist in der Kombination mit einer Chemotherapie zur Anwendung. Besonders bei lokal fortgeschrittenen Tumoren wurde eine Verbesserung der Überlebenszeit beobachtet. Eine Tumorverkleinerung wird in 30-40 % der Fälle erreicht. Einige randomisierte Studien wurden bis heute über die neoadjuvante Radiotherapie publiziert (Arnott et al. 1992, Arnott et al. 2000, Gignoux et al. 1987, Launois et al. 1981, Nygaard et al. 1992). In einer Studie konnte eine Senkung der Lokalrezidivrate nachgewiesen werden, ohne allerdings eine Verbesserung der Langzeitprognose zu beobachten (Wang et al. 1989). Die vorhergehenden Studien mit einer ausreichenden Patientenzahl zeigten bisher widersprüchliche Ergebnisse: einer signifikanten Verbesserung der R0-Resektion steht einer erhöhten perioperativen Mortalität bei den neoadjuvant vorbehandelten Patienten gegenüber. Deswegen kann eine alleinige neoadjuvante Radiotherapie bei Patienten mit Ösophaguskarzinom nicht empfohlen werden (Arnott et al. 2000, Malthaner et al. 2004). Die Behandlungsvolumina sind der Ösophagus einschließlich eines cranialen und caudalen Sicherheitsabstands von ca. 5 cm. sowie die regionären Lymphknoten. Tägliche Strahlendosen von 1,8 Gy werden eingesetzt um eine Gesamtdosis von 36- 40 Gy zu erreichen.

5.1.7.2.2 Postoperative Strahlenbehandlung

Eine adjuvante Radiotherapie kann die eventuell vorhandenen Tumorreste im Operationsgebiet und in den Lymphknoten eliminieren. Vier Studien wurden über adjuvante Therapie nach R0-Resektion publiziert (Fok et al. 1993, Teniere et al. 1991, Xiao et al. 2003, Zieren et al. 1995). Nur eine Studie zeigte eine Verringerung der Lokalrezidivrate in der Patientengruppe mit pN0-Status (Teniere et al. 1991). In allen Studien wurde aber von einer erhöhten Toxizitätsrate berichtet. Nach einer R0-Resektion verringert zwar die adjuvante Strahlentherapie die Lokalrezidivrate, sie führt aber zu keiner Verlängerung der Überlebenszeit. Daher kann eine adjuvante Radiotherapie nach kurativer Ösophagusresektion nicht empfohlen werden. Bei R1- oder R2-Resektion ist hingegen eine postoperative Radiotherapie zu empfehlen, solange der Allgemeinzustand des Patienten es zulässt. Die strahlentherapeutischen Behandlungsvolumina sind wie bei der neoadjuvanten Radiotherapie

der Ösophagus einschließlich eines Sicherheitsabstandes von ca. 5 cm. und die regionären Lymphknoten. Die Anastomose wird in das Behandlungsfeld einbezogen. Bei der adjuvanten Radiotherapie werden Einzeldosen von 1,8 Gy verabreicht und eine Gesamtdosis von 50 – 56 Gy angestrebt.

5.1.7.2.3 Palliative Strahlenbehandlung

Die palliative Strahlentherapie wird bei Patienten mit einem lokalen Ösophaguskarzinom, die aufgrund von Nebenerkrankungen oder einem schlechtem Allgemeinzustand nicht operabel sind, eingesetzt. Bei primär definitiver Strahlentherapie werden Gesamtdosen von 60 – 70 Gy verabreicht.

5.1.7.3 Chemotherapie

Bereits in den 1970er-Jahren wurde aufgrund der durch die späte Tumorsymptomatik und der frühen lymphogenen Metastasierung sehr ungünstigen Prognose des Ösophaguskarzinoms die prä- und postoperative Systemtherapie in das kurative Konzept des Ösophaguskarzinoms eingesetzt. Eine zytostatische Monotherapie kommt nur bei Patienten mit einem fortgeschritten Tumorleiden als palliative Therapie zur Anwendung (Lambert 1994). Sonst ist die Chemotherapie im Rahmen der multimodalen Therapie indiziert. Eine multimodale Therapie beinhaltet die totale Resektion des Tumors und die adjuvante oder neoadjuvante Chemo- und Radiotherapie.

5.1.7.3.1 Neoadjuvante (präoperative) Chemotherapie

Eine neoadjuvante (präoperative) Chemotherapie kann zu einer Tumorverkleinerung und dadurch zu einer Steigerung der R0-Resektionsrate, zur Eradikation und zur Bekämpfung der häufig vorhandenen okkulten Fernmetastasen führen. Außerdem kann die Wirksamkeit der Therapie in vivo beurteilt werden. Die Kombination aus Cisplatin und 5-Fluorouracil wird heute als Standardtherapie der präoperativen Behandlung angesehen. Phase-III-Studien zeigen, dass die Kombinationschemotherapie in der Lage ist, signifikante histologische Veränderungen bei Ösophaguskarzinomen hervorzurufen. Außerdem hat man eine komplette Remission der Tumorzellen bei 5-10 % der Patienten mit einem Ösophaguskarzinom beobachtet. Die unterschiedlichen Ergebnisse müssen in Anbetracht der verschiedenen Tumorstadien (resektabel / lokal fortgeschritten) und histologischen Entitäten (Plattenepithel-/

Adenokarzinome) beurteilt werden. Die Kombinationstherapien induzieren bei lokalisierten Plattenepithelkarzinomen (T1-3/N0-1/M0) eine Remission von 45-70 % (Meyer et al. 2004). Sechs Studien wurden über R0-Resektionsrate nach der neoadjuvanten Chemotherapie durchgeführt (Nygaard et al. 1992, Schlag et al. 1992, Kok et al. 1997, Law et al. 1997, Roth et all. 1998, Acona et al. 2001). Allerdings konnte nur in einer von sechs Studien eine erhöhte R0-Resektionsrate nach der neoadjuvanten Chemotherapie im Vergleich zu primärer Operation gezeigt werden. In den anderen fünf Studien konnte ein solcher Nachweis nicht geführt werden. In der Studie von Roth und seinen Kollegen 1998 wurden 19 Patienten mit alleiniger Operation versus 17 Patienten mit neoadjuvanter Chemotherapie und Operation verglichen. Die 3-Jahre-Überlebensrate betrug bei der Patientengruppe mit alleiniger Operation 5 % und bei der anderen Gruppe mit neoadjuvanter Chemotherapie 25 %. In den anderen fünf Studien konnte dies nicht belegt werden.
Aufgrund dieser Ergebnisse wird eine präoperative Chemotherapie bei Plattenepithelkarzinomen nicht als wirksam angesehen und sollte wenn dann nur im Rahmen einer klinischen Studie in Betracht kommen. In allen Studien war auffällig, dass die präoperative Vorbehandlung zu keiner erhöhten postoperativen Letalität und Mortalität führte.

Bei den potentiell resektablen Adenokarzinomen (T1-3/N0-1/M0) wird durch die Kombinationschemotherapie eine Remission von 30-45 % erreicht. Leider sind bisher nur wenige Untersuchungen zum Adenokarzinom durchgeführt worden und die bis jetzt unterschiedlichen Ergebnisse machen eine abschließende Beurteilung unmöglich.

Zur präoperativen Chemotherapie beim lokal fortgeschrittenen Ösophaguskarzinom (T3-4/N0-1/M0) stehen nur vereinzelte Studien zur Verfügung. Ausweislich der retrospektiven Vergleiche mit den chirurgischen Ergebnissen konnte keine prognostische Bedeutung der neoadjuvanten Chemotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden nachgewiesen werden (Stahl et al. 1994).

5.1.7.3.2 Postoperative (adjuvante) Chemotherapie

Die Untersuchung der adjuvanten postoperativen Chemotherapie in vergleichenden Studien zeigte keine Verbesserung der Überlebenszeit, so dass sie wenn dann nur im Rahmen von klinischen Studien empfohlen werden kann (Meyer et al. 2004).

5.1.7.4 Präoperative (neoadjuvante) kombinierte Radio-/Chemotherapie

Die kombinierte Radio-/Chemotherapie wird seit Jahren in der Medizin eingesetzt. Eine amerikanische Studie verglich die Kombination von 4 Kursen Cisplatin/5-Fluorouracil und einer 50 Gy Bestrahlung mit einer alleinigen Radiotherapie von 64 Gy bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom (Cooper et al. 1999). Diese Studie zeigte im Fall einer kombinierten Radio-/Chemotherapie eine deutliche Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle, d.h. eine maximale Tumorrückbildung bzw. eine Tumorinaktivierung zum Zeitpunkt der Operation, eine Reduktion der Fernmetastasen und eine Verbesserung des Langzeitüberlebens.

Die neoadjuvante Kombinationstherapie bei einem potenziell resektablen Plattenepithelkarzinom (T1-3/N0-1/M0) zeigte in randomisierten Studien eine Verbesserung der Resektabilität aber zugleich auch eine erhöhte postoperative Letalität (Bosse et al. 1997). Leider ist aber die gewählte Kombinationstherapie in allen diesen Studien als suboptimal zu bewerten (geringe Dosis der Radiatio, nur Monotherapie mit Cisplatin und eine Unterdosierung des 5-Fluorouracil).

Zum potenziell resektablen Adenokarzinom (T1-3/N0-1/M0) liegen zwei Phase-III-Studien vor, die ein verbessertes Langzeitüberleben bei Patienten mit präoperativer Kombinationstherapie gegenüber Patienten mit einer alleinigen chirurgischen Behandlung zeigen. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, dass die Lokalrezidivrate von etwa 40 % auf 20 % nach multimodaler Vorbehandlung gesenkt wurde. Eine erhöhte postoperative Letalität wurde nicht beobachtet (Walsh et al. 1996, Urba et al. 2001).

Langzeitbeobachtungen (Follow-up mindestens 5 Jahre) präoperativer Radio-/Chemotherapie bei Patienten mit einem lokal fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom (T1-3/N0-1/M0) zeigten eine um 25 % erhöhte Überlebensrate nach 5 Jahren im Vergleich zur alleinigen operativen Behandlung. Allerdings wurde eine erhöhte postoperative Letalität beobachtet (Stahl et al. 1996). Eine Kombinationstherapie von Cisplatin/5-Fluorouracil und der 30-45 Gy Bestrahlung machte bei 85-95 % der Patienten mit lokal fortgeschrittenem Adenokarzinom (T1-3/N0-1/M0) eine komplette Resektion möglich, bei 8-30 % der Adenokarzinome wurde im Resektat kein Tumor mehr nachgewiesen und nach 3 Jahren lebten noch 30-43 % der Patienten. Auch diese Studie zeigte eine erhöhte postoperative Letalität (Stahl et al. 1998).

Insgesamt kann man sagen, dass die präoperative Radio-/Chemotherapie die Chance auf ein Langzeitüberleben der Patienten mit einem lokalisierten Ösophaguskarzinom verbessert, aber gleichzeitig die postoperative Letalität erhöht. Für Patienten mit lokal fortgeschrittenem und primär nicht resektablem Ösophaguskarzinom scheint die neoadjuvante Radio-/Chemotherapie eine sinnvolle Therapieoption zu sein.

5.1.7.5 Palliative Verfahren

Palliative Maßnahmen werden sowohl bei einem reduzierten Allgemeinzustand als auch zur Aufrecherhaltung der Nahrungsaufnahme, wenn die Möglichkeit einer Resektion nicht gegeben oder aber eine chirurgische Passagerekonstruktion aufgrund des fortgeschrittenen Tumorleidens unmöglich ist, eingesetzt.

Für die palliative Behandlung stehen endoskopisch-interventionelle Techniken zur Verfügung (Lambert 2001). Diese endoskopischen Methoden sind weniger belastend für die Patienten und sind meist ambulant durchführbar. Die endoskopischen Verfahren werden zurzeit in der Palliativtherapie des Ösophaguskarzinoms routinemäßig eingesetzt (Lambert 1994, Lambert et al. 1993, Neuhaus 1993, Spinelli et al. 1993, Tytgat 1994). Die Implantation einer selbstexpandierenden Metallendoprothese ist die beste Methode zur Behandlung der Dysphagie.

