# Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. G. Sauter

# Prävalenz von CCND1-Alterationen bei menschlichen Ösophaguskarzinomen

#### Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin Der Medizinischer Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Maria Christina Tsourlakis aus Athen, Griechenland

Hamburg, 2010

Angenommen von der medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 12.11.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/ die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/ in: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/ in: Prof. Dr. E. Yekebas

Für meine Eltern, meine Oma, meinen Bruder und meinen Christos

# Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1. Das Ösophaguskarzinom	6
1.2. Epidemiologie	6
1.3. Ätiologie/ Risikofaktoren	8
1.4. Klinik 1.4.1. Symptome	<b>9</b> 9
<ul><li>1.5. Diagnose/Staging</li><li>1.5.1. Stadieneinteilung</li></ul>	<b>10</b> 10
1.6. Prognosefaktoren	11
<ul> <li>1.7. Therapie</li> <li>1.7.1. Behandlung eines limitierten Stadiums (Tis-T2 N0-1 M0)</li> <li>1.7.2. Behandlung eines fortgeschrittenen Stadiums (T3-T4 N0-1 M0 oder T1-4 N0-1 M1)</li> <li>1.7.3. Neoadjuvante Therapie</li> <li>1.7.4. Palliative Therapie</li> </ul>	13 13 14 14 15
1.8. Molekulare Grundlagen des Ösophaguskarzinoms	16
1.9. Die Funktion von Cyclin D1	20
1.10. Genetische Alterationen des CCND1 Gens	21
1.11. CCND1 am Ösophaguskarzinom	22
1.12. CCND1 als mögliches Therapielziel Cyclin- abhängiger Kinasen	25
1.13. Ziel der Arbeit	28
2. MATERIAL UND METHODEN	29
2.1. Patientenkollektiv	29
2.2. Kontrollgewebe	29
<ul><li>2.3. TMA- Herstellung</li><li>2.3.1. Array-Stanzgerät</li></ul>	<b>30</b> 32
<ul><li>2.4. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)</li><li>2.4.1. FISH-Protokoll Pathologie Hamburg</li><li>2.4.2. FISH-Auswertung</li></ul>	<b>33</b> 33 34
2.5. Immunhistologie (IHC)	34

2	2.5.1. IHC- Auswertung	35
2.6.	. Statistik	36
3.	ERGEBNISSE	37
	Klinische Daten	37
3	<b>1.1.1.</b> Technische Aspekte der CCND1 FISH- und immunhistochemischen Untersuchung	39
3.2.	CCND1 in Primärtumoren	40
3.3.	. CCND1 in Metastasen	51
4.	DISKUSSION	55
5.	ZUSAMMENFASSUNG	61
6.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	62
7.	LITERATUR	63
8.	DANKSAGUNG	74
9.	ERKLÄRUNG	75

# 1. Einleitung

# 1.1. Das Ösophaguskarzinom

Das Ösophaguskarzinom als eine sehr aggressive Neoplasie hat trotz der Fortschritte in der chirurgischen Therapie und Einsatz multimodaler Therapiekonzepte, eine schlechte Prognose (Geh et al. 2002). Als Therapie der Wahl wird bei einem lokal begrenzten Tumor die Operation mit eventuell anschließender Radio- oder Radiochemotherapie angesehen (Stahl et Oliveira 2008). Obwohl sich die Überlebensraten in den letzten Jahrzehnten gebessert haben, liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate immer noch nur bei 14%. Die Ursachen dafür sind vielfältig. Einerseits befinden sich 50% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Stadium (z.B. inoperabler Tumor, Lymphknoten- oder Fernmetastasen); andererseits geht eine ausgedehnte Ösophagektomie bzw. Radiochemotherapie, bei noch operablen Patienten, mit einem hohen Risiko einher und schließlich ist auch das Überleben bei nicht operablen Patienten trotz palliativer Chemotherapie nur sehr kurz (Tew et al. 2005).

# **1.2.** Epidemiologie

Die Inzidenz des Ösophaguskarzinoms lag 2001 weltweit bei 462.102 (Männer: 315.376; Frauen: 146.726), 385.877 Menschen starben daran (Männer: 261.149; Frauen: 124.728; Tabelle 1). Dies machte das Ösophaguskarzinom zum achthäufigsten Tumor und zum sechsthäufigsten zum Tode führenden Tumor. Die Inzidenz steigt mit höherem Alter. Dies ist jedoch bei beiden Geschlechtern zu beobachten. Menschen aus weniger entwickelten Ländern sind häufiger betroffen. In Asien ist das Ösophaguskarzinom viel häufiger als in jedem anderem Kontinent (Kamangar et al. 2006).

Tabelle 1. Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms weltweit (Kamangar et al. 2006)

	Männer				Frauen					
	Inzide	nzidenz Mortalität			Inzidenz		Mortalität			
	Anzahl	Rate	Anzahl	Rate	MR:IR	Anzahl	Rate	Anzahl	Rate	MR:IR
Weltweit	315.376	11.5	261.149	9.6	0.83	146.726	4.7	124.728	3.9	0.83
Industrieländer	57.889	6.8	50.295	5.8	0.85	15.986	1.3	14.827	1.2	0.92
Entwicklungsländer	256.217	13.7	209.851	11.4	0.83	130.215	6.5	109.478	5.4	0.83
Kontinent				I.		•	l		l	
Nord-Amerika	12.111	5.8	10.778	5.1	0.88	3.625	1.3	3.330	1.2	0.92
Australien	905	5.5	801	4.8	0.87	465	2.3	370	1.8	0.78
Europe	33.070	6.5	29.659	5.7	0.88	9.970	1.3	9.474	1.2	0.92
Zentral- Süd Amerika	10.479	5.9	9.631	5.4	0.92	3.748	1.8	3.516	1.7	0.94
Asien	241.301	15.3	193.465	12.4	0.81	120.443	7.1	99.908	5.9	0.83
Afrika	16.289	7.8	15.659	7.5	0.96	8.058	3.4	7.743	3.2	0.94

**Tabelle 1.** Die Raten sind entsprechend dem Durchschnittsalter der Weltbevölkerung standardisiert (100.000 Personenjahre).

MR:IR=Mortalitätsrate:Inzidenzrate (kann zum Teil >1 liegen aufgrund unterschiedlicher Quellenangaben).

Das Ösophaguskarzinom ist ein signifikantes und immer wichtiger werdendes Gesundheitsproblem. Im Jahre 2005 gab es weltweit 497.700 Neuerkrankungen (Lambert et Hainaut 2007). Histologisch werden im Wesentlichen zwei Tumortypen unterschieden: das Plattenepithel- und das Adenokarzinom. Ersteres war viele Jahre lang der häufigste Tumortyp. In den Vereinigten Staaten und in anderen westlichen Ländern hat sich dies in den letzten Jahren geändert. Während die relative Rate anderer häufiger vorkommender Malignome, wie z.B. des Mamma-, Kolon- oder Bronchialkarzinoms von 1975 bis 2000 gesunken oder gleich geblieben ist, werden Prostatakarzinome, Melanome und Adenokarzinome des Ösophagus immer häufiger. Das Adenokarzinom, als eine Erkrankung, die bis in die 50er Jahre nicht zu existieren schien, ist in den Vereinigten Staaten und manchen anderen westlichen Ländern zu dem Malignom mit den stärksten Zuwachsraten geworden. Im Jahre 2008 wurden in den Vereinigten Staaten 16.470 Neuerkrankungen an einem Ösophaguskarzinom vermutet, von denen mehr als 50% Adenokarzinome sein sollten (Demeester et al. 2009).

Das Ösophaguskarzinom zeigt epidemiologisch auch Unterschiede zwischen den Völkern. Wie schon oben erwähnt sind Adenokarzinome des Ösophagus in den Vereinigten Staaten und in anderen westlichen Ländern viel häufiger geworden. Kaukasier sind interessanterweise häufiger von einem Adenokarzinom betroffen, während Schwarze häufiger von einem Plattenepithelkarzinom betroffen sind. Asiaten, die wiederum in Asien leben sind häufiger von einem Ösophaguskarzinom betroffen als Asiaten, die in den Vereinigten Staaten leben. Um die Unterschiede in der Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms zwischen den Geschlechtern, Völkern und Ländern richtig erklären zu können, reicht es demnach nicht aus allein die Exposition gegenüber Risikofaktoren (z.B. Rauchen oder Alkohol) zu beurteilen. Auch die Expositionsdosis (z.B. passives Rauchen, Alkoholkonsum u.ä.) und die Variationen hinsichtlich Metabolismus könnten dabei eine Rolle spielen (Cook et al. 2009).

# 1.3. Ätiologie/ Risikofaktoren

Wie schon vorher erwähnt werden histologisch im Wesentlichen zwei Tumortypen unterschieden, Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome, mit zum Teil auch unterschiedlichen Risikofaktoren. Rauchen und Alkohol scheinen das Risiko für beide Tumortypen zu erhöhen, sind aber offenbar wichtiger bei Plattenepithelkarzinomen, da sich dadurch sonst nicht der enorme Zuwachs an Adenokarzinomen in den letzten Jahren begründen lasssen würde (Ahsan et al. 1997, Blot et al. 1994, Ghadirian et al. 1988, Macfarlane et al. 1996, Ziegler et al. 1986). Ob der Genuss von heißen Getränken und Nahrung einen Risikofaktor darstellt, wird kontrovers diskutiert (Castellsague et al. 2000, Onuk et al. 2002, Terry et al. 2001).

Über die Wichtigkeit von HPV-Infektionen als Risikofaktor bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus wird diskutiert. In Wirklichkeit ist es aber sehr schwer genaue Aussagen über die Assoziation von HPV-Infektionen und Ösophaguskarzinomen zu treffen, da der Nachweis von HPV bei Patienten mit einem Ösophaguskarzinom in unterschiedlichen geographischen Arealen stark divergiert (Syrjanen et al. 2002).

Die beschriebenen Unterschiede zwischen verschieden Völkern und Ländern könnten an einen genetischen Faktor denken lassen, der in der Entwicklung des Ösophaguskarzinoms eine Rolle spielen könnte. Jedoch ist, bis auf das gehäufte

Auftreten von Ösophaguskarzinomen bei Patienten mit familiärer Tylosis, noch kein genetischer Faktor gefunden worden, der dies belegen könnte (Ghadirian et al. 1988). Der gastroösophageale Reflux, eine Erkrankung, die in den westlichen Ländern immer häufiger auftritt führt über eine Barrett-Metaplasie und -Dysplasie zu einem Adenokarzinom. Demzufolge sind auch Medikamente, die den unteren Ösophagussphinkter relaxieren, wie z.B. Nitroglycerin, Anticholinergika, Benzodiazepine und andere, aber auch z.B. Hiatushernien, die Achalasie oder einen gastroösophagealen Reflux Sklerodermie, die begünstigen, Risikofaktoren für ein Adenokarzinom (Chen et Yang 2001, Kruse et al. 1993, Lagergren et al. 2000).