Die Dilatation (Bougierung) der Ösophagusstenosen wird häufig durchgeführt (Aste et al. 1985). Die Bougierung der Tumorstenosen im Ösophagus ist ambulant durchführbar und wenig belastend für den Patienten. Der Behandlungseffekt hält allerdings im Durchschnitt weniger als 2 Wochen an (Parker und Peura 1991). Wiederholungsbehandlungen sind notwendig. Deswegen ist die Bougierung nur im Zusammenhang mit einer Stentimplantation und einer Tumordestruktion durch lokale Verfahren im Rahmen palliativer Maßnahmen sinnvoll und ist heute als alleinige Dilatationsbehandlung nicht mehr gebräuchlich.

Die Lasertherapie, die mit dem YAG Laser (Yttrium-Aluminium-Granat-Laser) durchgeführt wird (Lambert 2001, Heier et al. 1995), dient zu der Rekanalisation der malignen Stenosen, zur Beseitigung des Tumorüberwuchses bei Vorliegen eines Stents und zur palliativen Verkleinerung des Tumors (Barr et al. 1990). Die endoskopische Rekanalisation gilt als wirkungsvolle Palliativmaßnahme vor allem bei kleineren, stenosierend wachsenden

Tumoren. Der Nachteil thermischer Verfahren liegt in der Notwendigkeit einer repetitiven Behandlung bis zum gewünschten Wirkungseintritt.

Hochprozentiger Alkohol führt zu einer vorübergehenden lokalen Destruktion des Tumorgewebes. Die Nachteile dieser Methode sind starke Nebenwirkungen wie z.B. retrosternale Schmerzen, Entstehung von ösophagorespiratorische Fisteln, Perforation und Mediastinitis. Diese Methode benötigt ebenfalls eine relativ hohe mittelfristige Reinterventionsrate (Chung et al. 1994).

Verschiedene Endotuben aus Kunststoffmaterial oder Metall wurden zur endoskopischen Tubuslegung angewendet. Der große Nachteil der Plastikstents bestand in der hohen Rate an Komplikationen, vor allem Perforationen, die mit einer hohen Letalität verbunden waren (Függer et al. 1990). Selbstexpandierende Stents aus Metall wurden in den 1980er Jahren entwickelt und 1990 eingeführt. Sie sind im Vergleich zu den Plastikstents sicherer und kosteneffektiver (Knyrim et al. 1993). Insofern ist die Stentimplantation im Vergleich zu den anderen interventionellen Methoden wegen des guten Behandlungserfolgs und der relativ geringen Komplikationsrisiko zu bevorzugen (Adam et al. 1997, Bartelsman et al. 2000). Nebenwirkungen der Stents sind druckbedingte Nekrosen, Blutungen oder retrosternale Schmerzen und Dislokationstendenzen des Stents. Es ist fraglich, ob eine vorhergehende Radio-/Chemotherapie das Risiko von Stentkomplikationen erhöht. Hierzu liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Manche Autoren gehen aufgrund retrospektiver Untersuchungen von einem erhöhten Risiko aus, wohingegen andere Studien einen solchen Zusammenhang verneinen (Kinsman et al. 1993, Raijman et al. 1997). Insgesamt lässt sich sagen, dass die Stentimplantation heute die erste Wahl zur Behandlung von ösophagorespiratorischen Fisteln und stenosierenden Tumoren im mittleren oder unteren Drittel des Ösophagus sowie im Bereich der Cardia darstellt (Kozarek et al. 1992, Cusumano et al. 1992, Goldin et al. 1994, Boyce 1993, Wu et al. 1994).

5.1.8 Prognose des Ösophaguskarzinoms

Das Ösophaguskarzinom hat trotz der Fortschritte in der Chirurgie und dem Einsatz multimodaler Therapiekonzepte eine schlechte Prognose. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegen schon bei 50 bis 60 % der Patienten Metastasen vor (Weitensfelder et al. 1985). Die spontane mittlere Überlebenszeit von Patienten liegt ohne Therapie nach der Diagnosestellung bei 6-12 Monaten. Nach Diagnosestellung sterben ungefähr 70 % unbehandelt im ersten Jahr und die 5-Jahrensüberlebensrate beträgt lediglich 3,6-7,7 % (Durst et al. 1996). Normaleweise wird der Tumor in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Die globale 5-Jahres-Überlebensrate ist weniger als 10 %. Bei gutem Allgemeinzustand und bei einem lokal begrenzten Ösophaguskarzinom (T1-T2/N0-N1/M0) ist eine en bloc. Ösophagektomie mit radikaler 2-Feld-Lymphadenektomie (abdominal/mediastinal) in der gleichen Sitzung indiziert. Eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 45 bis 60 % kann nach einer en bloc. Ösophagektomie mit radikaler Lymphadenektomie bei den submukosal gewachsenen Tumoren und von 100 % bei den intramukosalen Tumoren erreicht werden (Kato et al. 1990, Moghissi 1992, Nabeya et al. 1993, Sugimachi et al. 1993). Bei Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Tumorleiden (T3-T4/N1/M0) ist wegen der frühen mediastinalen Infiltration in Anbetracht des Bezugs zum Tracheobronchialsystem und der Anatomie des hinteren Mediastinums eine kurative Resektion nicht zu erreichen. Bei diesen Patienten kann ein Downstaging des Tumors durch eine neoadjuvante Radio-/Chemotherapie erzielt werden. Die neoadjuvante Radio-/Chemotherapie kann den Anteil der R0-Resektion und das rezidivfreie Intervall erhöhen, sie geht aber häufig mit einer erhöhten postoperativen Morbidität und Mortalität einher (Nakano et al. 2001, Benhidjeb et al. 2001). Die retrospektive Aufarbeitung chirurgischer und strahlentherapeutischer Studien ergaben für resektable lokalisierte Tumore eine 5-Jahres-Überlebensrate von 10 bis 36 % und für Patienten mit fortgeschrittenen, meist nur bestrahlten Tumoren eine Überlebensrate von 4 bis 6 % (Wong und Malthaner 2000, Yang et al. 2003). Der Grund dafür ist eine umfangreiche lokale Invasion, eine frühzeitige Infiltration benachbarter Strukturen (Aorta, Bronchialtrakt) durch den fehlenden Serosaüberzug in der zervikalen und der thorakalen Speiseröhre, die frühe lymphogene Metastasierung in die zervikalen, paraösophagealen, mediastinalen und parapankreatischen Lymphknoten aufgrund der engmaschigen Versorgung der Speiseröhre mit den Lymphwegen und die häufige hämatogene Metastasierung. Ziele für eine hämatogene Metastasierung sind: Lunge zu 21 %, Knochen zu 8 %, Niere zu 7 %, Netz zu 5 % und die Nebenniere zu 4 %.

Lymphogenen Metastasen sind häufiger (60-75 %) als hämatogenen Fernmetastasen (10-50 %) (Bühling et al. 2004).

5.2 Diskussionen von Material und Methodik

5.2.1 DNA Extraktion

Zum Nachweis von Mutationen und genetischen Polymorphismen muss vorher die DNA aus dem Blut oder aus dem zu untersuchendem Gewebe extrahiert werden. Die DNA Extraktion passiert nach international standardisierten Methoden und Protokollen.

5.2.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion ist die wiederholte Verdopplung von DNA in mehreren Zyklen. Um DNA auf Mutationen und genetische Polymorphismen zu untersuchen, muss die DNA vorher vervielfältigt werden.

5.2.2.1 Geschichte der PCR

Kary Banks Mullis hatte 1983 die Idee, DNA durch die wiederholten Verdoppelungen in mehreren Zyklen unter Zuhilfenahme von DNA-Polymerase künstlich zu vervielfältigen. Im ersten PCR Versuch von Mullis wurde bereits DNA-Polymerase Enzyme in vitro verwendet. Dies erforderte die Aufteilung der doppelsträngigen DNA in zwei Einzelstränge durch Erhitzen auf 96 °C. Diese hohe Temperatur zerstörte die verwendete DNA-Polymerase, was eine Erneuerung der DNA-Polymerase nach jedem Schritt erforderlich machte. Deswegen war dieses erste Verfahren sehr ineffizient und zeitaufwendig. Dieses Problem wurde mit der Entdeckung von thermostabilen DNA-Polymerasen beseitigt. Diese DNA-Polymerasen werden von thermophilen Bakterien gewonnen. Diese Art der DNA-Polymerase muss nicht mehr nach jedem Erhitzen erneuert werden, was eine Automatisierung des Verfahrens ermöglicht.

Die in dieser Studie verwendete Taq-Polymerase wurde zum ersten Mal 1980 von dem russischen Forscher Kaledin entdeckt. Taq-Polymerase wird aus dem Bakterium Thermus aquaticus gewonnen. Thermus aquaticus gehört zu den wärmeliebenden Bakterien und lebt in Quellen mit einer Umgebungstemperatur von etwa 50-80 °C.

5.2.2.2 Prinzip der PCR

Die Durchführung einer PCR erfordert folgende Komponenten:

- Die Orginal-DNA: Diese enthält den Abschnitt, der zu vervielfältigen ist.
- Zwei Primer: Die Primer legen auf den beiden DNA-Strängen jeweils den Startpunkt der DNA- Synthese fest. So wird der zu vervielfältigender Abschnitt von beiden Seiten begrenzt. Man unterscheidet zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimern. Ein Primer ist eine Spiegelbildkopie eines charakteristischen Abschnittes aus der nachzuweisenden DNA-Sequenz. Diese müssen zur Basenfolge der zu amplifizierenden DNA exakt komplementär sein. Typische Primer sind 15 bis 20 Basen lange Oligonukleotidsequenzen.
- DNA-Polymerase: Die DNA-Polymerase repliziert den festgelegten DNA-Abschnitt durch Verknüpfung der Desoxynukleosidtriphosphate zu einer Kette.
- Pufferlösung: Um die geeignete chemische Umgebung für die DNA-Polymerase sicherzustellen, wird eine Pufferlösung benötigt. Die Pufferlösung stellt die chemische Umgebung für die Funktion der DNA-Polymerase sicher.
- Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs): dNTPs sind die Bausteine für die Synthese des DNA-Stranges.

Die PCR besteht aus 25 bis 50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Im Thermocycler laufen die verschiedenen temperaturabhängigen Schritte der PCR vollautomatisiert ab. Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten. Durch die mehrmalige Wiederholung der zyklischen Abläufe wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert.

1. Denaturierung (Melting): Die DNA besteht aus zwei Einzelsträngen, die durch Wasserstoffbrücken zwischen Purin- bzw. Pyrimidinbasen miteinander verbunden sind. Die Spaltung dieser Wasserstoffbrücken zu Gewinnung zweier Einzelstränge erfordert ein Erhitzen der DNA auf 94-96 °C. Jede PCR beginnt mit einer längeren Denaturierungsphase. Jedem neuen Zyklus wird ein kürzerer Denaturierungsschritt von 45 bis 90 Sekunden vorgeschaltet.

2. Primerhybridisierung (primer annealing): Auf die Denaturierungsphase folgt eine Annealingsphase. Hierzu wird die Temperatur gesenkt. Die Temperatur in dieser

Phase liegt normalerweise 2 bis 3 °C unter dem Schmelzpunkt der Primer und ist vom jeweils verwendeten Primern abhängig. Typischerweise liegt die Temperatur zwischen 50 und 65 °C. In dieser Phase lagern sich die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte an.

3. Elongation (Verlängerung, Polymerisation): Das Verfahren wird mit der so genannten Elongationsphase abgeschlossen. Die Temperatur in dieser Phase hängt von der verwendeten DNA-Polymerase ab. Für die Taq-Polymerase beträgt die Temperatur 72 °C. In diesem Bereich kann die Taq-Polymerase am besten arbeiten und zeigt die höchste Aktivität. In diesem Prozessschritt nutzt die DNA-Polymerase einen bereits bestehenden DNA-Strang als Matrize und synthetisiert den komplementären DNA-Strang. Die Synthese beginnt am 3´-Ende des angelagerten Primers. Am Ende dieser Phase liegt eine doppelsträngige DNA vor, die einen alten DNA-Strang und einen neu synthesierten Strang enthält. Die Elongation dauert unterschiedlich lang, meistens zwischen 20 und 90 Sekunden und ist von der DNA-Polymerase und der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Fragments abhängig.

4. Die Schritte 1-3 werden 25-40 Mal wiederholt. Das resultierte Gemisch wird bei 4-8 °C aufbewahrt. Man kann die PCR über Nacht laufen lassen. Die DNA wird bei dieser Temperatur nicht beschädigt.

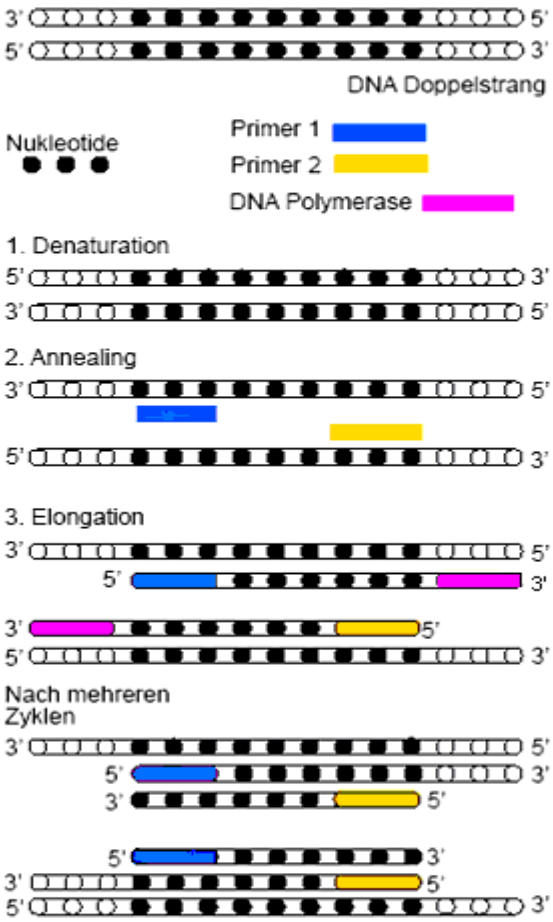

Abb. 12 Schematische Darstellung des PCR-Zyklus

5.2.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese führt zu einer Aufteilung der Moleküle nach ihrer Größe und ermöglicht somit den Vergleich mit Strängen bekannter Größe.

5.2.3.1 Prinzip der Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Analysemethode für geladene Moleküle (z.B. DNA, RNA). Die zu trennenden Moleküle wandern je nach Ladung und Größe unterschiedlich schnell durch ein als Trägematerial dienendes Gel, das innerhalb eines elektrischen Feldes liegt. Dabei wandern die kleinen negativ geladenen Moleküle (Anionen) in Richtung der positiv geladenen Anode und die größeren positiv geladenen Moleküle (Kationen) in Richtung der negativ geladenen Kathode. Das als Trägematerial verwendete Gel liegt in einer ionischen Pufferlösung. In der durchgeführten Studie wurde ein Agarose-Gel verwendet. Agarose-Gele sind relativ großporig und eignen sich sehr gut für die Trennung von DNA und

hochmolekularen Proteinen. Die zu trennenden Moleküle werden nach der Elektrophorese mit der Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar.

5.2.4 RFLP

Durch das Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Verfahren, abgekürzt RFLP-Verfahren, werden Unterschiede zwischen DNA-Sequenzen homologer Chromosome nachgewiesen. Die Analyse über RFLP/PCR ist die sensitivste und spezifischste Methode um Punktmutationen festzustellen und ermöglicht zusätzlich einen hohen Durchlauf an Proben (Marsh 1999). Bei dieser Methode können weniger als ein mutiertes Allel in zehn wildtyp Allelen erkannt werden (Parsons und Heflich 1997). RFLPs sind im menschlichen Genom häufig. Vergleicht man zwei individuelle Chromosome miteinander tauchen Unterschiede in der Basenpaarung mit einer Häufigkeit von > 1 pro 1000 bp auf (Lewin 1997).

Die DNA-Sequenzen werden als verschiedene Restriktionsfragmentmuster sichtbar. Bei dem RFLP-Verfahren nutzt man die individuellen Schnittstellen der Restriktionsnukleasen. Die Restriktionsenzyme sind in der Lage, hochspezifisch die Abfolge bestimmter Basensequenzen zu erkennen und den DNA-Doppelstrang an dieser Stelle zu durchtrennen, wodurch Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge entstehen.

Die genetischen Polymorphismen können zu veränderten Schnittmustern der Restriktionsendonukleasen führen. Durch Basenaustausch kann es folglich zu Hinzugewinnen oder Verlusten von Restriktionsschnittstellen kommen, wodurch sich nach dem Restriktionsverdau die Länge der DNA-Fragmente vom Wildtyp (Normalsequenz) unterscheidet. Diese Fragmente lassen sich nach der Größenauftrennung im Agarose-Gel durch Anfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff darstellen. Das RFLP-Verfahren wird zur Detektion bekannter Basenaustausche sowie zur Bestätigung von neu identifizierten Mutationen eingesetzt.

Bei der RFLP-Analyse sind gewisse Störfaktoren zu beachten. Zum einem können die Reaktionsansätze und PCR-Produkte kontaminiert sein. Zum anderen brauchen die Restriktionsenzyme eine bestimmte Temperatur für eine optimale Arbeit. Diese Methode ist somit sehr anfällig für Temperaturschwankungen. Eine Temperatur unterhalb der Norm kann dazu führen, dass die DNA nicht verdaut wird.

5.2.5 Statistische Auswertung

Die Kaplan-Meier-Methode basiert auf den individuellen Überlebenszeiten der Patienten und ist ein gebräuchliches Verfahren zum Schätzen der Survivalfunktion. Die Survivalfunktion gibt den Anteil der Personen wieder, die bis zum Zeitpunkt t überlebt haben. Der Log-Rang-Test gehört zu den nicht parametrischen Verfahren und ist das Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche (Bender et al. 2002). Das Cox-Regressionsmodell ist die populärste Regressionsmethode zur Analyse von Überlebensdaten. Wenn der Effekt mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable untersucht werden soll, wird die Cox-Regressionsanalyse eingesetzt. In der durchgeführten Studie wurde diese Methode zu Analyse des unabhängigen Einflusses des Arg290Arg Polymorphismus mit anderen Covarianten verwendet. Für alle Variablen wurden Kreuztabellen erzeugt und die P-Werte wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests und des Fisher-Exact-Tests berechnet. Die Assoziation zwischen DNA-Polymorphismus und dem Risiko für die Entwicklung eines Ösophaguskarzinoms wurde durch die Berechnung des Quotenverhältnisses (Odds Ratio) und des 95 %-Konfidenzintervalls abgeschätzt.

5.3 Molekularbiologische Daten über das Ösophaguskarzinom

5.3.1 Bisherige Erkenntnisse

Die Tumorgenese ist ein mehrstufiger Prozess, der entweder mit Aktivierung der Onkogene oder mit Inaktivierung der Tumorsuppressorgene einhergeht (Lu 2000). Tumorzellen entstehen durch Veränderung der Onkogene und/oder der Tumorsuppressorgene einschließend von Umlagerungen, Amplikationen und Deletionen. Diese Veränderungen betreffen meist Proteine, die für die Kontrolle der Zellproliferation eine zentrale Rolle spielen. Veränderungen dieser Proteine können die Entstehung von Tumorzellen begünstigen und/oder einleiten. Die Identifizierung und Isolierung dieser Gene, deren Expression in von Tumoren befallenen Zellen im Vergleich zu gesunden Zellen deutlich verändert ist, hat insofern Anhaltspunkte für das Verständnis vieler biologischer Prozesse einschließlich neoplastischen Transformationen geliefert (Wang et al.2008).

Fortschritte in der Medizin haben in den letzten Jahrzehnten erheblich dazu beigetragen, neue Behandlungsstrategien und -methoden zu entwickeln. Neben dem Alter, der Tumortiefe, dem Lymphknotenstatus und der Fernmetastasierung wurden viele andere Marker für das

Ösophaguskarzinom identifiziert, denen verschiedene Bedeutungen bei der Prognose und dem Verlauf der Krankheit zukommen. Es wurde festgestellt, dass die Expression von verschiedenen Proteinen wie epidermal growth factor receptor (EGRF), Cyclooxygenase-2 (COX2) und Transforming Growth Factor (TGF β) mit einer kurzen Überlebenszeit und mit einer hohen Aggressivität des Tumors verbunden ist (Kuo et al. 2003, Kulke et al. 2005, Xi et al. 2005, Fukai et al. 2003, Ikeda et al. 1999).

Maligne Tumoren entstehen als Folge von Veränderungen verschiedenster zellulärer Regulationsmechanismen. Die Veränderungen in den Regulationsmechanismen führen schließlich zu ungehemmter Proliferation, infiltrativem Wachstum in gesundes Gewebe und zu einer Metastasierung des Tumors. Die Entstehung von Tumoren ist ein multifaktorieller Prozess. Frühere Studien zeigten, dass bei Tumoren sowohl die Zellzyklusregulation als auch die Zelltodmechanismen gestört sind. Die Störung der Apoptoseprogramme und der Zellzyklusregulation spielen eine wesentliche Rolle beim Übergang vom normalen zu einem malignen Zellwachstum. Die Störungen der Proliferations- und Apoptosekontrolle führt zur Enthemmung der Zellproliferation bei einem schon aufgrund einer genetischen Veränderung entstandenen Tumor. Außer der Störung der Zellzyklus- und Apoptoseregulatoren sind auch Störungen in den Signalwegen ursächlich für die Entstehung von Tumoren. Die genetischen Signalwege, beispielsweise der Signalweg für die DNA-Reparatur, kontrollieren die genetische und chromosomale Stabilität (Wyllie et al. 1999, Scott und Alan 1997).

DNA- Polymorphismen werden immer wieder bei Protein-Expressions-Analysen entdeckt. Nur wenige genetische Marker sind zurzeit für ihre klinische Bedeutung evaluiert. Für die Kontrolle des Zellzyklus hat die Zelle verschiedene Restriktionspunkte eingerichtet. An den Restriktionspunkten findet die Überprüfung statt, bevor die Zelle in die nächste Phase wechselt. Der Eintritt ruhender Zellen aus der G0-Phase in die G1-Phase und aus der G1-Phase in die S-Phase wird durch mehrere, konsekutiv wirkende Restriktionspunkte in der G-Phase vermittelt. Durch diese Restriktionspunkte wird die Progression der proliferierenden Zelle durch die frühe in die späte G1-Phase und der Übertritt in die S-Phase reguliert. Wenn die Restriktionspunkte nicht aktiviert sind, kann die Zelle in die S-Phase übergehen und die DNA-Synthese beginnen sowie die spätere M-Phase vorbereiten. Dieser Vorgang wird engmaschig kontrolliert durch die koordinierte und phasen-spezifische Expression der G1-Phase-Cycline: D1, D2, D3 und E. Diese Cykline aktivieren die cyclinabhängigen Kinasen (CDK). Die D-Cykline interagieren mit CDK4 und CDK6; Cyklin E hingegen mit CDK2. In

mehreren Schritten phosphorylieren die cyklinabhängigen Kinasen das Rb-Protein. Hierdurch wird die Repression der Transkriptionsfaktoren wie E2F und c-myc, die die S-Phase aktivieren, aufgehoben (Evan und Vousden 2001). Viele Studien zeigen, dass eine Überexpression von Cyklin D1 eine wichtige Rolle bei der Proliferation von Ösophagustumoren spielt. Insofern konnte es als ein negativer prognostischer Faktor etabliert werden (Shinozaki et al. 1996, Takeuchi et al. 1996, Mathew et al. 2002, Toyoda et al. 2000, Anayama et al. 1998).