#### **1.4.** Klinik

#### **1.4.1.** *Symptome*

Ösophaguskarzinome werden bei vielen Patienten erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt. Dies liegt offenbar daran, dass Symptome, wie z.B. die Dysphagie, meist erst dann auftreten, wenn 2/3 des Lumens des Ösophagus verlegt sind. Sobald die Dysphagie als Symptom präsent ist, gibt es keine Beziehung zwischen Dauer der Symptome und Überleben. Das Auftreten von Symptomen scheint den lokal fortgeschrittenen Befund zu reflektieren. Dysphagie und Gewichtsverlust sind häufiger bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zu finden (93% und 68%) als bei Patienten mit einem Adenokarzinom (79% und 53%). Patienten, die nicht über Gewichtsverlust klagen, zeigen weniger Metastasen.

Patienten mit einem Adenokarzinom klagen oft über gastroösophagealen Reflux. Patienten mit einem gastroösophagealen Reflux wiederum ohne Zeichen einer Dysphagie haben eine bessere Prognose als Patienten, die beide Symptome angeben.

Weitere Symptome, die in der Literatur bei Patienten mit einem Ösophaguskarzinom schon beschrieben worden sind, sind abdominelle Schmerzen, Thoraxschmerzen, gastrointestinale Blutungen, Übelkeit und Erbrechen, Sättigungsgefühl, Hämoptysen, Rückenschmerzen u.a. (Gibbs et al. 2007).

# 1.5. Diagnose/Staging

Die Diagnose eines Ösophaguskarzinoms muss histologisch gesichert werden. Dabei sind Plattenepithelkarzinome häufiger im mittleren Drittel des Ösophagus zu finden im Gegensatz zu Adenokarzinomen, die gehäuft im distalen Drittel auftreten. Das weitere Staging sollte eine klinische Untersuchung, Leber- und Nierenwertekontrolle, eine Endoskopie und ein CT des Thorax und Abdomens beinhalten. Bei Patienten, die für eine Operation in Frage kommen sollte zusätzlich eine Endosonographie und wenn möglich ein PET-CT erfolgen um Lymphknoten- oder Fernmetastasen beurteilen zu können (Stahl et Oliveira et al. 2008).

Die Tatsache der intramuralen Tumorsausbreitung mit dem Setzen kleiner Mikrometastasen in meist weiter proximal gelegenen Abschnitten des Ösophagus macht es jedoch schwierig genaue Aussagen über die tatsächliche Tumorausbreitung zu treffen.

#### **1.5.1.** Stadieneinteilung

Die Einteilung der Ösophaguskarzinome erfolgt einerseits nach den anatomischen Gegebenheiten: cervikale, intrathorakale und Karzinome des gastroösophagealen Übergangs und andererseits nach der TNM-Klassifikation der UICC (International Union Against Cancer). Bei der TNM-Klassifikation gibt es eine klinische (cTNM) und eine pathologische (pTNM) Stadieneinteilung (Tabelle 2; nach 7. Auflage TNM, 2009). Die klinische Einteilung ist wichtig um die richtige Therapie zu wählen und zu evaluieren

#### Primärtumor (T-Stadium)

- TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T0 Kein Nachweis eines Primärtumors
- Tis Carcinoma in situ
- T1 Tumor infiltiert die Lamina propria, Lamina muscularis mucosae (T1a) oder Submucosa (T1b)
- T2 Tumor infiltiert die Muscularis propria
- T3 Tumor infiltiert die Adventitia
- T4 Tumor infiltiert benachbarte Strukturen

Regionäre Lymphknoten (N-Stadium)

NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen \*

N1 Metastasen in 1-2 regionären Lymphknoten

N2 Metastasen in 3-6 regionären Lymphknoten

N3 Metastasen in 7 regionären Lymphknoten

Fernmetastasen (M-Stadium)

M1 Fernmetastasen

Tabelle 2. Stadieneinteilung des Ösophaguskarzinoms

Karzinome des Ös	ophagus und gastro	ösophagealen Übergan	gs	
Stadium 0	Tis	N0	M0	
Stadium IA	T1	N0	M0	
Stadium IB	T2	N0	M0	
Stadium IIA	Т3	N1	M0	
Stadium IIB	T1,T2	N0	M0	
Stadium IIIA	T4a	N1	M0	
	Т3	N1	M0	
	T1,T2	N2	M0	
Stadium IIIB	Т3	N2	M0	
Stadium IIIC	T4a	N1,N2	M0	
	T4b	jedes N	M0	
	Jedes T	N3	M0	
Stadium IV	Jedes N	jedes N	M1	

# **1.6.** Prognosefaktoren

Ein weiterer wichtiger Faktor neben der Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Stadium, der das Ösophaguskarzinom, zu so einem aggressiven Tumor macht ist die Tatsache der frühen lymphogenen Metastasierung. Dies macht sich auch in der Literatur bemerkbar. Der Lymphknotenstatus (pN-Status) wird als ein wichtiger Prognosefaktor sowohl bei Plattenepithelkarzinomen als auch bei Adenokarzinomen des Ösophagus

<sup>\*</sup> Beurteilung von mindestens 6 Lymphknoten

beschrieben (Bottger et al. 1999, Hirayama et Mori et al. 1990, Schneider et al. 2005, Siewert et al. 2001, Stein et al. 2005). Tumoren, die in die Submukosa reichen (pT1b), scheinen häufiger Lymphknotenmetastasen zu bilden als Tumoren, die in die Lamina muscularis mucoase oder Lamina propria reichen (pT1a; Hirayama et Mori et al. 1990). Komori et al haben die 5-Jahresüberlebensrate von 322 Patienten mit einem Ösophaguskarzinom untersucht. Dabei lag die 5-Jahresüberlebensrate von Patienten ohne Lymphknotenmetastasen bei 77,7% und bei 35,4% bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen (p<0,0001; Komori et al. 2003). Patienten mit befallenen regionären Lymphknoten haben eine bessere Prognose als Patienten mit positiven Lymphknoten-Fernmetastasen (Korst et al. 1998). Zusätzlich wichtig scheint auch die Anzahl der betroffenen Lymphknoten zu sein. So haben Patienten mit einer geringeren Anzahl befallener Lymphknoten in der peritumoralen Region eine bessere Prognose (Holscher et al. 1995a, Kunisaki et al. 2004, Nigro et al. 1999). Patienten mit einem positiven Lymphknoten haben eine bessere Prognose als Patienten mit zwei oder drei positiven Lymphknoten und diese haben wiederum eine bessere Prognose als Patienten mit vier oder mehr (Kawahara et al. 1998, Mariette et al. 2008). Bei Mammakarzinomen scheinen kleinere Lymphknotenmetastasen (Mikrometastasen) mit einer besseren Prognose einherzugehen als größere Lymphknotenmetastasen (Rosen et al. 1981). Dies wird am Ösophaguskarzinom kontrovers diskutiert (Komori et al. 2003, Matsumoto et al. 2000, Sato et al. 2001). Neben dem pN-Status ist auch die Lymphangioinvasion wichtig; Patienten mit einer Lymphangioinvasion haben eine schlechtere Prognose (Bottger et al. 1999, Sarbia et Gabbert 2000).

Weiterhin wird in der Literatur der Resektionsstatus (R0-Status, d.h. mikroskopisch beurteilt vollständige operative Entfernen des gesamten Tumorgewebes) als ein wichtiger Prognosefaktor beschrieben (Bottger et al. 1999, Holscher et al. 1995a, Ide et al. 1994, Lerut et al. 1994, Nigro et al. 1999). Auch der pT-, pM- und UICC-Status zeigen sich als prognostisch relevant (Bottger et al. 1999, Siewert et al. 2001).

Der histologische Tumortyp wird in der Literatur als prognostischer Faktor kontrovers diskutiert. In manchen Studien (Siewert et al. 2001, Stein et al. 2005) konnte eine bessere Prognose bei Adenokarzinomen gezeigt werden, eine andere Studie (Korst et al. 1998) konnte eine derartige Assoziation bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen nicht finden. Auch scheinen Adenofrühkarzinome eine bessere Prognose als Plattenepithelfrühkarzinome zu haben. Patienten mit Plattenepithelfrühkarzinomen

neigen zur Ausbildung von Zweitneoplasien und häufiger als bei Adenokarzinomen zu Rezidiven (Holscher et al. 1995b).

Außerdem scheint der Grad der Entzündungsreaktion prognostisch relevant zu sein, während der Tumorgrad (klassifiziert nach der WHO) und die Tumorproliferationsrate offenbar keine Relevanz für die Prognose zu haben scheinen (Sarbia et Gabbert 2000). Weiterhin spielt bei Plattenepithelkarzinomen die Tumorlokalisation eine Rolle. Tumoren, die Bezug zum Tracheobronchialsystem haben, zeigen eine schlechtere Prognose (Stein et al. 2001).

# 1.7. Therapie

Die primäre interdisziplinäre Planung der Therapie ist obligatorisch. Die Operation ist nur bei Patienten mit einem lokalisierten Tumor die Methode der Wahl. Das Risiko einer operativen Therapie ist stark abhängig von der Erfahrung des Operateurs. Durch Optimierung der Operationstechniken ist die Mortalitätsrate in den meisten Zentren unter 10% gesunken. Dennoch sollten derartige Operationen in Zentren mit spezieller Erfahrung durchgeführt werden, da eine R0-Resektion einen wichtigen Prognoseparameter darstellt (Holscher et al. 1995a).

# **1.7.1.** Behandlung eines limitierten Stadiums (Tis-T2 N0-1 M0)

In Stadium Tis-T1a N0 kommen entweder eine Mukosektomie oder eine Ösophagektomie in Frage. Im Stadium T1-2 N0-1 ist die Ösophagektomie die Therapie der Wahl wobei das Langzeitüberleben nicht über 25% liegt wenn Lymphknoten befallen sind. Für Patienten, die eine Operation nicht wünschen oder dazu nicht in der Lage sind, kommt eine kombinierte Radiochemotherapie in Frage, wobei diese der alleinigen Radiatio überlegen ist. Weiterhin kann bei Adenokarzinomen eine präoperative Chemotherapie in Erwägung gezogen werden (Stahl et Oliveira 2008).

# **1.7.2.** Behandlung eines fortgeschrittenen Stadiums (T3-T4 N0-1 M0 oder T1-4 N0-1 M1)

Die alleinige Operation ist bei fortgeschrittenen Stadien nicht die Therapie der Wahl, da trotz eines evtl. M0-Stadiums, eine R0 Resektion bei Patienten mit einem pT3 oder pT4 Stadium in ca. 30% bzw. 50% nicht erreicht werden kann. Selbst bei einer kompletten Tumorresektion liegt das Langzeitüberleben bei diesen Patienten selten über 20%. Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus könnten von einer präoperativen Chemo- bzw. Radiochemotherapie profitieren. Dies würde zu einer höheren Rate an R0-Resektionen, besseren Kontrolle des lokalen Tumorfortschrittes und demzufolge auch zu einem längeren Überleben führen. Allerdings könnte die präoperative Radiochemohterapie zu einer höheren postoperativen Mortalität führen. Bei Adenokarzinomen ist man sich noch nicht einig ob die Radiatio einen Vorteil gegenüber der alleinigen präoperativen Chemotherapie zeigt. Trotzdem ist eine Behandlungsoption bei Adenokarzinomen die Gabe von Cisplatin und 5-Fluorouracil kombiniert mit einer Bestrahlungsdosis von ~ 40 Gy mit nachfolgender Operation (Stahl et Oliveira 2008).

#### **1.7.3.** *Neoadjuvante Therapie*

Ob die neoadjuvante Chemotherapie das Überleben bessert, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In einem Review-Artikel, in dem 11 randomisierte Studien mit insgesamt 2051 Patienten untersucht worden sind, konnte gezeigt werden, dass eine präoperative Chemotherapie das Überleben bessern könnte, jedoch muss dies noch weiter erforscht werden. Die beste Chemotherapiekombination schien Cisplatin und 5-Fluorouracil zu sein, jedoch haben Malthaner et al in ihrer Analyse sich nicht ausgiebig damit beschäftigt Studien zu vergleichen, die verschiedene Chemotherapeutika oder Dosierungen untersucht haben (Malthaner et al. 2006).

Auch eine weitere Studie konnte zeigen, dass Patienten, die eine neoadjuvante Therapie erhalten haben, ein besseres Überleben zeigten. Eine Gruppe von Patienten (n=250) hatte eine neoadjuvante Therapie erhalten (Epirubicin, Cisplatin, Fluorouracin) mit anschließender Operation, während eine andere Gruppe von Patienten (n=253) eine alleinige Operation erhalten hat. Dabei zeigte die erste Gruppe ein 5-Jahresüberleben von 36%, die zweite Gruppe ein 5-Jahresüberleben von 23% (Cunningham et al. 2006).

Eine alleinige präoperative Bestrahlung (mit oder ohne postooperativer Bestrahlung) bringt keinen zusätzlichen Vorteil zum Überleben im Vergleich zu einer alleinigen Operation. Diese Therapie wird nicht empfohlen (Stahl et Oliveira 2008).

#### **1.7.4.** *Palliative Therapie*

Über 50% der Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnose entweder einen fortgeschrittenen lokoregionären Befund, Lymphknotenmetastasen oder können aufgrund von Zweiterkrankungen nicht operiert werden. Hier werden eine Chemo-bzw. Radiochemotherapie immer wichtiger, um die Lebensqualität zu verbessern und das Überleben zu verlängern. Über den tatsächlichen Erfolg dieser Therapie ist in der Literatur wenig zu finden (Siersema et al. 2007).

Durch die hohe Toxizität und offenbar auch nicht immer hinreichenden Erfolg konventioneller Chemotherapeutika, wie Cisplatin und Fluorouracil, ist es wichtig neue Therapieziele zu finden. Einen hohen Stellenwert erreichen dadurch Therapien, die spezifisch die molekularen Veränderungen des Tumors als Ziel haben (Ilson et al. 2004).

# 1.8. Molekulare Grundlagen des Ösophaguskarzinoms

Hanahan und Weinberg (Hanahan et Weinberg 2000) haben in ihrem Artikel: "The Hallmarks of Cancer" die sechs Prinzipien geschildert, die für die Kanzerogenese wichtig sind.

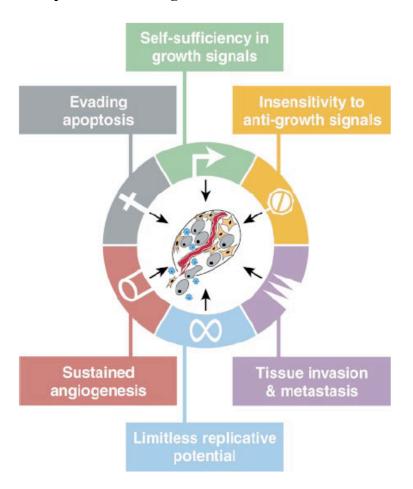


Abbildung 1. Prinzipien der Karzinogenese nach Hanahan und Weinberg

**Abbildung 1.** Die sechs Prinzipien der Karzinogenese nach Hanahan und Weinberg: "Selbstversorgung" der Tumorzellen mit Wachstumssignalen, "Nicht-Ansprechen" auf Wachstumssignale, Fähigkeit der Apoptose zu entgehen, uneingeschränkte Teilungsfähigkeit, Fähigkeit zur Angiogenese, Invasion und Metastasierung.

Für die Tumorentstehung ist die "Selbstversorgung" der Tumorzellen mit Wachstumssignalen wichtig. Diese Signale werden in normalen Zellen durch Transmembranrezeptoren weitergeleitet, die verschiedene Liganden binden. Bei vielen Tumoren sind Wachstumsfaktorrezeptoren (oft mit Tyrosinkinase- Aktivität) überexprimiert; z.B. der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) oder der

Her2/neu-Rezeptor, beide amplifiziert bzw. überexprimiert bei z.B. Magen- und Mammakarzinomen (Cho et al. 2008a, Marx et al. 2009, Owens et al. 2004, Slamon et al. 1987, Yoshida et al. 1989). EGFR und HER2/neu Amplifikationen bzw. Überexpressionen wurden auch am Ösophaguskarzinom vielfach untersucht. Der HER2/neu-Rezeptor spielt vor allem bei Adenokarzinomen des Ösophagus eine wichtige Rolle. Dabei sind in der Literatur Amplifikationen in 15 bis 35% der Fälle beschrieben worden; in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus hingegen nur in 5% (Reichelt et al. 2007, E. R. Sauter et al. 1993, Walch et al. 2001). Der EGFR-Rezeptor-Status ist in Verbindung mit dem Ösophaguskarzinom in der Literatur auch schon mehrfach beschrieben worden. Dabei konnte in einer Studie eine Überexpression in 33 von 103 (32%) untersuchten Adenokarzinomen des Ösophagus gezeigt werden (Wang et al. 2007), in einer anderen in 2 von 15 (13,3%) der gut-/mitteldifferenzierten Adenokarzinomen und in 13 von 23 (56,5%) der schlechtdifferenzierten Adenokarzinomen (Wilkinson et al. 2004). Mittels FISH-Untersuchung konnte eine Amplifikation in 23 von 55 (42%) untersuchten Plattenepithelkarzinomen gezeigt werden (Sunpaweravong et al. 2005). Patienten mit einer EGFR Amplifikation/ bzw. Überexpression zeigten ein schlechteres Langzeitüberleben (Inada et al. 1999, Wang et al. 2007, Wilkinson et al. 2004). Weiterhin wird in der Literatur eine Assoziation positivem EGFR-Rezeptorstatus (Immunhistochemie) zwischen und Radiochemotherapie-Ansprechen beschrieben; Patienten mit positivem **EGFR** Rezeptorstatus hatten ein besseres Ansprechen auf die Therapie gezeigt als Patienten mit negativem EGFR-Rezeptorstatus (p= 0,037; Gotoh et al. 2007). Medikamente, die den EGFR-Rezeptor blockieren (z.B. Gefitinib oder Erlotinib (Tarceva)) scheinen einen antiproliferativen Effekt zu haben (Sutter et al. 2006, Taira et al. 2006). Bei gleichzeitiger Gabe von Gefitinib konnte in 8 verschiedenen Zelllinien (menschliche Ösophaguskarzinom-Zellen) ein besseres Ansprechen des Tumors auf die Radiotherapie gezeigt werden, was aber an einer größeren Gruppe von Zelllinien weiter evaluiert werden sollte (Taira et al. 2006).

Für einen Tumor ist weiterhin das Nicht-Ansprechen auf hemmende Faktoren wichtig. Im normalen Gewebe gibt es mehrere antiproliferative Signale, die zu einer Homöostase führen. Die Hemmung der Proliferation kann auf zwei verschiedene Weisen stattfinden. Einerseits können Zellen vom aktiven Zellzyklus in die G0-Phase übergebracht werden, von welcher sie jeder Zeit wieder aktiviert werden können oder sie geben ihr Proliferationspotential auf, in dem sie in postmitotische Stadien übergebracht werden

(meist assoziiert mit der Differenzierung). Tumorzellen müssen diesen Mechanismen entgehen (Hanahan et Weinberg 2000). Im Hinblick auf das Ösophaguskarzinom wurden auch hier mehrere Faktoren untersucht. Dabei konnte in einer Studie nur in 6 untersuchten Ösophaguskarzinomen keine Expression von (17%)Retinoblastomproteins nachgewiesen werden (Jiang et al. 1993). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer weiteren Studie erzielt. Dabei wurde eine Expression in 93,6% (161 von 172), während der Rest keine Expression zeigte (ca. 16%; zur Hausen et al. 1999). Das Retinoblastomgen könnte eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des Ösophaguskarzinoms spielen (Contu et al. 2007). Ein weiterer wichtiger Faktor in der Entstehung von Tumoren generell scheint der TGF-ß Faktor zu sein (transforming growth factor). Von Rahden et al konnten mittels PCR in allen 123 von ihnen untersuchten Adenokarzinomen des Ösophagus eine Expression nachweisen, jedoch war die relative Überexpression mit einem fortgeschrittenen UICC-Stadium und schlechter Prognose assoziiert (von Rahden et al. 2006). Wie weiter oben schon beschrieben, gehen Zellen mit dem Erreichen der Differenzierung in ein postmitotisches Stadium über, in dem sie nicht mehr teilungsfähig sind. Dabei spielt das Onkogen Cmyc, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert, eine wichtige Rolle. Bei Überexpression bzw. Amplifikation von C-myc, wird der Schritt zur Differenzierung gehemmt, während das Wachstum gefördert wird (Hanahan et Weinberg 2000). Im Ösophaguskarzinom wird in der Literatur eine Amplifikation (PCR) in 8 von 77 (10,4%) untersuchten Plattenepithelkarzinomen (UICC I oder II) und in 13 von 43 (30,2%) untersuchten Plattenepithelkarzinomen, die multimodal (Radiochemotherapie) behandelt worden sind wegen fortgeschrittenem Stadium (cT3-4, cN0-1, cM0), beschrieben. C-myc Amplifikationen waren häufiger somit in fortgeschrittenen Stadien zu finden (Bitzer et al. 2003). Eine Assoziation mit dem Überleben konnte nicht hergestellt werden. In einer weiteren Studie lag die Amplifikationsrate (PCR) nur ein wenig höher. Von 41 untersuchten Plattenepithelkarzinomen waren 16 amplifiziert (39%). Hier konnte auch ein Zusammenhang zwischen C-myc Amplifikationen und positiven Lymphknotenmetastasen, TNM- Stadium und Prognose gezeigt werden (He et al. 1995).