Die Dysregulation des Zellzyklus hat bei der Entstehung von Tumoren eine zentrale Bedeutung. Eine Störung des G1-Restriktionspunkts kann in Tumoren durch die Inaktivierung des $p16^{INK4a}$ Gens entstehen (Izzo et al. 2007). P53 induziert bei DNA Schäden und Hypoxie. $P16^{INK4a}$ verhindert die Assoziation von CDK4 und CDK6 mit den D-Typ-Cyklinen. So wird das Rb-Protein nicht phosphoryliert und führt zu einem G_1-Arrest. Eine Inaktivierung von $p16^{INK4a}$ kann sich auf verschiedenen Ebenen ereignen. Die Inaktivierung kann durch homozygote Deletion, durch Punktmutation und/oder durch die Hypermethylisierung von Promotoren erfolgen. Die Mehrzahl dieser Veränderungen führt zu einer verringerten oder zu einer fehlenden $p16^{INK4a}$ Proteinexpression (Takeuchi et al. 1997). Humane Tumorzellen mit fehlender $p16^{INK4a}$ Aktivität sind resistent gegenüber dem DNA-schädigungsinduzierten Wachstumsarrest im Vergleich zu Zellen mit einer intakten $p16^{INK4a}$ und Rb Expression und Funktion (Reed et al. 1996).

Außer $p16^{INK4a}$ spielt auch $p27^{KIP1}$eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren. Die Störung des späten Restriktionspunkts ist in der Tumorpathogenese und in der Tumorbiologie von Bedeutung. In den vorherigen Studien wurde sowohl für Verlust von $p27^{KIP1}$ als auch für Überexpression von Cyklin E (Porter et al. 1997, Catzavelos et al. 1997, Xiangming et al. 2000, Donnellan et al. 2001) einen Zusammenhang mit der Entstehung und Prognose des Ösophaguskarzinoms nachgewiesen. Bei einer Überexpression von Cyklin E kann eine S-Phaseprogression ausgelöst werden. Der CDK Inhibitor $p27^{KIP1}$ hemmt Cyklin E/CDK2. In den bisher publizierten Studien konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des $p27^{KIP1}$ Proteins mit der Prognose des Ösophaguskarzinoms im Zusammenhang stehen. Für den Verlust der $p27^{KIP1}$ Proteinexpression konnte gezeigt werden, dass die Störung mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Shapiro et al. 1998, Ohashi et al. 1999, Shamma et al. 2000, Sakurai et al. 1998).

Das p53 Protein ist der Aktivator für eine große Anzahl von Genen, die an der Regulation des Zellzyklus und an der Apoptose beteiligt sind. Um der Einfluss des p53 Proteins auf die Prognose von Patienten mit Ösophaguskarzinom einzuschätzen, wurden die Komponenten des p53 Signalwegs, p53 und die p53 Effektoren, $p21^{CIP/WAF-1}$ und Bax in bereits durchgeführten Studien untersucht. Wenn p53 aktiviert ist, wirkt es durch Aktivierung der Inhibitoren des Zellzyklus wachstumshemmend bzw. kann die Apoptose induzieren (Kannan et al. 2001). In vielen Tumoren einschließlich des Ösophaguskarzinoms wurde eine Mutation des p53 Gens nachgewiesen (Yasunaga et al. 1999). Die bisher durchgeführten Studien über die Rolle des p53 Gens in der Prognose und Tumortherapie bei Patienten mit Ösophaguskarzinom lieferten unterschiedliche Ergebnisse. In einer Reihe von Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die p53 Inaktivierung durch eine Mutation oder durch die Überexpression des p53 Proteins ein negativer prognostischer Faktor ist (Hollstein et al. 1990, Shimoyama et al. 1998, Ribeiro et al. 1998, Pomp et al. 1998). Eine Assoziation zwischen der p53 Mutation und einer schlechten Prognose konnte allerdings in einer Reihe neueren Studien nicht bestätigt werden (Hardwick et al. 1997, Lam et al. 1997). Im Gegensatz zu p53 korrelierte die Inaktivierung beider p53 Effektorgene, d.h. sowohl von Bax als auch von $p21^{CIP/WAF-1}$, bei den jeweiligen Einzelgenanalysen mit einer schlechteren Prognose der Patienten (Patel et al. 1997, Hardwick et al. 1997, Sarbia et al. 1994).

5.3.2 ECRG

Molekularbiologische Untersuchungen zeigen, dass genetische Abnormalitäten in Ösophaguskarzinomen vorkommen (Montesano et al. 1996, Lu et al. 1998). Allerdings ist der genaue Mechanismus der Entstehung des Ösophaguskarzinoms noch nicht genau bekannt. Die meisten vorherigen Studien waren auf die Identifizierung des ECRG1 konzentriert.

ECRG1 ist ein Tumorsuppressorgen, das in der humanen Speiseröhre nachgewiesen wurde. Das Gen wurde in den vorherigen Studien mit Hilfe der effizienten Methode mRNA differential Display identifiziert (Liu et al. 1999). Bei dieser Methode wurde die unterschiedlichen Genexpressionen zwischen normalem Ösophagus und Ösophaguskarzinom verglichen. Vier ECRG1-4 wurden identifiziert. Die Ausprägung von ECRG wurde mit der Hilfe der RT- PCR- Methode (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) dargestellt. Die Ausprägung von ECRG zwischen dem normalen Epithel und dem Ösophaguskarzinom war signifikant unterschiedlich. In verschiedenen Tumorgeweben und in den Tumornachbargeweben, gewonnen aus der Leber, Lunge, Kolon und Endometrium, wurde die

Expression des ECRG1 und des ECRG2 mit der RT-PCR-Methode nicht dargestellt, während das ECRG3 stark exprimiert war. Die ECRG4 Expression war in den Nachbargeweben höher als in den Tumorgeweben. Man hat angenommen, dass zwischen der Entwicklung und der Progression des Ösophaguskarzinoms und dem ECRG1 und ECRG2 ein kausaler Zusammenhang besteht (Su et al. 1998).

Das ECRG2 ist bei Ösophaguskarzinomen runterreguliert und beteiligt sich in der Induktion der Apoptose in den Ösophaguszelllinien (Cui et al. 2003). Ein Short Tandem Repeat (STR) Polymorphismus wurde in Exon 4 des ECRG2 Gens gefunden. Drei STR Genotypen: TCA_3/TCA_3, TCA_3/TCA_4 und TCA_4/TCA_4 wurden identifiziert. Der STR Polymorphismus in Exon 4 des ECRG2 Gens wurde als ein Risikofaktor für das Ösophaguskarzinom beschrieben. STR Polymorphismus TCA_3/TCA_3 in Exon 4 des ECRG2 ist mit einer schlechten Prognose für das Ösophaguskarzinom assoziiert. Das ECRG2 Gen scheint eine Rolle in der Entwicklung des Ösophaguskarzinoms spielen (Blessmann et al. 2007, Yue et al. 2004, Kaifi et al. 2007).

Das ECRG1 wurde mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion und der Northen Blot Methode im normalen Ösophagus Gewebe, in Colon, Leber und Lunge entdeckt. Das Gen war aber in den Tumorgeweben und besonders im Ösophaguskarzinom Gewebe runterreguliert. Das ECRG1 hemmt in vitro und in vivo die Tumorzellproliferation (Wang et al. 1998). Bioinformatische Untersuchungen zeigten, dass das Protein, das vom ECRG1 verschlüsselt ist, zur Familie der Serin Proteasen gehört (Netzell et al. 2003). Das ECRG1 Protein beteiligt sich an den proteolytischen Reaktionen, die für eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen von essenzieller Bedeutung sind (Rawlings et al. 1994). Die Regulation dieser Prozesse ist nicht nur für Matrix Remodelling wichtig, sondern auch für die Regulierung des Wachstums und für die Differenzierung durch Aktivierung und/oder Freisetzung von funktionell unterschiedlichen Effektormolekülen, einschließlich Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Zelloberflächenrezeptoren. Darüber hinaus wurde die Beteiligung vieler Serin Proteasen, zu denen auch das ECRG1 zählt, während Phasen der Tumorsuppression dokumentiert (Hooper et al. 1999). Das ECRG1 ist ein Transmembranprotein. Bioinformatische Analysen zeigen, dass das von dem ECRG1 kodierte Protein 40 % homolog zur humanen Serin Protease ist. Es wurde festgestellt, dass das ECRG1 Protein vor allem aus einer a-helix aus 30 % Aminosäuren, einer zufälligen Windung aus 46 % Aminosäuren und einem Verlängerungsstrang aus 18 % Aminosäuren besteht. Das ECRG1

Protein hat hydrophile Eigenschaften. Die a-helix besteht aus 21 N- terminalen Aminosäuren. Das ECRG1 Protein besitzt eine serin phosphorylierte und eine glykolysierte Seite (Wang et al. 2008).

Das p16 ^{INK4a} -Gen reguliert die Zellproliferation in beiden G1/S und G2/M Restriktionspunkten. Eine zuvor durchgeführte Studie zeigte, dass das ECRG1 und die durch das ECRG1 verschlüsselten Fusionsproteine die Tumorzellproliferation sowohl in vivo als auch in vitro hemmen. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass die Expression des ECRG1 zu einem Zellzyklus Arrest in der G2/M Phase führen. Das p16 ^{INK4a} -Gen scheint für die Vermittlung des Zellzyklus Arrests in der G2/M Phase durch die Expression des ECRG1 mitverantwortlich zu sein (Wang et al. 2008).

Eine ECRG1 Überexpression kann das Zellwachstum hemmen und einen G1 Zellzyklusarrest und eine P15^{INK4b} Expression durch Interaktion mit Miz-1 (Myc- interacting zinc finger protein) induzieren. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass Veränderungen im ECRG1 eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen. In einer Studie wurde das ECRG1 in eine NIH3T3 Zelle transfiziert. Die Expression des ECRG1 in diesen Zellen hat eine Reihe von Veränderungen verursacht. Diese Veränderungen beinhalten die Transformation der Zellmorphologie, den Zellzyklusarrest in der G1/S Phase und eine eindeutige Beeinträchtigung der Zellproliferation. In dieser Studie wurden auch die Veränderungen der Telomeraseaktivität von p21 und p16 ^{INK4a} in den Zellen untersucht. Eine Verminderung der Telomeraseaktivität und eine Erhöhung der p21 Expression wurden durch die Induktion des ECRG1 hervorgerufen, während keine Veränderung in der p16 ^{INK4a} Expression beobachtet wurde (Nianxi et al. 2006).

In einer anderen Studie hat man mit der Hilfe eines konfokalen Mikroskops festgestellt, dass das ECRG1 mit Miz-1 im Zellkern colokalisiert ist. Die Transfektion des ECRG1 in den Speiseröhretumorzellen hemmte die Tumorzellproliferation und induzierte einen G1/S Phase Arrest. Bei der Cotranfektion des ECRG1 und des Miz-1 in die Tumorzellen wurde ebenfalls eine Inhibition der Zellproliferation und der G1/S Phase festgestellt. In diesem Fall wurde eine stärkere Zellproliferation- und G1/S Phasen-Hemmung im Vergleich zur getrennten Transfektion des ECRG1 oder des Miz-1 in die Tumorzellen induziert. Zudem kann die Interaktion des ECRG1 und der Miz-1 die Expression des p15^{INK4b} Gens in Ösophaguskarzinomzellen induzieren. Allerdings hat die getrennte Transfektion des ECRG1 und der Miz-1 keine Expression des p15^{INK4b} Gens gezeigt. Die Transfektion von Miz-1

alleine konnte auch keine Expression des 15^{INK4b} Gens induzieren. Die Ergebnisse dieser Studie liefern Hinweise, dass das ECRG1 und das Miz-1 in den Ösophaguskarzinomzellen mit der Regulation des Zellzyklus und der Expression des $p15^{INK4b}$ Gens assoziiert sind. Sie weisen darauf hin, dass ECRG1 die Tumorzellproliferation durch Wirkung auf den Zellzyklus hemmt. Die Expression des $p15^{INK4b}$ Gens fördert wahrscheinlich den Zellzyklusarrest während der Interaktion des ECRG1 und der Miz-1. In dieser Studie konnte man nachweisen, dass die Interaktion des ECRG1 und der Miz-1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Ösophaguskarzinoms spielt (Zhao et al. 2004).