Für einen Tumor ist es nicht nur wichtig die Eigenschaft zu haben zu expandieren (Erhöhung der Zellproliferation), sondern auch die Eigenschaft der Zellen, der Apoptose zu entgehen (Hanahan et Weinberg 2000). Ein wichtiges Gen in diesem Zusammenhang ist p53. Mutationen des p53 Gens sind an Ösophaguskarzinomen unterschiedlich schon

beschrieben worden. Dabei sind in der Literatur Mutationen in 36,7%-87% der Plattenepithelkarzinome (Egashira et al. 2007, Kim et al. 2006, Sengpiel et al. 2009) und in 75% (Chung et al. 2007) bzw. 34,5% (Sengpiel et al. 2009) der Adenokarzinome zu finden. Weiterhin scheint die Mutationsrate in schlecht und mäßig differenzierten Karzinomen (56,3%) höher als in gut differenzierten Karzinomen (36,7%) zu sein (He et al. 1998). Auch Bcl 2 scheint eine Rolle bei Ösophaguskarzinomen zu spielen. Es konnte eine Expression von Bcl 2 in 18% (n=40 Plattenepithelkarzinome) gezeigt werden, die mit einer schlechteren Prognose assoziiert war (p= 0.03; Hsia et al. 2001). Ein weiterer Faktor, der in der Literatur schon beschrieben worden ist, ist der IGF 1R Rezeptor (Insulin- like growth factor- 1 Rezeptor). Dabei findet sich in der Literatur eine Überexpression (Immunhistochemie) in 60% (n=100 Plattenepithelkarzinome, (Imsumran et al. 2007) bzw. in 73% der Adenokarzinome (n=131) und 25% der Plattenepithelkarzinome (n=101; Kalinina et al.). In letzterer Studie konnte gezeigt werden, dass die Überexpression in Adenokarzinomen mit einem schlechteren Überleben einherging, in Plattenepithelkarzinomen dagegen nicht.

Zusätzlich zu den oben genannten Eigenschaften eines Tumors gehört auch die Fähigkeit sich uneingeschränkt zu replizieren. Dabei braucht die Tumorzelle eine Telomeraseaktivität (Hanahan et Weinberg 2000). In der Literatur wird eine Telomeraseaktivität in 79% (n=52 Plattenepithelkarzinome; Ikeguchi et al. 1999) und in 87% (n= 31 Ösophaguskarzinome; Takubo et al. 1997) beschrieben. Eine erhöhte Telomeraseaktivität in 79% der normalen Epithelien in Umgebung des Tumors in der zuerst beschriebenen Studie sei ein Hinweis auf die Wichtigkeit bei der Karzinogenese. Auch hinsichtlich Angiogenese sind Untersuchungen am Ösophaguskarzinom durchgeführt worden. In einer aktuellen Studie mit 108 Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus konnte eine Expression von VEGF (Vascular endothelial growth factor) in 55% gezeigt werden (Boone et al. 2009). Die Ergebnisse von einer zuvor publizierten Studie lagen nur ein wenig höher. Eine Expression von VEGF wird hier in 26 von 40 (65%) untersuchten Plattenepithelkarzinomen beschrieben (Han et al. 2007).

Weiterhin ist für einen Tumor die Fähigkeit zur Invasion wichtig (Hanahan et Weinberg 2000). Dies können Tumorzellen zum Bespiel durch Verlust des E-Cadherins erreichen. Im Jahre 2001 wurden in einer Studie 416 Plattenepithelkarzinome untersucht. Dabei konnte eine Expression von E-Cadherin in 42,3% (176 von 416) noch nachgewiesen werden. Der E-Cadherin-Verlust zeigte sich als ein wichtiger Prognosefaktor (P=0,042; Research Committee on Malignancy of Esophageal cancer, 2001).

# **1.9.** Die Funktion von Cyclin D1

Das CCND1 Gen liegt auf dem Chromosom 11q13 und kodiert für das Cyclin D1 Protein, welches, wie auch Cyclin D2 und Cyclin D3 zu der Familie der D-Typ Cycline gehört. Diese können einerseits als Teil eines Holoenzyms, Cdk-abhängig, das Retinoblastom-Tumor-Supressor-Protein (pRb) inaktivieren und das Zellwachstum von der G1-Phase zur S-Phase beschleunigen (Abbildung 2). Andererseits kann Cyclin D1, Cdk-unabhängig, durch seine Kontrollfunktion in der G1 Phase sämtliche Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Ewen et Lamb 2004). Dies konnte zuerst am Östrogenrezeptor demonstriert werden – Überexpression von Cyclin D1 bei gleichzeitig positivem Östrogenreptorstatus (Zwijsen et al. 1997). Mittlerweile konnte dies auch an weiteren Transkriptionsfaktoren bewiesen werden, z.B. am Androgen-Rezeptor (Knudsen et al. 1999), STAT 3 (Signaltransduktion und Aktivierung der Trankskription; (Bienvenu et al. 2001) und Schilddrüsenrezeptoren (Lin et al. 2002).

Abbildung 2. Cdk-abhängige Funktion von Cyclin D1 (Coller et al. 2007)

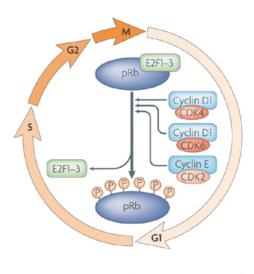


Abbildung 2. Durch Phosphorylierung wird das Retinoblastomprotein, durch Holoenzyme (Cyclin D1, CDK4; Cyclin D1, CDK6; Cyclin E, CDK2) gesteuert, inaktiviert. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor E2F aus dem pRb-E2F Komplex gelöst. Der Transkriptionsfaktor E2F führt wiederum zu einer Induktion der Transkription von Genen, die für die Progression von der G1-Phase zur S- Phase nötig sind.

#### **1.10.** Genetische Alterationen des CCND1 Gens

Genetische Alterationen des 11q13 Chromosoms sind sehr häufig. CCND1-Amplifikationen und Cyclin D1-Überexpressionen wurden schon an mehreren Karzinomen untersucht. Beim Mammakarzinom fanden sich Amplifikationen in 9,6%-30% (Al-Kuraya et al. 2004, Cho et al. 2008b, Elsheikh et al. 2008, Jirstrom et al. 2005, Naidu et al. 2002, Reis-Filho et al. 2006, Roy et al. 2009) und eine Überexpression in 32,8%-96% (Bieche et al. 2002, Cho et al. 2008b, Elsheikh et al. 2008, Guo et al. 2007, Lin et al. 2005, Naidu et al. 2002, Reis-Filho et al. 2006, Roy et al. 2009). In einer großen Studie mit Mammakarzinomen (n=2197) konnten Amplifikationen mittels FISH in 20,1% nachgewiesen werden, die einen Zusammenhang mit positivem Östrogen-Rezeptor-Status zeigten (p<0.001; Al-Kurava et al. 2004). In einer anderen Studie wurden 440 Mammakarzinome untersucht. Dabei fanden sich Amplifikationen in 27% (263/440). Diese zeigten einen Zusammenhang mit positivem Lymphknotenstatus (p<0,05), aber nicht mit dem histologischen Typ (p>0,05), Östrogen- Rezeptor- Status (p>0.05) und Proliferationsindex (p>0.05). Eine Überexpression zeigte sich in 60% (263/440), die wiederum einen Zusammenhang mit positivem Östrogen-Rezeptor-Status zeigte (p<0,05; Naidu et al. 2002). Roy et al haben 93 Mammakarzinome untersucht. Dabei fanden sich Amplifikationen in 30% und eine Überexpression in 63%. Ein Zusammenhang mit Tumorgröße, Lymphknotenstatus oder Her2/neu-Amplifikationen lies sich nicht nachweisen, allerdings zeigte sich ein Zusammenhang mit höherem Tumorgrad (p=0,005) und schlechter Prognose (p=0,001; Roy et al. 2009). Den Zusammenhang mit schlechter Prognose beschreiben zwei weitere Studien (Cuny et al. 2000, Naidu et al. 2002). Auch gab es eine Studie, die dies nicht zeigen konnte (Seshadri et al. 1996). Weiterhin ist der Zusammenhang zwischen Amplifikation und Expression (p<0,001) in der Literatur bekannt (Elsheikh et al. 2008).

Bei Harnblasenkarzinomen zeigte sich eine Überexpression in 31,3%-77% (Moonen et al. 2001, Suwa et al. 1998, Takagi et al. 2000, Wagner et al. 1999), Amplifikationen in 11-21% (Bringuier et al. 1996, Proctor et al. 1991, G. Sauter et al. 1993, Schraml et al. 1999). In einer Studie mit 392 Harnblasenkarzinomen konnte in 44% der Fälle eine Überexpression nachgewiesen werden, die einen Zusammenhang mit niedrigen Tumorstadium (p<0,05) und histologischen Grad (p<0,05) zeigte, jedoch nicht mit der Tumorprogression (Wagner et al. 1999). In einer zuvor publizierten Studie fand sich

weder ein Zusammenhang zum Tumorstadium noch zum Ki67 Labeling Index (Suwa et al. 1998).

In der Literatur werden Amplifikationen in 22-57% der Kopf-Hals-Tumoren beschrieben (Akervall et al. 1997, Davidson et al. 1996, el-Naggar et al. 1995, Jares et al. 1994, Kyomoto et al. 1997, Muller et al. 1994, Nogueira et al. 1998, Xu et al. 1994). Dabei fanden sich in einigen Studien Zusammenhänge zwischen Amplifikationen und lokaler Invasion (p=0,0015), Lymphknotenmetastasen (p=0,0078) und Tumorstadium IV (p=0,0021; Jares et al. 1994) und Zusammenhänge zwischen Amplifikationen bzw. Expression und 5- Jahresüberlebensraten (p<0,0001 bzw. p<0,05; Kyomoto et al. 1997). Eine andere Studie konnte keinen Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern zeigen (Davidson et al. 1996).

Auch Translokationen spielen eine wichtige Rolle. Bei Mantelzelllymphomen konnten diese auch mittels FISH-Untersuchung nachgewiesen werden (Elnenaei et al. 2001, Kodet et al. 2003). Bei der zuletzt genannten Studie konnte bei allen 32 untersuchten Mantelzelllymphomen eine Translokation gezeigt werden (Kodet et al. 2003). Der immunhistologische Nachweis einer Expression von Cyclin D1 bei Lymphomen spielt auch eine wichtige Rolle bei der Diagnostik.

# 1.11. CCND1 am Ösophaguskarzinom

In der aktuellen Literatur scheint das CCND1 Gen/ Cyclin D1 Protein eine sehr wichtige Rolle bei Ösophaguskarzinomen zu spielen. Eine Überexpression des Cyclin D1 Proteins bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus ist in 11%-75% der Fälle beschrieben worden (Arber et al. 1999, Chang et al. 2005, Guner et al. 2003, Ikeda et al. 1999, Ikeguchi et al. 2001, Inomata et al. 1998, Ishikawa et al. 1998, Itami et al. 1999, Lin et al. 2004, Mathew et al. 2002, Matsumoto et al. 1999, Morgan et al. 1999, Nagasawa et al. 2001, Naitoh et al. 1995, Sarbia et al. 1999, Sheyn et al. 1997, Sunpaweravong et al. 2005, Takeuchi et al. 1997, Toyoda et al. 2000); Amplifikationen des CCND1 Gens sind bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus in 23%-65% (Adelaide et al. 1995, Bizari et al. 2006, Inomata et al. 1998, Morgan et al. 1999, Naitoh et al. 1995, Sheyn et al. 1997, Shimada et al. 1997, Shinozaki et al. 1996, Sunpaweravong et al. 2005). Die meisten Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Amplifikation und Überexpression zeigen (Bizari et al. 2006, Morgan et al.

1999, Naitoh et al. 1995, Sheyn et al. 1997, Sunpaweravong et al. 2005). Viele Studien konnten auch einen signifikanten Zusammenhang zwischen Amplifikation bzw. Überexpression und Überleben zeigen (Guner et al. 2003, Ikeguchi et al. 2001, Inomata et al. 1998, Ishikawa et al. 1998, Itami et al. 1999, Mathew et al. 2002, Matsumoto et al. 1999, Nagasawa et al. 2001, Sarbia et al. 1999, Shimada et al. 1997, Shinozaki et al. 1996, Takeuchi et al. 1997, Toyoda et al. 2000), andere wiederum nicht (Adelaide et al. 1995, Chang et al. 2005, Ikeda et al. 1999, Sunpaweravong et al. 2005). Der Zusammenhang zu klinisch-pathologischen Parametern (T-Stadium, N-Stadium, Differenzierungsgrad etc.) ist in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Dabei konnte in den meisten Studien (Adelaide et al. 1995, Ikeda et al. 1999, Ishikawa et al. 1998, Lin et al. 2004, Morgan et al. 1999, Naitoh et al. 1995, Sunpaweravong et al. 2005) kein Zusammenhang zwischen CCND1-Amplifikationen bzw. Cyclin D1-Überexpression und klinisch-pathologischen Parametern gezeigt werden. Andererseits gab es auch Studien, die unterschiedliche Zusammenhänge beweisen konnten. Es wird ein Zusammenhang zwischen Amplifikation und Fernmetastasen (M-Stadium), jedoch nicht mit Lymphknotenmetastasen (N-Stadium) beschrieben (Shinozaki et al. 1996); eine höhere Anzahl von Überexpressionen bei Patienten mit höherem Alter (Arber et al. 1999); ein Zusammenhang zwischen Überexpression und Lymphknotenmetastasen (N-Stadium) sowie hoher proliferativer Aktivität, jedoch nicht zum T-Stadium (Sarbia et al. 1999); ein Zusammenhang zwischen Überexpression und Lymphangioinvasion bzw. Lymphknotenmetastasen (Nagasawa et al. 2001).

Eine Überexpression von Cyclin D1 in Adenokarzinomen des Ösophagus konnte man in 32%-77% finden (Arber et al. 1999, Langer et al. 2006, Morgan et al. 1999), eine Amplifikation in 7%-8% (Miller et al. 2003, Morgan et al. 1999). Auch scheint es in einer Studie einen Zusammenhang zwischen Amplifikation und Überleben, jedoch nicht zum Tumorstadium zu geben (Miller et al. 2003). Den Zusammenhang zwischen Expression und Überleben konnte eine andere Studie nicht bestätigen (Langer et al. 2006).

CCND1-Amplifikationen werden in der Literatur auch bei high grade Dysplasien im Barrett-Ösophagus beschrieben (in 2 von 22 Fällen; Miller et al. 2003).

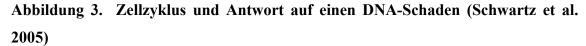
Tabelle 3. CCND1 Alterationen in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Literatur)

Tumor Typ	Fälle	Methoden	Amplifikation (%)	Über- expression	Beziehung zum	Literatur
D1-44 · · ·				(%)	Überleben (P)	
Platten- epithel- Karzinome						
Karzmonic	20	FISH				(Sheyn et al. 1997)
	20	IHC	65	75		(
	40	FISH				(Bizari et al. 2006)
	40	IHC	45	38		(0
	55 55	FISH IHC	42	58	n.s.	(Sunpaweravong et al. 2005)
	12	Southern	42	36		(Naitoh et al. 1995)
	17	Blot	42	71		(
	45	IHC Southern			p<0,05	(Inomata et al. 1998)
	14	Blot	31	29	p <0,03	(momata et al. 1990)
		IHC				
	19	Southern				(Morgan et al. 1999)
	19	Blot IHC	26	11		
	44	Southern			n.s.	(Adelaide et al. 1995)
		Blot	54			(======================================
	38	Southern			p=0,040	(Shimada et al. 1997)
	122	Blot Slot Blot	26		p<0,001	(Shinozaki et al. 1996)
	122	Slot Blot	23		p<0,001	(Silliozaki et al. 1990)
	17	IHC	-25	71		(Arber et al. 1999)
	53	IHC		66	n.s.	(Ikeda et al. 1999)
	70	IHC		59	p=0,067	(Mathew et al. 2002)
	62	IHC		57	p>0,05	(Lin et al. 2004)
	148	IHC		41		(Ikeguchi et al. 2001)
	210	IHC		75	p=0,002	(Sarbia et al. 1999)
	89	IHC		35	p=0,0017	(Toyoda et al. 2000)
	156	IHC		33	p=0,016	(Itami et al. 1999)
	118	IHC		33	n.s.	(Chang et al. 2005)
	86	IHC		27	p=0,013	(Nagasawa et al. 2001)
	90	IHC		31	p<0,05	(Matsumoto et al. 1999)
	80	IHC			p<0,03 p<0,01	(Ishikawa et al. 1998)
				31	-	
	111	IHC		25	p=0,01	(Takeuchi et al. 1997)
	53	IHC		17	p=0,034	(Guner et al. 2003)
Adeno-						
carcinome	26	Southern	8			(Morgan et al. 1999)
	26	blot IHC	J	32		(o.gan et al. 1777)
	87	Southern	7		p=0,044	(Miller et al. 2003)
	11	blot Southern	0			(Adelaide et al. 1995)
	137	blot IHC		77	n.s.	(Langer et al. 2006)
					11.5.	
n.s. = nicht	22	IHC		64		(Arber et al. 1999)

<sup>\*</sup> n.s. = nicht signifikant

# **1.12.** CCND1 als mögliches Therapielziel Cyclinabhängiger Kinasen

Die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten Behandlung des zur Ösophaguskarzinoms scheint immer wichtiger zu werden. Einen möglichen Erfolg könnten dabei Therapien bringen mit Medikamenten, die den Zellzyklus beeinflussen, wie z.B. Flavopiridol (Alvocidib). Um zu verstehen wie Flavopiridol wirkt, ist es zunächst wichtig die einzelnen Schritte des Zellzyklus zu verdeutlichen. Bei einer Schädigung der DNA (z.B. durch Chemo- oder Radiotherapie) wird p53 aktiviert und führt dann zur Induktion von p21 (CDK1). Dieses wiederum bindet und inhibiert den CyclinE/CDK2-, CyclinA/CDK2- und CyclinB1/cdc2-Komplex (Abbildung 3). Aus onkologischer Sicht ist dies eine Möglichkeit für gesunde Zellen dem zytotoxischen Effekt zu entgehen, jedoch steht dieser Mechanismus auch den Tumorzellen zur Verfügung und mindert somit den Erfolg konventioneller Chemotherapeutika. Dies konnte man an Kolonkarzinomen zeigen. Zellen mit normalem p21-Status zeigten nach Bestrahlung einen Zyklusarrest mit folgendem klonalen Überleben, während andere Zellen, die kein p21 exprimierten, zur Apoptose übergeführt worden sind (Schwartz et al. 2005).



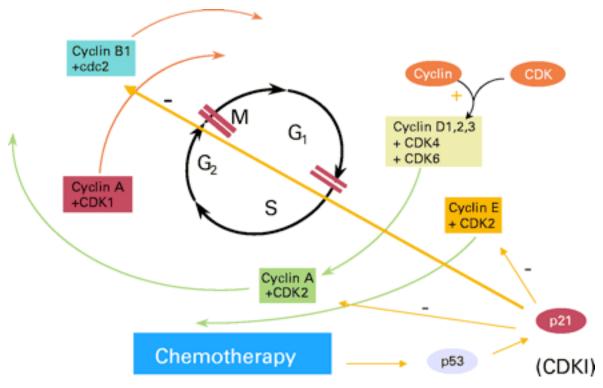


Abbildung 3. Zellzyklus und Antwort auf einen DNA-Schaden. Nach einem DNA-Schaden (induziert z.B. durch Chemotherapie oder Radiotherapie) wird p53 aktiviert, welches wiederum als Transkriptionsfaktor zur Induktion von p21 führt. Dieses bindet anschließend an einen Cyclinabhängigen Kinaseinhibitor (CDK1) und inhibiert dadurch die Aktivität von Cyclin E/CDK2, Cyclin A/CDK2 und Cyclin B1/cdc2. Dies führt zu einem Arrest sowohl in der G1 als auch G2 Phase (Schwartz et al. 2005).

Flavopiridol ist ein semisynthetisches Flavon und wirkt inhibierend auf multiple CDKs, inklusive CKD1, CKD2, CDK4/6 und CKD7 (Sedlacek et al. 2001). Es ist der erste Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor, der in klinischen Studien mit Menschen getestet worden ist (Senderowicz et al. 1998). Flavopiridol scheint zu einem Zellzyklusarrest in der G1-S- aber auch in der G2-M-Phase zu führen (Carlson et al. 1996), kann aber auch z.B. in Zellen der Hämatopoese zu einer Induktion der Apoptose führen (Motwani et al. 1999). Weiterhin scheint Flavopiridol - an Ösophagus- und Lungenkarzinomen untersucht - p21 zu inhibieren und dadurch eine Apoptose zu induzieren (Nguyen et al.