5.4 Diskussion der Ergebnisse

5.4.1 DNA- Polymorphismus und die Ergebnisse dieser Studie

In einer vor kurzem durchgeführten Studie wurde das ECRG1 identifiziert. Drei SNPs lokalisiert in den Exons 3, 8 und 9 wurden gefunden. Das SNP in dem Exon 8 führt zu einem Arg→Gln Aminosäure Austausch am Codon 290. Das Ergebnis sind drei Variationen 290Arg/Arg, 290Arg/Gln und 290Gln/Gln. Es wurde vermutet, dass die Variationen des SNPs im ECRG1 die Entwicklung eines Ösophaguskarzinoms beeinflussen.

In dieser Studie wurden insgesamt 107 Patienten mit Ösophaguskarzinom und 100 gesunde Personen untersucht. Insgesamt 5 Patienten wurden aufgrund fehlerhafter Follow-up-Daten aus der Studie ausgeschlossen. In der durchgeführten Studie wurde die Rolle des SNPs (Arg290Gln) im ECRG1 auf die Entwicklung des Ösophaguskarzinoms und auf die Prognose der Patienten mit dem Ösophaguskarzinom in der europäischen Bevölkerung untersucht. Die statistischen Analysen mit dem Cox-Regressionsmodell zeigten, dass die Patienten mit dem Genotyp Arg/Arg eine signifikant schlechtere Prognose haben. Die Analysen ergaben eine signifikante Assoziation zwischen dem 290Arg/Arg Genotyp und einem höheren Risiko für die Entwicklung eines Ösophaguskarzinoms im Vergleich zu Patienten mit einem 290Gln Allel (p=0,011). Das Quotenverhältnis (Odds Ratio) betrug beim Vorhandensein des 290Arg290 Genotyps 1,77 (CI 1,01 – 3,10). Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass der 290Arg/Arg Genotyp ein Risikofaktor für die Entstehung eines Ösophaguskarzinoms ist und mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Es konnte in der Cox-Regressionsanalyse festgestellt werden, dass der DNA-Polymorphismus ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben ist (p=0,046). Die Anwesenheit eines Gln Allels ist ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben und geht mit einer

signifikant günstigeren Prognose einher (p=0,012). Außerdem waren das Alter, das Grading und die Tumorinvasionstiefe unabhängige Faktoren für das Überleben der Patienten. In dieser Studie konnte die Lymphknotenmetastasierung in der multifokalen Analyse nicht als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert werden. Diese kann durch eine enge Assoziation der Lymphknotenmetastasierung mit der Tumorinvasionstiefe erklärt werden.

5.4.2 Diskussion der klinischpathologischen Daten

In dieser Studie wurde auch der mögliche Einfluss der klinischpathologischen Daten wie Alter, Geschlecht, Tumorinvasionstiefe, Lymphknotenmetastasierung und die histologische Differenzierung des Tumors in der Prognose der Patienten mit Ösophaguskarzinom untersucht.

Die bereits dargestellten Ergebnisse mit Hilfe des Log-Rang-Tests zeigten, dass die Prognose der Patienten mit Ösophaguskarzinom von mehreren Faktoren abhängig ist. Diese Faktoren beinhalten das Alter, die Lymphknotenmetastasierung, die Tumorinvasionstiefe, das Tumorstadium und das Grading. Es wurde nachgewiesen, dass die Patienten mit einem höheren Lebensalter eine schlechtere Prognose als jüngere Patienten haben (p=0,034). Bei den Patienten mit Lymphknotenmetastasen wurde eine schlechtere Prognose beobachtet (p=0,024). Ein fortgeschrittenes Tumorstadium ist mit einer schlechteren Prognose verbunden (p=0,046). Außerdem geht ein undifferenzierter Tumor mit einer schlechteren Prognose einher (p=0,047). Die Analysen mit dem Cox-Regressionsmodell zeigten, dass das Alter, die Tumorinvasionstiefe und die histologische Differenzierung des Tumors unabhängige Faktoren für das Überleben der Patienten sind.

Insgesamt kann postuliert werden, dass ein höheres Lebensalter, ein Nachweis von Lymphknotenmetastasen, ein fortgeschritteneres Tumorstadium und ein undifferenzierter Tumor Faktoren sind, die mit einer schlechteren Prognose des Ösophaguskarzinoms einhergehen. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Faktoren sind das Geschlecht der Patienten und die Histomorphologie des Tumors keine prognostisch relevanten Faktoren.

5.4.3 Vergleich der Studien

Die festgestellten Ergebnisse der hier durchgeführten Studie weichen von den Erkenntnissen aus der Studie von Li und seinen Kollegen, die an asiatischen Patienten durchgeführt wurde, ab. In der Studie von Li und seinen Kollegen wurden zwei Populationen ausgewählt.

Extrahierte DNA-Proben von 80 Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus aus dem Linxian, ein Gebiet in Nordchina mit erhöhtem Risiko für Ösophaguskarzinome, wurden zur Darstellung von SNPs im ECRG1 verwendet. Die Fallkontrollstudie bestand aus 998 Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und 1252 gesunden Kontrollpersonen. Die hier vorliegende Studie wurde in einer europäischen Bevölkerung durchgeführt. 107 Patienten mit Ösophaguskarzinom und 100 gesunde Personen wurden in diese Studie eingeschlossen. Histologische Untersuchungen ergaben 41 (38,8 %) Adenokarzinome und 66 (61,7 %) Plattenepithelkarzinome des Ösophagus.

Die Fallkontrollstudie der chinesischen Bevölkerung wurde durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen dem 290Arg/Gln Polymorphismus und der Anfälligkeit für das Entstehen des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus zu überprüfen. Die Auswirkung der ECRG1 Genotype wurde außerdem für potentielle Variablen wie Alter, Geschlecht, Rauchen und histologische Differenzierung der Tumore untersucht. Für Personen, die mindestens ein 290Gln Allel (290Arg/Gln oder 290Gln/Gln Genotyp) hatten, bestand ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus. Personen mit mindestens einem 290Gln Allel haben dieser Studie zufolge ein 1,23 Fach höheres Risiko für die Entwicklung eines Ösophaguskarzinoms als Personen mit dem homozygoten 290Arg/Arg Genotyp. Ein signifikant erhöhtes Risiko wurde für Raucher, die die Träger mindestens eines 290Gln Allels waren, festgestellt. Eine multiplikativ gemeinsame Wirkung wurde zwischen den ECRG1 290Gln/Gln oder 290Arg/Gln Genotypen und Zigarettenrauchen beobachtet. Unter den Nichtrauchern waren die Genotype 290Gln/Gln oder 290Arg/Gln nicht mit einem erhöhten Risiko assoziiert. Es wurde außerdem beobachtet, dass das Risiko für die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms im Einklang mit der kumulativen Dosis bei Rauchern steigt. Darüber hinaus schien die Wirkung der ECRG1 Genotype 290Gln/Gln oder 290Arg/Gln als ein Risiko für die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms mehr bei den männlichen als die weiblichen Probanden ausgeprägt zu sein. Es wurde kein Zusammenhang zwischen ECRG1 Genotypen und histologischer Differenzierung des Plattenepithelkarzinoms und dem Geschlecht der Patienten gefunden. Das zweifach erhöhte Risiko für Ösophaguskarzinom bei Rauchern mit mindestens einem 290Gln Allel im Vergleich zu Nichtrauchern ist ein gutes Beispiel für die Gen-Umwelt-Interaktion bei der Genese des Ösophaguskarzinoms (Li et al. 2006).

Nach der hier durchgeführten Studie an europäischen Patienten haben die Patienten mit dem 290Arg/Arg Genotyp ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Ösophaguskarzinoms und eine signifikant schlechtere Prognose. Ein höheres Lebensalter, ein Nachweis von Lymphknotenmetastasen, ein fortgeschritteneres Tumorstadium und ein undifferenzierter Tumor sind weitere Faktoren, die mit einer schlechteren Prognose des Ösophaguskarzinoms einhergehen. Eine mögliche Assoziation vom Genotyp 290Arg/Arg und Zigarettenrauch wurde nicht untersucht.

Der Unterschied zwischen der hier vorliegenden Studie und der vor kurzer Zeit durchgeführten Studie in China über die Rolle des ECRG1 in der Entwicklung und der Prognose des Ösophaguskarzinoms in den chinesischen und europäischen Populationen könnte verschiedene Gründe haben. Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser zwei Studien könnten daran liegen, dass in der hier durchgeführten Studie Patienten sowohl mit Adenokarzinomen als auch mit Plattenepithelkarzinomen untersucht wurden. In dieser Studie stellte sich jedoch die Histomorphologie des Tumors als statistisch nicht signifikanter Faktor heraus. Im Gegensatz dazu wurde in der chinesischen Studie die Rolle des ECRG1 nur in der Entwicklung und Prognose des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus analysiert. Andere Faktoren wie die genetische Differenzierung und Umweltfaktoren in den verschiedenen ethnischen Gruppen könnten bei der Entstehung von unterschiedlichen DNA-Polymorphismen im ECRG1 eine Rolle spielen.

Die zwei Studien über die Rolle des ECRG1 in der Entwicklung und Prognose des Ösophaguskarzinoms in der chinesischen und europäischen Bevölkerung müssten zukünftig zur Überprüfung der Ergebnisse erneut durchgeführt werden. Durch zusätzliche Studien könnten die eventuell vorkommenden Fehler in der Studie von Li und Kollegen und in der hier vorliegenden Studie bzw. in beiden Studien ausgeschlossen werden. Durch den Vergleich der erneut durchgeführten Studien könnten die jetzigen Resultate über den DNA-Polymorphismus im ECRG1 in der chinesischen Studie und in der hier vorliegenden Studie bestätigt oder abgelehnt werden.

In den zwei genannten Studien wurden zwei unterschiedliche ethnischen Gruppen untersucht. Menschliche Populationen können sich genetisch voneinander unterscheiden. Obwohl alle Menschen derselben Spezies angehören, besteht innerhalb von ethnischen Populationen eine gewisse, wenn auch kleine Varianz. Diese interindividuelle genetische Variabilität ist für die Unterschiede in den äußeren Merkmalen wie z.B. Hautfarbe, Größe und Gestalt zuständig.

Außerdem sind Unterschiede in den Blutgruppenmerkmalen, Transplantationsmerkmale und in den Mutationen, die zu genetischen Erkrankungen führen, zu finden. Diese Unterschiede sind auf Differenzen in den Allel- Häufigkeiten in verschiedenen Bevölkerungen zurückzuführen. Bevölkerungsgruppen, die durch verschiedene Merkmale miteinander korrelieren, werden als ethnische Gruppen bezeichnet. Eine ethnische Gruppe ist eine mehr oder weniger isolierte Gruppe von Menschen, die sich von anderen Gruppen im Genpool wesentlich unterscheidet. Die Ausbildung genetischer Differenzierung zwischen menschlichen Bevölkerungen kann von natürlichen Selektionsfaktoren der Vergangenheit abhängen. Anderseits kann die genetische Differenzierung auf zufällige Prozesse bei der Vererbung der Allele basieren oder durch die zufällige Verteilung der Allele in den Populationen hervorgerufen werden. Diese unterschiedliche genetische Differenzierung könnte erklären, warum bestimmte ethnische Gruppen anfälliger für manche Krankheiten sind.

Wie in dieser vorliegenden Arbeit beschrieben wurde, sind an der Entstehung des Ösophaguskarzinoms mehrere genetische Veränderungen beteiligt. Darüber hinaus spielen Umwelteinflüsse wie der Lebensstil oder der Kontakt mit krebserzeugenden Substanzen eine wichtige Rolle. Beim Ösophaguskarzinom kann das Erkrankungsrisiko von einer Kombination aus genetischer Veranlagung und aus Umweltfaktoren abhängig sein. Zum Beispiel können Umweltfaktoren, die einen geringen Einfluss in der Gesamtpopulation haben, ein erhöhtes Risiko für Menschen mit einer bestimmten genetischen Veranlagung darstellen. Die unterschiedlichen Umweltfaktoren in der chinesischen und europäischen Bevölkerung und die unterschiedlichen Lebensgewohnheiten der zwei Bevölkerungsgruppen, beispielsweise die unterschiedliche Ernährung, könnten für die unterschiedliche Bedeutung der DNA-Polymorphismen in der Studie von Li und seinen Kollegen und in der hier vorliegenden Studie verantwortlich sein.