2003), kann aber auch an bel-2 (Konig et al. 1997), mel-1 (Gao et al. 2004, Kitada et al. 2000), XIAP (Motwani et al. 2001) und Cyclin D1 (Carlson et al. 1999) direkt wirken. In der Literatur wird Flavopiridol als mögliches neues Medikament in der Therapie von gastrointestinalen Tumoren vorgeschlagen, da konventionelle Chemotherapeutika offensichtlich nicht in der Lage sind eine Apoptose der Tumorzellen zu erreichen und auch nur der Tod der Tumorzellen eine Heilung bedeutet. Dabei sollen die Ergebnisse besser sein bei Patienten mit einem p53-Wildtyp (Schwartz et al. 2005). Weiterhin wird in der Literatur berichtet, dass bei Ösophagus- und Lungenkarzinomen durch eine Kombination von Flavopiridol und einem Dipepsid (Hochregulierung von p21 und Zellzyklusarrest in der G1 und G2 Phase) bessere Ergebnisse erzielt werden konnten. Die Toxizität war hoch und selektiv; normale Zellen waren dadurch nicht betroffen (Nguyen et al. 2003). In einer anderen Studie wurde an 39 Patienten mit nicht kurativen Tumoren unter bestimmten Kriterien (keine andere lebensverlängerte Therapie mehr möglich, keine vorangehende Carboplatin oder Cisplatin Therapie, bestimmte Laborwerte etc.) die Wirkung von Flavopiridol mit oder ohne Carboplatin- oder Cisplatinzugabe untersucht. Flavopiridol und Cisplatin sei eine sichere Kombinationstherapie mit wenigen Nebenwirkungen; Flavopiridol und Carboplatin zeigten dagegen eine unerwartet hohe Toxizität (Bible et al. 2005). Tumorzellen (an einem Mausmodell untersuchte Zelllinien von Ösophaguskarzinomen) zeigten nach einer Flavopiridol-Therapie eine geringere immunhistologische Anfärbbarkeit für Cyclin D1, VEGF und Rb (Sato et al. 2006).

Zusammenfassend kann man sagen, dass es Studien gibt, die auf einen möglichen Erfolg des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors, Flavopiridol, hindeuten (Bible et al. 2005, Sato et al. 2006, Schwartz et al. 2005) und einen Zusammenhang mit Cyclin D1 gefunden haben (Sato et al. 2006). Auf derartige Studien basierend könnte die Untersuchung der Homogenität von CCND1-Alterationen in positiven Tumoren wichtig werden. Eine Inhomogenität von CCND1-Alterationen zwischen Primärtumor und Metastase könnte die Ursache einer nichtansprechenden Therapie sein.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass CCND1-Alterationen beim Ösophaguskarzinom häufig sind und tendenziell mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind. Weniger bekannt ist das Ausmaß und die Bedeutung der Heterogenität dieser Veränderungen, insbesondere auch im Vergleich Primärtumor versus Metastasen. Das Ausmaß der genetischen Tumorheterogenität ist vor allem im Hinblick auf mögliche Therapieziele

wichtig. Schließlich werden ja meistens resezierte Primärtumoren auf Therapieziele untersucht und die im Patienten verbliebene Metastasen behandelt.

# 1.13. Ziel der Arbeit

Um die potentielle Signifikanz des CCND1 Gens bzw. Cyclin D1 Proteins als therapeutisches Ziel bei Ösophaguskarzinomen in Zukunft näher untersuchen zu können, haben wir in unserer Studie die Cyclin D1-Überexpression und CCND1-Amplifikationen an 285 Primärtumoren und 144 korrespondierenden Metastasen untersucht.

#### 2. Material und Methoden

# **2.1.** Patientenkollektiv

Es wurden 292 Patienten, die an einem Ösophaguskarzinom im Zeitraum von 1992-2004 im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf operiert worden sind, analysiert. 292 129 Patienten ein Adenokarzinom und 163 den hatten Plattenepithelkarzinom. Von den 292 Patienten waren wiederum 228 männlich und 64 weiblich im Alter zwischen 34 und 92 Jahren (Median: 62 Jahre). Bei allen Patienten wurde eine kurative en bloc Resektion mit radikaler Lymphadenektomie durchgeführt. Für 287 Patienten (125 mit einem Adenokarzinom und 162 mit einem Plattenepithelkarzinom) von 292 sind kontinuierliche Follow up Daten erhoben worden. Patienten, die in der Zeit gestorben sind, wurden anhand der Todesursache in karzinombezogene und nicht karzinombezogene Todesursache unterteilt. Patienten, die innerhalb eines Monats nach der OP verstorben sind, wurden unter der Annahme, dass sie an den Folgen der Operation gestorben sind, nicht in die Studie miteinbezogen. Der Median der Follow up Zeit von allen Patienten betrug 23 Monate (95% CI: 18.434-27.566). Alle Tumoren wurden für diese Studie anhand der WHO Klassifikation von 2000 reklassifiziert (Hamilton SR et al. 2000).

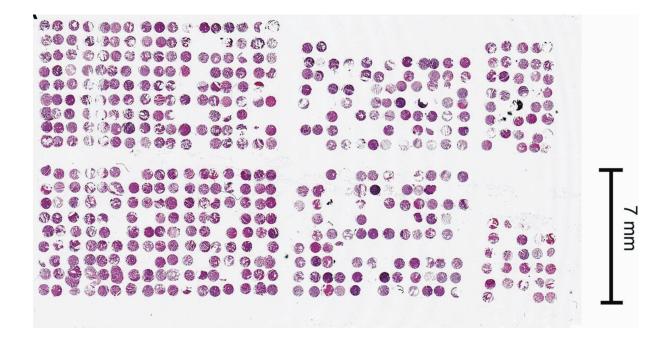
# **2.2.** Kontrollgewebe

Das Kontrollgewebe (n=68) beinhaltet sowohl normales Gewebe als auch Gewebe von anderen Tumoren; Normalgewebe: Ösophagus (n=10), Endometrium (n=2), Haut (n=2), Skelettmuskulatur (n=2), Herzmuskulatur (n=2), Kolonschleimhaut (n=2), Lunge (n=2), Lymphknoten (n=2), Prostata (n=2); Tumorgewebe: Kolon (n=10), Mamma (n=10), Prostata (n=10) und Lunge (n=10).

# **2.3.** TMA- Herstellung

Das Tumorarray-Verfahren macht es möglich bis zu 600 Gewebezylinder (Durchmesser 0,6mm) von histologisch definierten Regionen verschiedener Tumoren in einem einzigen Paraffinblock zu untersuchen (Abbildung 4). Die Gewebeproben für die TMA-Herstellung wurden in 4% gepufferten Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden neue Schnitte von ausgewählten Tumorblöcken hergestellt (donor blocks=Spenderblöcke) und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, um repräsentative Tumorregionen zu definieren. Anschließend wurde mit Hilfe des Array-Stanzgeräts der TMA hergestellt.

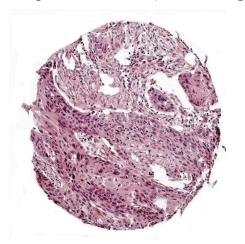
Abbildung 4. Übersichtsaufnahme vom Ösophagus TMA (HE-Färbung)

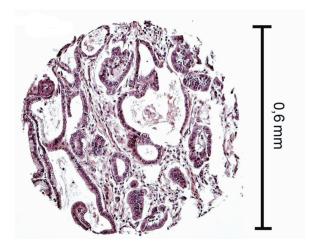


**Abbildung 4.** Übersichtsaufnahme des Ösophagus TMA (HE-Färbung). Jeder Kreis entspricht einem Gewebeblock eines anderen Patienten oder einer anderen Lokalisation (z.B. Lymphknoten- oder Fernmetastasen) desselben Patienten. Durch die Anordnung in Blöcken (in absteigender Größe: A+B, C+D, E+F) und Reihen kann die Zugehörigkeit wiedergegeben werden.

Abbildung 5. Beispiel eines Plattenepithelkarzinoms (HE-Färbung)

Abbildung 6. Beispiel eines Adenokarzinoms (HE-Färbung)



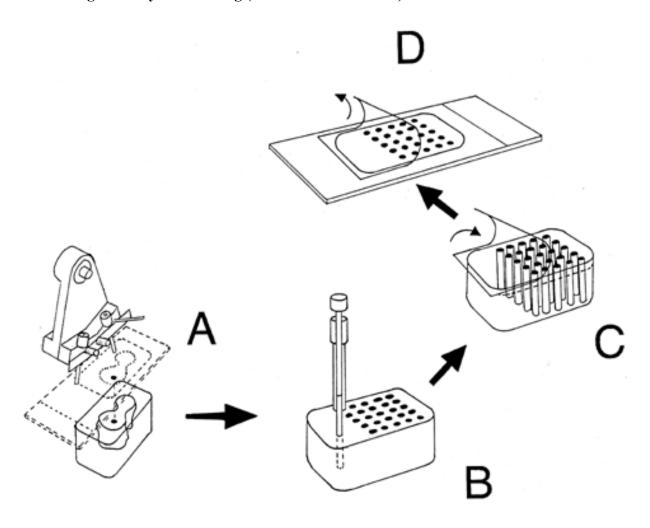


**Abbildung 5 und 6.** Beispiele für ein Plattenepithelkarzinom und ein Adenokarzinom des Ösophagus vom Ösophagus-TMA.

# **2.3.1.** Array-Stanzgerät

Das Array-Stanzgerät besteht aus zwei Nadeln. Eine dünnere Nadel macht es möglich Löcher in die Empfängerblöcke zu stanzen; die dickere Nadel dient der Entnahme von Tumorgewebestücken aus den Spenderblöcken und deren Einbringen in den Empfängerblock.

Abbildung 7. Array-Herstellung (Bubendorf et al. 2001)



**Abbildung 7.** Das Instrument besteht aus einem dünnen, an der Spitze geschärften Hohlzylinder (innerer Durchmesser ca. 600μm), welcher in einem X-Y-Achsen Präzisionsgerät gehalten wird. Ein genau in den Hohlzylinder passender Stahldraht ermöglicht das Ausstoßen von gestanzten Gewebestücken in mit einem analogen Instrument (äußerer Durchmesser ca. 600μm) vorgefertigte Löcher im Empfängerblock (Tumor-Array).

## **2.4.** Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

#### **2.4.1.** FISH-Protokoll Pathologie Hamburg

Die Zubereitung der Schnitte zur FISH-Analyse erfolgte nach dem FISH-Protokoll der Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg:

#### 1.1.1.1. Vorbereitung/Geräte

Preatreatment Reagent VP 2000 Abbott USA gebrauchsfertig.

Protease Puffer 0,01 N HCL VP 2000 Abbott USA; Protease I Abbott USA 250 mg mit Protease Puffer lösen und in Protease geben. Das erste Wasserbad von GFL 1086, auf 80° C vorheizen, dabei in das Wasserbad schon eine Küvette mit ca. 80 ml Pretreatment Reagent einstellen. Das zweite Wasserbad von GFL, auf 37° C vorheizen und schon in das kalte Wasserbad eine Küvette mit ca. 80 ml Protease- Lösung einstellen; der Stand im Wasserbad sollte mit dem Stand in den Küvetten übereinstimmen.

Heizplatte von Störk-Tronic/Präzitherm auf 48° C vorheizen.

Abbott Molecular, StatSpin, ThermoBrite auf 37° C vorheizen; Programmeingabe: 5 Min. 72° C, über Nacht 37° C.

#### 1.1.1.2. **FISH Tag I**

Die Paraffinschnitte werden auf einem Objektträger, Superfrost plus, bei 56° C über Nacht im Brutschrank gebacken, anschließend 3 X 10 Minuten in Xylol von J. T. Baker und 2 X 5 Minuten in 96% Ethanol entparaffiniert und 3 Minuten auf der Heizplatte (48° C) luftgetrocknet.

Enzymatische Vorbehandlung: Slides bleiben 15 Minuten in Pretreatment Reagent bei 80° C im Wasserbad, kurz in A. dest. Gewaschen; Andau in Proteaselösung bei 37° C für 45/150 Minuten und wieder kurz in A. dest. gewaschen.

Dehydrierung: 2 Minuten in 70% Ethanol, 2 Minuten in 80% Ethanol, 2 Minuten in 96% Ethanol, 3 Minuten Lufttrocknung auf der Heizplatte bei 48° C, 10 µl Sonde (Cyclin D1 Abbott (11q13) Spectrum orange/ CEP 11 Spectrum green, 5J4101) auf das

Gewebe pipettieren, mit Deckgläschen (18x18mm) bedecken und mit Foxogum (Marabu, Tamm/Germany) versiegeln.

Anschließend im Thermobrite (Abbott, Wiesbaden- Delkenheim) für 5 Minuten bei 72° C denaturieren und über Nacht bei 37° C hybridisieren.

#### 1.1.1.3. **FISH Tag II**

Fixogum wird entfernt und Objektträger in 2 X SSC (Sodium Chloride Sodium Citrate)/ 0,3% NP40 (Nonyl Phenoxylpolythoxylethanol) pH 7,2-7,4, 2 Minuten bei 72° C gewaschen, kurz mit A. dest. gespült und im Dunkeln luftgetrocknet.

Objektträger werden mit 10 µl DAPI (4',6-Diamidin-Phenylindol-Dihydrochlorid; 1000ng/ml, Abbott) gegengefärbt und mit Deckgläschen abgedeckt.

#### **2.4.2.** FISH-Auswertung

Für jede Gewebeprobe auf dem Array wird die Zahl der CCND1- und Centromer 11-Signale pro Tumorzellkern untersucht. Die Auswertung erfolgt mit einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (40x-100x- Objektiv), welches einen Doppeltfilter besitzt zur gleichzeitigen Visualisierung der Spectrum Orange und Spectrum Green Signale (Vysis). Die Anzahl der Gensignale in Relation zu den Zentromersignalen wurden wenn möglich ausgezählt, bei Vorhandensein von Cluster geschätzt. Eine Ratio >1 und < 2 galt als Zugewinn. Als Kriterium für eine Amplifikation galt eine CCND1/Centromer 11 Ratio ≥ 2 oder das Vorhandensein von Cluster (Moch et al. 1999, Schraml et al. 1999).

# **2.5.** Immunhistologie (IHC)

Die Schnitte werden nach dem Schneiden in Luft getrocknet. Zunächst werden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und dann in absteigender Alkoholreihe, Ethanol (2 x 2 Minuten 100%, 2 x 2 Minuten 96%, 2 x 2 Minuten 80%) bis A. dest. dehydriert. Im Dampfgarer werden dann die Schnitte 20 Minuten in einem vorgewärmten Demaskierungspuffer (Ph 9,0; Dako S2367, 1:10 mit A. dest. verdünnt) inkubiert. Danach müssen die Schnitte 20 Minuten abkühlen und mit Leitungswasser und TBS-Puffer (Fa. Dako S3006, 1:10 mit Aqua dest. verdünnt) gespült werden. Anschließend

werden die Antikörperröhrchen, Funktionsröhrchen und Schnitte in das Autostainer Gerät (Dako) eingeladen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wird Blocking-Peroxidase Solution (Dako S2023) benutzt. Dann erfolgt die Inkubierung mit dem zuvor verdünnten (1:25) Antikörper (Cyclin D1, Dako M7155). Als Detektionssystem wird Envision (Dako Kit K5007, Fläschchen A) benutzt, zur anschließenden Färbung DAB (Dako Kit K5007, Fläschchen A und B) und Gegenfärbung der Kerne Hämalaun benutzt (Dako S2020, 1:5 verdünnt). Zuletzt werden die Schnitte entwässert in absteigender Alkoholreihe, Ethanol, entwässert (2 x 30 Sekunden 80%, 2 x 30 Sekunden 96%, 3 x 30 Sekunden 100%, 3 x 1 Minute Xylol).

#### **2.5.1.** *IHC- Auswertung*

Die immunhistologische Auswertung erfolgte durch Fr. Dr. Uta Reichelt (Pathologin in Ausbildung), wobei nur nukleäre Anfärbungen gewertet worden sind; normale Zellen zeigten keine Anfärbung. Die nukleäre Anfärbbarkeit wurde anhand einer vier-Stufen Skala geschätzt (0, 1, 2, 3). Zusätzlich wurde die Anzahl der Zellen, die eine Anfärbbarkeit zeigten, geschätzt. Der IHC-Score wurde aus zwei Parametern gebildet (Intensität und prozentualer Anteil positiver Tumorzellen) nach Tabelle 4. Diese Vorgehensweise stellt eine am UKE standardmäßig verwendete Prozedur dar.

Tabelle 4. Immunhistologie-Auswertung

Score	Definition			
Negativ	Int 0			
Schwach	Int 1 in ≤70% der Tumorzellen oder			
	Int 2 in ≤30% der Tumorzellen			
Mäßig	Int 1 in >70% der Tumorzellen oder			
	Int 2 in >30% aber ≤70% der			
	Tumorzellen oder			
	Int 3 in ≤30% der Tumorzellen			
Stark	Int 2 in >70% der Tumorzellen			
	Int 3 in >30% der Tumorzellen			

**Tabelle 4.** Vier-Stufen Skala der immunhistologischen Auswertung. Int = Färbungsintensität

### 2.6. Statistik

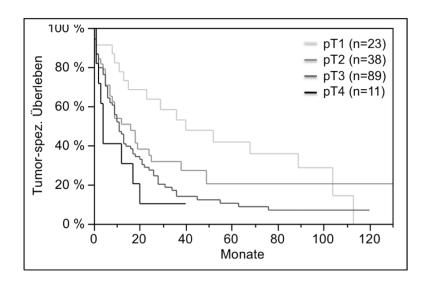
Für unsere Untersuchungen haben wir das Statistik-Programm JMP 8.0 (SAS Institute INC, NC, USA) verwendet. Die Beziehungen zwischen den verschiedenen pathologisch-anatomischen Parametern und CCND1-Alterationen wurden mittels Kreuztabelle über Chi-quadrat-Tests (Likelihood) ausgewertet. Die Überlebenskurven wurden durch Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Für die statistische Beurteilung der Beziehung zwischen molekularen oder histologischen Parametern und tumorspezifischem Überleben wurde ein "log rank test" durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### **3.1.** Klinische Daten

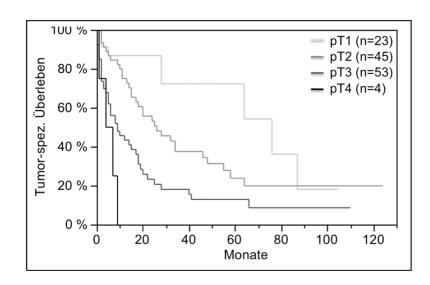
In der FISH-Analyse waren 285 (158 Plattenepithelkarzinome, 121 Adenokarzinome, 6 Adenosquamöse Karzinome) von 292 Gewebespots (=292 Patienten) auf dem Ösophagusarray auswertbar. Von den 285 Patienten gab es 280 Patienten, bei denen Daten vorhanden (für vier Adenokarzinome und Follow-up waren ein Plattenepithelkarzinom waren keine Follow-up Daten erhältlich). Von den 280 Patienten sind wiederum 151 (55,1%) Patienten an einer Tumor-assoziierten Todesursache, 27 (9,9%) an einer perioperativen Todesursache und 22 (8%) an einer nicht Tumorassoziierten Todesursache gestorben. Patienten, die an einer perioperativen Ursache gestorben sind, wurden von der Überlebensanalyse ausgeschlossen. Patienten, die an einer nicht Tumor-assoziiertern Ursache verstorben sind, wurden zum Zeitpunkt ihres Todes zensiert. Die übrigen 80 Patienten waren zum Zeitpunkt ihrer letzten klinischen Untersuchung am Leben, darunter auch 60 tumorfreie Patienten. Das durchschnittliche krankheitsspezifische Überleben war für Adenokarzinome 25,1 Monate (95% CI: 19.9-30,3) und für Plattenepithelkarzinome 22,3 Monate (95% CI: 7,6-6,9). Das Überleben korrelierte signifikant mit dem pT-Status (p=0.0086 bei Plattenepithelkarzinomen, Grafik 1; p<0,0001 bei Adenokarzinomen, Grafik 2), pN-Status (p<0,0001), pM-Status (p<0,0001), UICC-Stadium (p<0,0001) und mit dem histologischen Grad (Grad 2 versus 3: p=0.0474) aber nicht mit der Tumorart.

### Grafik 1. Kaplan Meier Analyse für das T-Stadium in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (p=0,0086)



**Grafik 1.** Das Überleben korrelierte signifikant mit dem pT-Status in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (p=0,0086).

Grafik 2. Kaplan Meier Analyse für das T-Stadium in Adenokarzinomen des Ösophagus (p<0,0001)



**Grafik 2.** Das Überleben korrelierte signifikant mit dem pT-Status in Adenokarzinomen des Ösophagus (p<0,0001).

### **3.1.1.** Technische Aspekte der CCND1 FISH- und immunhistochemischen Untersuchung

Insgesamt waren 285 Primärtumoren, 106 Lymphknotenmetastasen und 38 Fernmetastasen in der FISH-Analyse auswertbar (87,2%; 429/492). Über die übrigen 63 Spots konnte aufgrund von fehlendem Gewebe/Tumorzellen oder schlechter Hybridisierung keine Aussage gemacht werden.

Nur ein TMA-Schnitt wurde zwecks FISH-Analyse hybridisiert. Es wurden keine weiteren Versuche vorgenommen, um die Anzahl der auswertbaren Fälle durch zusätzliche Experimente zu erhöhen, da die Anzahl der auswertbaren Fälle zum Zweck dieser Studie als groß genug betrachtet worden ist.