Die hier vorliegende Studie ist die erste Studie, die den Einfluss des DNA- Polymorphismus im ECRG1 auf der Entstehung des Ösophaguskarzinoms und auf die Prognose der Patienten mit Ösophaguskarzinom in einer europäischen Bevölkerung untersucht, so dass zurzeit keine vergleichbaren Ergebnisse vorhanden sind. Weitere Studien über die Rolle des ECRG1 im Ösophaguskarzinom sind wünschenswert.

6. Zusammenfassung

ECRG1 ist ein vor kurzem entdecktes Tumorsuppressorgen. Das ECRG1 hat einen Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation und des Zellzyklus. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des SNP 290Arg/Gln bei der Entstehung des Ösophaguskarzinoms und bei der Prognose der Krankheit in der europäischen Bevölkerung untersucht. 107 Patienten wurden in dieser Studie aufgenommen. Die DNA der Patienten wurde extrahiert und auf einen Polymorphismus im ECRG1 (290Arg/Arg, 290Arg/Gln, 290Gln/Gln) mit der Hilfe der PCR-Methode und der Gelelektrophorese untersucht. Der 290Arg/Arg Genotyp wurde bei 51 (47,7 %) Patienten, der 290Arg/Gln bei 49 (45,8 %) und der 290Gln/Gln Genotyp bei 7 (6,5 %) Patienten gefunden. Das Gesamtüberleben für Patienten mit 290Arg/Arg Genotyp betrug 17,0 Monate, für Patienten mit 290Arg/Gln Genotyp 30,8 Monate, für Patienten mit 290Gln/Gln Genotyp 39,9 Monate. In dieser Studie konnte man feststellen, dass der 290Arg/Arg Polymorphismus ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Ösophaguskarzinoms und ein signifikant unabhängiger prognostischer Faktor für das kürzere Überleben der Patienten ist. Der 290Arg/Arg Polymorphismus im ECRG1 ist mit einer schlechten Prognose nach kompletter operativer Resektion von Patienten mit Ösophaguskarzinom assoziiert. Außerdem gehen ein höheres Lebensalter, ein Nachweis von Lymphknotenmetastasen, ein fortgeschritteneres Tumorstadium und ein undifferenzierter Tumor mit einer schlechteren Prognose des Ösophaguskarzinoms einher. Im Gegensatz zu den Erkenntnissen der hier vorliegenden Studie haben die Erkenntnisse der Studie in der chinesischen Bevölkerung gezeigt, dass die Personen mit mindestens einem 290Gln ein höheres Risiko für die Entwicklung eines Ösophaguskarzinoms als die Personen mit dem homozygoten 290Arg/Arg Genotyp haben. Geht man davon aus, dass beide Studien zutreffend sind, so ist es wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Ergebnisse entweder auf der genetischen Varianz zwischen den untersuchten Bevölkerungsgruppen, auf den unterschiedlichen Umwelteinflüssen den diese Bevölkerungsgruppen ausgesetzt sind oder aber auf einer Kombination dieser Faktoren beruhen.

Die Bedeutung des DNA-Polymorphismus im ECRG1 in der Entwicklung und der Prognose des Ösophaguskarzinoms besonders in unterschiedlichen ethnischen Gruppen muss in der Zukunft weiter evaluiert werden. Weitere Prozesse sind für die Beurteilung des Potentials der Ergebnisse in dieser Studie und ihrer möglichen Bedeutung als ein neuer Startpunkt für die adjuvante oder neoadjuvante Therapie erforderlich.

7. Literaturverzeichnis

Adachi Y, Kitamura K, Tsutsui S, Ikeda Y, Matsuda H, Sugimachi K (1993) How to detect early carcinoma of the esophagus. Hepatogastroenterology. 40(3): 207-11.

Adam A, Ellul J, Watkinson A, Tan S. et al (1997) Palliation of inoperable esophageal carcinoma : a prospective randomized trial of laser therapy and stent placement. Radiology. 202: 344-8.

Anayama T, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S (1998) Positive correlation between p27Kip1 expression and progression of human esophageal squamous cell carcinoma, Int J Cancer. 79(4): 439-43.

Anderson LL, Lad TE (1982) Autopsy findings in squamous-cell carcinoma of the esophagus. Cancer. 50: 1587-90.

Arnott S.J, Duncan W, Kerr G.R, Walbaum P.R, Cameron E, Jack W.J, Mackillop W.J (1992) Low dose preoperative radiotherapy for carcinoma of the oesophagus: results of a randomized clinical trial. Radiother Oncol. 24(2): 108-13.

Arnott S.J, Duncan W, Gignoux M, Girling D.J, Hansen H.S, Launois B, Nygaard K, Parmar M.K, Rousell A, Spilipoulos G, Stewart L.A, Tierney J.F, Wang M, Rhugang Z (2000) Preoperative radiotherapy for esophageal carcinoma. Cochrane Database Syst Rev. 4: CD001799.

Aste H, Munizzi F, Martines H, Pugliese V (1985) Esophageal dilation in malignant dysphagia. Cancer. 56: 2713-8.

Bachmann MO, Alderson D, Edwards D, Wotton S, Bedford C, Peters TJ, Harvey IM (2002) Cohort study in South and West England of the influence of specialization on the management and outcome of patients with oesophageal and gastric cancers. Br J Surg. 89: 914-22.

Barbier P, Joss R, Scheurer U, Aeberhard P (1998) Das Ösophaguskarzinom heute. Teil 1 Schweiz Med Wschr. 112: 1026-32.

Barone J, Taioli E, Hebert J.R, Wynder E.L (1992) Vitamin supplement use and risk for oral and esophageal cancer. Nut Cancer. 18(1): 31-41.

Barr H, Krasner N, Raouf A, Walker RJ (1990) Prospective randomized trial of lasertherapy only and lasertherapy followed by endoscopic intubation for the palliation of malignant dysphagia. Gut. 31(3): 252–8.

Bartelsman J, Bruno M, Jensema A, Haringsma J, Reeders J, Tytgat G (2000) Palliation of patients with esophagogastric neoplasms by insertion of a covered expandable modified Gianturco-Z endoprosthesis: experiences in 153 Patients. Gastrointest Endosc. 51: 134-8.

Bender R, Lange S, Ziegler A (2002) Wichtige Signifikanztests. Deutsche Medizinische Wochenschrift. 127: T1–T3.

Benhidjeb T, Moesta KT, Schlag PM (2001) Staging and neoadjuvant therapy of squamous cell carcinoma of esophagus. The Umsch. 58(3): 165-73.

Blessmann M, Keifi JT, Schurr PG, Cihan A, Kalinin V, Trump F, Atac A, Heiland M, Pohlenz P, Blake F, Schmelzle R, Izbicki JR (2008) Short tandem repeat polyphormismus in exon 4 of esophageal cancer related gene 2 predicts relapse of oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 44(2):143-7.

Bosse JF, Gignoux M, Triboulet JP (1997) Chemoradiotherapy followed by surgery compared with surgery alone in squamous-cell cancer of the esophagus. N Engl. 337: 161-7.

Boyce HW (1993) Stents for palliation of dysphagia due to esophageal cancer. N Engl J Med. 329: 1345–6.

Brockmann JG, Nottberg H, Glodny B, Heinecke A, Senninger NJ (2000) CYFRA 21-1 serum analysis in patients with esophageal cancer. Clin Cancer Res. 6: 4249-52.

Bühling K.J, Lepenies J, Witt K (2004) Intensivkurs Allgemein und spezielle Pathologie. 248-9.

Canman C.E. et al. (1994) DNA damage responses: p53 induction, cell cycle perturbations, and apoptosis. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 59: 277–86.

Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM (1997) Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer, Nat Med. 3(2): 227-30.

Chung S, Leong H, Choi C, Leung J, Li W (1994) Palliation of malignant oesophageal obstruction by endoscopic alcohol injection. Endoscopy. 26: 275-7.

Coia LR (1993) Esophageal preservation: The management of esophageal cancer with concurrent radiation and chemotherapy. Endoscopy. 25: 664-9.

Cooper JS, Guo MD, Herskovic A, Macdonald JS, Martenson JA Jr, Al-Sarraf M, Byhardt R, Russell AH, Beitler JJ, Spencer S, Asbell SO, Graham MV, Leichman LL (1999) Chemoradiotherapy of locally advanced esophageal cancer. JAMA. 281: 1623-7.

Cui Y, Wang J, Zhang X, Lang R, Bi M, Guo L, Lu SH (2003) ECRG2, a novel candidate of tumor suppressor gene in the esophageal carcinoma, interacts directly with metallothionein 2A and links to apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 302(4): 904-15.

Cusumano A, Ruol A, Segalin A, Noberto L, Baessato M, Tiso E, Peracchia A (1992) Push-through intubation: Effective palliation in 409 patients with cancer of the esophagus and the cardia. Ann Thorac Surg. 53(6): 1010–4.

Diehl LF (1991) Radiation and chemotherapy in the treatment of esophageal cancer. Gastroenterol Clin North Am. 20: 765-74.

Donnellan R, Kleinschmidt I, Chetty R (2001) Cyclin E immunoexpression in breast ductal carcinoma: pathologic correlations and prognostic implications, Hum Pathol. 32(1): 89-94.

Durst J, Rohen J. eingriffe an der Speiseröhre (1996) chirurgische Operationsatlas in einem Band mit topographischer Anatomie; Schattauer. 2. Auflage, Stuttgart, New York.

Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer, Nature. 342-8.

Fok M, Sham J.S, Choy D, Cheng S.W,Wong J (1993) Postoperative radiotherapy for carcinoma of the esophagus: a prospective, randomizedcontrolled study. Surgery. 113(2): 138-47.

Függer R, Niederle B, Jantsch H, Schiessel R, Schulz F (1990) Endoscopic tube implantation for the palliation of malignant esophageal stenosis. Endoscopy. 22: 101-4.

Fukai Y, Fukuchi M, Masuda N, Osawa H, Kato H, Nakajima T, Kuwano H (2003) Reduced expression of transforming growth factor-beta receptors is an unfavorable prognostic factor in human esophageal sqamous cell carcinoma. Int J Cancer. 104(2): 161-6.

Fukunaga Y, Hirata S, Tanimura S, Okawa K, Higashino M, Inoue T, Kobayashi Y (2000) Superficial undifferentiated small cell carcinoma of the esophagus showing an interesting growing pattern in histology. Hepatogastroenterology. 47(32): 429-32.

Gignoux M, Roussel A, Paillot B, Gillet M, Schlag P, Favre J.P, Dalesio O, Buyse M, Duez N (1987) The value of preoperative radiotherapy in esophageal cancer: results of a study of the E.O.R.T.C. World J Surg. 11(4): 426-32.

Goldin E, Beyar M, Safra T, Globerman O, Gracium I, Wengrower D, Fich A (1994) A new self-expandable, nickel titanium coil stent for esophageal obstruction: A preliminary report. Gastrointest Endosc. 40(1): 64–8.

Hardwick RH, Barham CP, Ozua P, Newcomb PV, Savage P, Powell R, Rahamin J, Alderson D (1997) Immunohistochemical detection of p53 and c-erbB-2 in oesophageal carcinoma; no correlation with prognosis, Eur J Surg Oncol. 23(1): 30-5.

Harter KW (1992) Esophageal cancer: Management with radiation In: Ahlgren J, Macdonald J eds. Gastrointestinal oncology. JB Lippincott, Philadelphia: 123-34.

Hartwell L.H, Kastan M.B (1995) Cell cycle control and cancer. Science. 266 : 1821–8.

Heier SK, Rothman K, Heier LM, Rosenthal WS (1995) Photodynamic therapy for obstructing esophageal cancer: light dosimetry and randomized comparison with Nd:YAG laser therapy. Gastroenterology. 109(1): 63–72.

Herold G et al. (2006) Innere Medizin. 379-80.

Herskovic A, Martz K, al-Sarraf M, Leichman L, Brindle J, Vaitkevicius V,Cooper J, Byhardt R, Davis L,Emami B (1992) Combined chemotherapy and radiotherapy compared with radiotherapy alone in patients with cancer of the esophagus. N Engl J Med. 326(24): 1593-8.

Hollstein M. C, Metcalf R. A, Welsh J. A, Montesano R, Harris C. C (1990) Frequent mutation or the p53 gene in human esophageal cancer., Proc Natl Acad Sci USA. 87: 9958-61.

Hooper J.D, Nicol D.L, DickinsonJ.L, Eyre H.J, Scarman A.L, Noyle J.F, Stuttgen M.A, Douglas M.L, Lakoski Loveland K.A, Sutherland G.R, Antalis T.M (1999) Testisin, a new human serine proteinase expressed by premeiotic testicular germ cells and lost in testicular germ cell tumors. Cancer Res. 59: 3199–205.

Ikeda G, Isaji S, McClatchey A, Reminogton L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T (1999) P53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. Science. 86(8): 1386-405.

Izzo JG, Wu X, Ensor J, Pan J, Correa A, Swisher SG, Chao CK, Hittelman WN, Ajani JA (2007) Cyclin D1 guanine/adenine 870 Polyphormism with altered protein expression is associated with genomis instability and aggressive clinical biology of esophageal adenocarcinoma. J Clin Oncol. 25(6): 698-707.

Kaifi J.T, Rewnaq T, Schurr P.G, Yekebas E.F, Kalinin V, Sauter S, Strate T, Izbicki J.R (2007) Short tandem repeat polyphormism in exon 4 of esophageal cancer related gene 2 (ECRG2) detected in genomic DNA is a prognostic marker for esophageal cancr. American Journal of Surgery. 194(3):380-4.

Kannan K, Kaminski N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Amariglio N, Givol D (2001) DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1, Oncogene. 20(26): 3449-55.

Katlik MR, Wilkins EW, Grillo HC (1990) Three decades of treatment of esophageal squamous carcinoma at the Massachusetts General Hospital. J Thorac Cardiovasc Surg. 99: 929–38.

Kato H, Tachimori Y, Watanabe H, Yamaguchi H, Ishikawa T, Itabashi M (1990) Superficial esophageal carcinoma. Surgical treatment and the results. Cancer. 66(11): 2319-23.

Kawaguchi H., Ohno S, Miyazaki M. et al. (2000) CYFRA 21-1 determination in patients with esophageal squamous cell carcinoma: clinical utility for detection of reccences. Cancer. 89: 1413-7.

Kim YH, Ajani JA, Ota DM, Lynch P, Roth JA (1995) Value of serial CEA levels in Patients with resectable adenocarcinoma of the esophagus and stomach. Cancer. 75: 451-6.

Kinsman K, DeGregorio B, Katon R, Morrison K, Saxon R, Keller F, Rösch J (1993) Prior radiation and chemotherapy increase the risk of life-threatening complications after insertion of metallic stents for esophagogastric malignancy. Gastrointest Endosc. 43: 196-203.

Knyrim K. Wagner H, Bethge N, Keymling M, Vakil N (1993) A controlled trial of an expansile metal stent for palliation of esophageal obstruction due to inoperable cancer. N Engl J Med. 329: 1302-7.

Kozarek RA, Ball TJ, Patterson DJ (1992) Metallic self-expanding stent application in the upper gastrointestinal tract: Caveats and concerns. Gastrointest Endosc. 38: 1–6.

Kulke MH, Odze RD, Mueller JD, Wang H, Redston M, Bertagnolli MM (2005) Prognostic signisficance of vascular endothelial growth factor and cycloxygenase 2 expression following neoadjuvant radiochemotherapy is associated with minor histopathologic response and poor prognosis in esophageal cancer. Clin Cancer Res. 11(23): 8341-7.

Kuo KT, Chow KC, Wu YC, Lin CS, Wang HW, Li WY, Wang LS (2003) Clinicopathologic significance of COX 2 overexpression in esophageal squamous cell carcinoma. Ann Thorac Surg. 76(3): 909-14.

Lam KY, Tsao SW, Zhang D, Law S, He D, Ma L, Wong J (1997) Prevalence and predictive value of p53 mutation in patients with oesophageal squamous cell carcinomas: a prospective clinico-pathological study and survival analysis of 70 patients, Int J Cancer. 74(2): 212-9.

Lambert R (1990) Cancer in the esophagus. Principles of laser treatment. In: Jensen DM, Bruntaud JM eds. Medical laser endoscopy, Dordrecht: Kluwer. 163–76.

Lambert R, Lightdale CJ, Magnegold BC (1993) Endoscopic management of upper gastrointestinal cancer. Gastroenterol Int. 4: 212–20.

Lambert R (1994) Palliation of Carcinoma of the Esophagus: Is there a hope for cure? Am J of Gastroent. 89(8): 27-40.

Lambert R (2001) Treatment of esophagogastric tumors. Endoscopy. 32(4): 322-30.

Launois B, Delarue D, Campion J.P, Kerbaol M (1981) Preoperative radiotherapy for carcinoma of the esophagus. Surg Gynecol Obstet. 153(5): 690-2.

Lewin B (1997) Molekularbiologie der Gene Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin. 101-7.

Li Y, Zhang X, Huang G, Miao X, Guo L, Lin D, Lu SH (2006) Identification of a novel polymorphism Arg290Gln of esophageal cancer related gene 1 (ECRG1) and its related risk to esophageal squamous cell carcinoma. Carcinogenesis. 27(4): 798-802.

Liu H, Su S, Wang Y, Lu S.H (1999) Cloning of new related to human esophageal carcinoma and its expression in the human esophageal carcinoma. Proc Am Assoc Cancer Res. 40: 239.

Lu S.H, Ling-Ling Hsieh L.L, Luo F.C, Weinstein I.B (1998) Amplification of the EGF receptor and C-myc genes in human esophageal cancer. Int. J. Cancer. 42: 502.

Lu SH (2000) Alterations of oncogenes and tumor suppressor genes in esophageal cancer in China. Mutat. Res. 462: 343–53.

Malthaner R.A, Wong R.K, Rumble R.B, Zuraw L (2004) Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. BMC Med. 2(1): 35.

Marsh T. L (1999) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. Curr Opin Microbiol. 2: 323-7.

Mathew R, Arora S, Khanna R, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R (2002) Alterations in p53 and pRb pathways and their prognostic significance in oesophageal cancer, Eur J Cancer. 38(6): 832-41.

Mayer M, Strosche H, Schlenkhoff D (1986) Endoskopische Implantation von Überbrückungstuben beim inoperablen Ösophagus- bzw. Kardiamalignom als palliative Maßnahmen der ersten Wahl. Med Welt. 37: 534–6.

Mayoral W, Fleischer DE (1999) The Esophacoil stent for malignant esophageal obstruction. Gastrointest Endosc Clin N Am. 9(3): 423–30.

Meyenberger C, Fantin AC. Esophageal carcinoma (2000) current staging strategies. Recent Results Cancer Res. 155: 63-72.

Meyer H.-J, Buhr H.J, Wilke H (2004) Management des Magen und Ösophaguskarzinom. Präoperative Chemo- und Strahlentherapie beim Ösophaguskarzinom. 346-51.

Moghissi K (1992) Surgical resection for stage 1 cancer of the oesophagus and cardia. Br J Surg. 79: 935-7.

Montesano R. et al (1996) Genetic alterations in esophageal cancer and theirrelevance to etiology and pathogenesis: a review. Int. J. Cancer. 69: 225–35.

Nabeya K, Hanaoka T, Li S, Nyumura T (1993) What is the ideal treatment for early esophageal cancer. Endoscopy. 25(9): 670-1.

Nakano S, Baba M, Natsugoe S, Kusano C, Shimada M, Fukomoto T (2001) The role of neoadjuvant radiochemotherapy using low-dose fraction cisplatin and 5-fluoruracil inpatients with carcinoma of the esophagus. Jpn J Thorax Cardiovasc Surg. 49(1): 11-6.

Netzel-Arnett S, Hooper J.D, Szabo R, Madison E.L, Quigley J.P, Bugge T.H, Antalis T.M (2003) Membrane anchored serine proteases: A rapid expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. Cancer Metastasis Rev. 22: 237–58.

Neuhaus H (1993) Therapeutic endoscopy in the esophagus. Current opinion. Gastroentero. l9: 677–84.

Nianxi Zhao, Ge Huang, Liping Guo, Shih-Hsin Lu (2006) ECRG1, a novel candidate of tumor suppressor gene in the esophageal carcinoma, triggers a senescent program in NIH3T3 cells. Experimental Biology and Medicine. 231: 84-90.

Nygaard K, Hagen S, Hansen H.S, Hatlevoll R, Hultborn R, Jakobsen A, Mantyla M, Modig H, Munck-Wikland E, Rosengren B (1992) Preoperativeradiotherapy prolongs survival in operable esophageal carcinoma: arandomized, multicenter study of pre-operative radiotherapy andchemotherapy. The second Scandinavian trial in esophageal cancer. World J Surg. 16(6): 1104-9.

Ohashi Y, Sasano H, Yamaki H, Shizawa S, Shineha R, Akaishi T, Satomi S, Nagura H (1999) Cell cycle inhibitory protein p27 in esophageal squamous cell carcinoma, Anticancer Res. 19(3A): 1843-8.

Oka M, Hazam S, Takahashi M. et al. (1999) Relationship between serum levels of soluble interleukin-2 receptor and various disease parameters in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. Hepatogastroenterology. 46: 2249-54.

Oliver SE, Robertson CS, Logan RF, Sokal M, Pearson JC, Atkinson M (1990) What does radiotherapy add to survival over endoscopic intubation alone in inoperable squamous cell oesophageal cancer? GUT. 31(7): 750-2.

Parker CH, Peura DA (1991) Palliative treatment of esophageal carcinoma using esophageal dilation and prosthesis. Gastroenterol Clin North Am. 20: 717–29.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1993) Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. Int J Cancer. 54(4): 594-606.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB (1997) Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publication. 143.

Parsons B. L, Heflich R. H (1997) Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations. Mutat Res. 387: 97-121.

Patel D. D, Bhatavdekar J. M, Chikhlikar P. R, Patel Y. V, Shah N. G, Ghosh N, Suthar T. P, Balar D. B (1997) Clinical significance of p53, nm23, and Bcl-2 in T3-4N1M0 oesophageal carcinoma: an immunohistochemical approach, J Surg Oncol. 65(2): 111-6.

Pokieser P, Memarsadeghi M, Danzer M, Prokesch R, Partik B, Wenzl E (1999) Staging of carcinomas of the upper gastrointestinal tract. The current status of diagnostic imaging. Radiologie. 39(7): 555-61.

Pomp J, Davelaar J, Blom J, van Krimpen C, Zwinderman A, Quint W, Immerzeel J (1998) Radiotherapy for oesophagus carcinoma: the impact of p53 on treatment outcome, Radiother Oncol. 46(2): 179-84.

Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM (1997) Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients, Nat Med. 3(2): 222-5.

Raijman I, Siddique I, Lynch P (1997) Does Chemoradiation therapy increase the incidence of complications with self-expanding coated stents in the management of malignant esophageal strictures? Am J Gastroenterol. 92: 2192-6.

Rawlings N.D, Barrett A.J (1994) Families of serine peptidases. Methods Enzymol. 244: 19-61.

Reed A. L, Califano J, Cairns P, Westra W. H, Jones R. M, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D (1996) High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma, Cancer Res. 16: 3630.

Ribeiro U. Jr, Finkelstein S. D, Safatle Ribeiro Av, Landreneau R. J, Clarke M. R, Bakker A, Swalsky P. A, Gooding W. E, Posner M. C (1998) p53 sequence analysis predicts treatment response and outcome of patients with esophageal carcinoma, Cancer. 83(1): 7-18.

Rice TW (2000) Clinical staging of esophageal carcinoma . CT, EUS, and PET. Chest Surg Clin N Am. 10(3): 471-85.

Sakurai K, Hata S, Amano S, Kimura T, Hori A, Sakamoto A, Kimizuka K, Mimatsu K, Nishio S, Miyake H, Shibata M, Fukuzawa M (1998) Immunohistochemical study of p53, p27 and PCNA expression in esophageal cancer, Gan To Kagaku Ryoho. 25(9): 1269-72.

Sander R, Hagenmueller F, Sander C, Riess G, Classen M (1991) Laser versus laser plus afterloading with iridium 192 in the palliative treatment of malignant stenosis of the esophagus. A prospective, randomized and controlled study. Gastrointest Endosc. 37(4): 433-40.

Sarbia M, Porschen R, Borchard F, Horstmann O, Willers R, Gabbert H. E (1994) p53 protein expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus, Cancer. 74(8): 2218-23.

Sargeant IR, Loizou LA, Tobias JS, Blackman G, Thorpe S, Bown SG (1992) Radiation enhancement of laser palliation for malignant dysphagia. A pilot study. 33(12): 1597-601.

Schmassmann A (1999) Esophageal carcinoma: accurate staging thanks to modern diagnostic methods open up new therapeutic strategies: Schweiz Med Wochenschr. 129(34): 1297-310.

Scott KL, Alan RC (1997) Apoptosis and carcinogenesis. British Medical Bulletin. 53 :554-69.

Shamma A, Doki Y, Tsujinaka T, Shiozaki H, Inoue M, Yano M, Kawanishi K, Monden M (2000) Loss of p27(KIP1) expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma, Oncology. 58(2): 152-8.

Shapiro G. I, Edwards C. D, Ewen M. E, Rollins B. J (1998) p16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage, Mol Cell Biol. 18(1): 378-87.

Shimada H, Takeda A, Nabeya Y et al. (2001) Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer. 92: 663-9.

Shimoyama S, Konishi T, Kawahara M, Aoki F, Harada N, Shimizu S, Murakami T, Kaminishi M (1998) Expression and alteration of p53 and p21(waf1/cip1*)* influence the sensitivity of chemoradiation therapy for esophageal cancer, Hepato Gastroenterology. 45(23): 1497-504.

Shinozaki H, Ozawa S, Ando N, Tsuruta H, Terada M, Ueda M, Kitajima M (1996) Cyclin D1 amplification as a new predictive classification for squamous cell carcinoma of the esophagus, adding gene information, Clin Cancer Res. 7: 1155-61.

Shiokawa M, Masutani M, Fujihara H, Ueki K, Nishikawa R, Sugimura T, Kubo H, Nakagama H. (2005) Genetic alteration of Poly (ADP-ribose) polymerase- 1 in human germ cell tumors. Jpn J Clin Oncol. 35(2): 97-102.

Spinelli P, Cerrai FG, DalFante M, Mancini A, Meroni E, Pizzetti P (1993) Endoscopic treatment of upper gastrointestinal tract malignancies. Endoscopy. 25(9): 675–8.

Stahl M, Wilke H, Meyer HJ (1994) 5-fluorouracil, folinic acid, etoposide, and cisplatin chemotherapy for locally advanced or metastatic karzinoma of the esophagus. Eur J Cancer. 30A: 325-8.

Stahl M, Wilke H, Fink U (1996) Combined preoperative chemotherapy and radiotherapy in patients with locally advanced esophageal cancer: Interim analysis of a phase 2 trial. J Clin Oncol. 14: 829-37.

Stahl M, Vanhoefer U, Stuschke M (1998) Preoperative sequential chemo- and radiochemotherapy in locally advanced carcinomas of the lower oesophagus and gastrooesophageal junction: Eur J Cancer. 34: 668-73.

Su T, Liu H, Lu S.-H (1998) Cloning and identification of cDNA fragments related to human esophageal cancer. Chin J Oncol. 20: 254-7.

Sugimachi K, Matsuoka H, Ohno S, Mori M, Kuwano H (1988) Multivariate approach for assessing the prognosis of clinical oesophageal carcinoma. Br J Surg. 75(11): 1115-8.

Sugimachi K, Ikebe M, Kitamura K, Toh Y, Matsuda H, Kuwano H (1993) Long term results of esophagectomy for early esophageal carcinoma. Hepatogastroenterology. 40(3): 203-6.

Takemoto T, Ito T, Aibe T, Okita K (1986) Endoscopic Ultrasonography in the Diagnosis of Esophageal Carcinoma, with particular Regard to Staging it for Operability. Endoscopy. 18: 22-5.

Takeuchi H, Ozawa S, Ando N, Shih CH, Koyanagi K, Ueda M, Kitajima M (1997) Altered p16/MTS1/CDKN2 and cyclin D1/PRAD-1 gene expression is associated with the prognosis of squamous cell carcinoma of the esophagus. Clin Cancer Res. 12: 2229-36.

Teniere P, Hay J.M, Fingerhut A, Fagniez P.L (1991) Postoperative radiationtherapy does not increase survival after curative resection for squamous cell carcinoma of the middle and lower esophagus as shown by a multicenter controlled trial. French University Association for Surgical Research. Surg Gynecol Obstet. 173(2): 123-30.

Toyoda H, NakamuraT, Shinoda M, Suzuki T, Hatooka S, Kobayashi S, Ohashi K, Seto M, Shiku H, Nakamura S (2000) Cyclin D1 expression is useful as a prognostic indicator for advanced esophageal carcinomas, but not for superficial tumors. Dig Dis Sci. 45(5): 864-9.

Tytgat GN (1994) Endoscopic therapy of esophageal cancer: possibilities and limitations. Endoscopy. 22: 263–7.

Urba SG, Orringer MB, Turrisi A (2001) Randomized trial of preoperative chemoradiation vs. Surgery alone in patients with locoragional esophageal carcinonma. J Clin Oncol. 19: 305-13.

Walsh T-N, Noonan N, Hollywood D, Kelly A, Keeling N,Hennessy T.P (1996) A cmparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. N Engl J Med. 335(7): 462-7.

Wang M, Gu X.Z, Yin W.B, Huang G.J, Wang L.J, Zhang D.W (1989) Randomized clinical trial on the combination of preoperative irradiation and surgery in the treatment of esophageal carcinoma: report on 206 patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 16(2): 325-7.

Wang Y, Tang H, Lu S.-H (1998) The effect of the protein encoded ECRG1 on tumor cell proliferation. Chin J Oncol. 6: 229-30.

Wang Y, Tang H, Lu S (2000) Expression in E.coli of protein encoded by human esophageal cancer related gene-1. Chin. J. Oncol. 22: 198-200.

Wang Y, Wang J, Liu H, Tang H, Guo L, Lu S-H (2008) ECRG1, a novel esophageal gene, cloned and identified from human esophagus and its inhibition effect on tumors. Carcinogenesis. 29(1): 157-60.

Weiser HF, Lange R (1986) Feussner H. How can we diagnose the early stage of esophageal cancer? Endoscopy. 18: 2-10.

Weitensfelder W, Redtenbacher M, Haiderer O, Weitensfelder B. (1985) Prognostisch ungünstige Faktoren beim Ösophaguscarcinom. III. Operative Therapie des Oesophaguscarcinoms –Einfluss präoperativer Maßnahmen auf die Prognose bei kurativer Resektion. Chirurg. 56: 161-5.

Wong R, Malthaner R (2000) Esophageal cancer: a systematic review. Curr Probl Cancer. 24(6): 297-373.

Wu WC, Katon RM, Saxon RR, Barton RE, Uchida BT, Keller FS, Rosch J (1994) Silicone covered self-expanding metallic stents for the palliation of malignant esophageal obstruction esophagorespiratory fistula: Experience in 32 patients and a review of the literature. Gastrointest Endosc. 40(1): 22–33.

Wyllie AH, Bellamy CO, Bubb VJ, Clarke AR, Corbet S, Curtis L, Harrison DJ, Hooper ML, Toft N, Webb S, Bird CC (1999) Apoptosis and carcinogenesis. Br J Cancer. 80: 34-7.

Xi H, Baldus SE, Warenecke-Eberz U, Brabender J, Neiss S, Metzger R, Ling FC, Dienes HP, Bollschweiler E, Moening S, Mueller RP, Hoelscher AH (2005) High cyclooxgenase 2 expression folloeing neoadjuvant rediochemotherapy is assoziated with minor histopathologis response and poor prognosis in esophageal cancer. Clin Cancer Res. 11(23): 8341-7.

Xiangming C, Natsugoe S, Takao S, Hokita S, Tanabe G, Baba M, Kuroshima K, Aikou T. (2000) The cooperative role of p27 with cyclin E in the prognosis of advanced gastric carcinoma, Cancer. 89(6):1214-9.

Xiao Z.F, Yang Z.Y, Liang J, Miao Y.J, Wang M, Yin W.B, Gu X.Z, Zhang de C, ZhangR.G, Wang L.J (2003) Value of radiotherapy after radical surgery for esophageal carcinoma: a report of 495 patients. Ann Thorac Surg. 75(2): 331-6.

Yamamoto K, Oka M, Hayashi H. et al. (1997) CYFRA 21-1 is a useful marker for esophageal squamous cell carcinoma. Cancer. 79: 1647-55.

Yang L, Parkin DM, Li L, Chen Y (2003) Time trends in cancer mortality in China: 1987-1999 Int J Cancer. 106(5): 771-83.

Yasunaga M, Tabira Y, Kondo K, Okuma T, Kitamura N (1999) The prognostic significance of cell cycle markers in esophageal cancer after neoadjuvant chemotherapy, Dis Esophagus. 12(2): 120-7.

Yue CM, Bi Mx, Tan W, Deng DJ, Zhang XY, Guo LP, Lin Dx, Lu Sh (2004) Short tandem repeat polyphormism is a novel esophageal cancer related gene (ECRG2) implicates suspectibility to esophageal cancer in Chinese population. Int J Cancer. 108 (2): 232-6.

Zieren H.U, Muller J.M, Jacobi C.A, Pichlmaier H, Muller R.P, Staar S (1995) Adjuvant postoperative radiation therapy after curative resection of squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus: a prospective randomized study. World J Surg. 19(3): 444-9.

Zhao N, Wang J, Cui Y, Guo L, Lu SH (2004) Induction of G1 cell cycle arrest and P15INK4b expression by ECRG1 through interaction with Miz-1. J Cell Biochem. 92(1): 65-76.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit. Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Tim Strate möchte ich recht herzlich für die Überlassung des Themas bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Viacheslav Kalinin, Herrn PD Dr. med. Jussuf Kaifi und Herrn Dr. med. Kai Bachmann für die freundliche, engagierte Betreuung und die vielen gute Ratschläge bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern aus dem Labor der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf für die freundliche Einarbeitung und für ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern und bei meinem Freund Christian Zimmermann für ihre Unterstützung während meines Studiums sowie bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE INFORMATION

- Name, Vorname: Shahmiri, Shanly
- Geburtsdatum: 21.03.1984
- Geburtsort: Teheran, Iran
- Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG

Oktober 2009: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

August 2005: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2002 – 2003 Studienkolleg für ausländische Studierende an der Universität Hamburg

- Allgemeine Hochschulreife, Deutsches Abitur

1997 – 2001 Shahid Beheschti Gymnasium, Teheran, Iran

- Iranisches Abitur

1994 – 1997 Omidwar Mittelschule, Teheran, Iran

1990 – 1994 Esmat Grundschule, Teheran, Iran

TÄTIGKEITEN

Ab 01.2010 wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf

2008 Albertin Krankenhaus, Hamburg
Studentische Hilfskraft im Fachbereich Geriatrie zur Erstellung eines studentischen Taschenskriptes

2008 Medical Prevention Center, Hamburg
Aushilfe als Arzthelferin

2008 Praxis Frau Dr. Groth, Erdkampsweg 49, 22335 Hamburg
Patientenbetreuung im Rahmen einer klinischen Studie von Novartis

2007/2008 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg
Tutorin im Kurs der makroskopischen Anatomie

2007 Asklepios Klinik Wandsbek, Hamburg
Zweite Assistentin in der Allgemeinchirurgie

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....