Abbildung 8. Beispiel eines nicht amplifizierten Tumors (FISH)

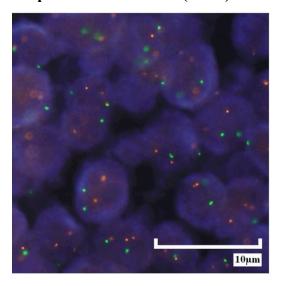
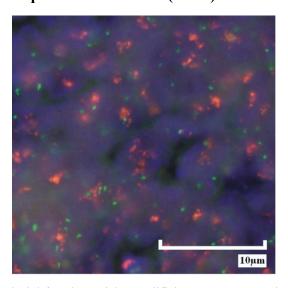


Abbildung 9. Beispiel eines amplifizierten Tumors (FISH)



**Abbildung 8 und 9.** In Abbildung 8 sieht man ein Beispiel für einen nicht amplifizierten Tumor: zwei Centromer 11 Signale (grün) bei gleichzeitigem Vorhandensein von zwei CCND1 Gen Signalen (rot). In Abbildung 9 sieht man ein Beispiel für einen amplifizierten Tumor: zwei Centromer 11 Signale (grün) bei gleichzeitigem Vorhandensein von einem Cluster an CCND1 Gen Signalen (rot).

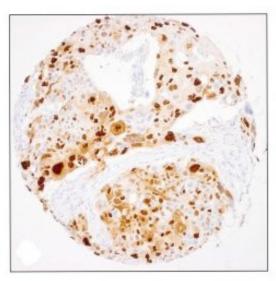
In der immunhistochemischen Untersuchung waren 279 Primärtumoren, 109 Lymphknotenmetastasen und 41 Fernmetastasen auswertbar (87,2%; 429/492), während 63 der Gewebespots aufgrund von nicht eindeutigem Vorhandensein von Tumorzellen nicht auswertbar waren.

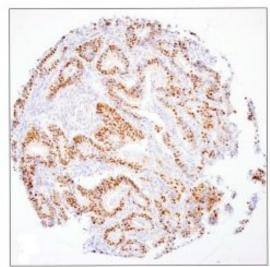
116 primäre Adenokarzinome und 151 primäre Plattenepithelkarzinome waren sowohl in der FISH-Analyse als auch in der immunhistochemischen Untersuchung auswertbar.

Im Kontrollgewebe waren weder in der FISH-Analyse noch in der immunhistochemischen Untersuchung CCND1-Amplifikationen bzw. Cyclin D1-Überexpressionen nachweisbar.

Abbildung 10. Beispiel eines Plattenepithelkarzinoms (IHC)

Abbildung 11. Beispiel eines Adenokarzinoms (IHC)





**Abbildung 10 und 11.** In Abbildung 10 sieht man ein Beispiel für eine positive Immunhistochemie in einem Plattenepithelkarzinom und in Abbildung 11 ein Beispiel für eine positive Immunhistochemie in einem Adenokarzinom.

### **3.2.** CCND1 in Primärtumoren

Die Häufigkeit und die Art der CCND1-Alterationen unterscheiden sich in Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen wesentlich. In (Tabelle 5 und 7) Plattenepithelkarzinomen waren Amplifikationen Überexpressionen viel häufiger als in Adenokarzinomen (Tabelle 6 und 8). Zwischen Amplifikationen des CCND1 Gens und Cyclin D1-Überexpression gab es in beiden Tumortypen eine starke Assoziation (Plattenepithelkarzinome: p<0,0001, Grafik 3; Adenokarzinome: p=0,0078, Grafik 4). Alle amplifizierten Karzinome zeigten zumindest eine geringe nukleäre Positivität in der entsprechenden Immunhistochemie. Allerdings zeigten auch 72,5% der nicht amplifizierten Plattenepithelkarzinome und 68,9% der nicht amplifizierten Adenokarzinome eine mit unserem Protokoll nachweisbare Expression von Cyclin D1 in der Immunhistochemie. Häufigkeit und Intensität waren jedoch geringer als in den amplifizierten Tumoren.

Tabelle 5. CCND1-Amplifikationsstatus in Primärtumoren, Lymphknoten- und Fernmetastasen in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

			CCND1-FISH				
Gewebe	n	normal (%)	Zugewinn (%)	amplifiziert (%)	p-Wert		
Primärtumor	158	41,1	5,1	53,8			
LK-Metastasen	48	33,3	4,2	62,5	0,6872		
Fernmetastasen	10	50,0	10,0	40,0			

**Tabelle 5.** CCND1-Amplifikationsstatus in Primärtumoren (n=158), Lymphknoten- und Fernmetastasen (n=48 bzw. n=10) in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus.

Tabelle 6. CCND1-Amplifikationsstatus in Primärtumoren, Lymphknoten- und Fernmetastasen in Adenokarzinomen des Ösophagus

			CCND1-FISH				
Gewebe	n	normal (%)	Zugewinn (%)	amplifiziert (%)	p-Wert		
Primärtumor	121	87,6	1,7	10,7			
LK-Metastasen	53	77,4	3,8	18,9	0,3986		
Fernmetastasen	27	85,2	0,0	14,8			

**Tabelle 6.** CCND1-Amplifikationsstatus in Primärtumoren (n=121), Lymphknoten- und Fernmetastasen (n=53 bzw. n=27) in Adenokarzinomen des Ösophagus.

Tabelle 7. Cyclin D1-Expression in Primärtumoren, Lymphknoten- und Fernmetastasen in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

Gewebe	n		p-Wert			
Gewebe	11	negativ	schwach	mäßig	Stark	p were
Primärtumor	154	12.34	27.27	16.88	43.51	
LK-Metastasen	51	13.73	25.49	13.73	47.06	0,4232
Fernmetastasen	14	35.71	14.29	21.43	28.57	

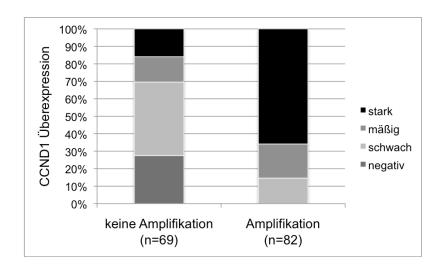
**Tabelle 7.** Cyclin D1-Expression in Primärtumoren (n=154), Lymphknoten- und Fernmetastasen (n=51 bzw. n=14) in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus.

Tabelle 8. CCND1-Expression in Primärtumoren, Lymphknoten- und Fernmetastasen in Adenokarzinomen des Ösophagus

Gewebe	n		CCND1-Expression				
Gewese	n	negativ	schwach	mäßig	stark	p-Wert	
Primärtumor	120	28.33	37.5	15.83	18.33		
LK-Metastasen	52	26.92	28.85	13.46	30.77	0,0564	
Fernmetastasen	27	25.93	11.11	22.22	40.74		

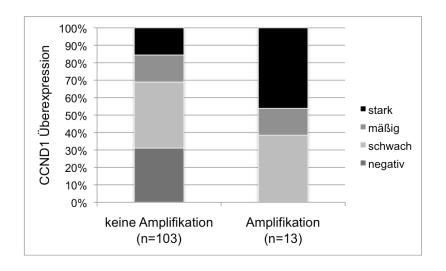
**Tabelle 8.** Cyclin D1-Expression in Primärtumoren (n=120), Lymphknoten- und Fernmetastasen (n=52 bzw. 27) in Adenokarzinomen des Ösophagus.

# Grafik 3. Vergleich des CCND1-Amplifikationsstatus mit dem immunhistochemischen Nachweis einer Cyclin D1-Expression in Primärtumoren des Ösophagus (Plattenepithelkarzinome; p<0,0001)



**Grafik 3.** Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen CCND1-Amplifikationsstatus und Cyclin D1-Expression in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (p<0,0001). Alle amplifizierten Plattenepithelkarzinome zeigten wenn auch nur eine geringe Positivität in der IHC.

## Grafik 4. Vergleich des CCND1-Amplifikationsstatus mit dem immunhistochemischen Nachweis einer Cyclin D1-Expression in Primärtumoren des Ösophagus (Adenokarzinomen; p=0,0078)



**Grafik 4.** Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen CCND1-Amplifikationsstatus und Cyclin D1-Expression in Adenokarzinomen des Ösophagus (p=0,0078). Alle amplifizierten Adenokarzinome zeigten wenn auch nur eine geringe Positivität in der IHC.

Die Beziehung von CCND1-Alterationen zum Differenzierungsgrand und Stadium ist für Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome in Tabelle 9+10 bzw. Tabelle 11+12 dargestellt. Es fand sich nur eine geringe Assoziation zwischen CCND1-Alterationen und Tumorphänotyp in den Immunhistologie- und FISH-Befunden. Dabei fand sich in der FISH-Untersuchung in Plattenepithelkarzinomen ein Zusammenhang mit dem pM-und UICC-Status (p= 0.0407 bzw. p= 0.0336).

Der Zusammenhang zwischen Prognose und Amplifikationsstatus in der FISH-Untersuchung (p=0,0293) und zwischen Prognose und Überexpression in der immunhistochemischen Untersuchung (p=0,0406) war bei Adenokarzinomen statistisch signifikant, bei Plattenepithelkarzinomen konnte ein derartiger Zusammenhang weder in der FISH-Untersuchung (p=0,4522), noch in der immunhistochemischen Untersuchung (p=0,3179) gezeigt werden.

Tabelle 9. CCND1-Alterationen (Immunhistochemie) in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus in Zusammenhang zum Tumorphänotyp

	N	n	negativ	Schwach	mäßig	stark	p- Wert
		auswertbar	(%)	(%)	(%)	(%)	
pT							
1	24	22	22,7	22,7	18,2	36,4	
2	39	36	11,1	33,3	13,9	41,7	0.739
3	89	84	11,9	25	17,9	45,2	
4	11	11	0	27,3	18,2	54,6	
pN							
pN0	67	62	16,1	32,3	19,4	32,3	0.132
pN+	94	92	9,8	23,9	15,2	51,1	
pM							
pM0	142	133	12,8	26,3	16,5	44,4	0.789
pM1	20	20	10	35	20	35	
Tumorgrad							
1	4	4	25	0	25	50	
2	113	106	10,4	30,2	19,8	39,6	0.295
3	45	43	14	23,3	9,3	53,5	
UICC							
Status							
1	19	17	23,5	23,5	17,7	35,3	
2	63	58	12,1	34,5	19	34,5	0.055
3	53	51	15,7	15,7	17,7	51	
4	27	27	0	37	11,1	51,9	

**Tabelle 9.** Es zeigt sich kein Zusammenhang zwischen Cyclin D1-Expression und Tumorphänotyp (pT-, pN-, pM-, UICC-Status und Tumorgrad) in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus.

Tabelle 10. CCND1-Alterationen (FISH) in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus in Zusammenhang zum Tumorphänotyp

	N	n	normal	Zugewinn	amplifiziert	p- Wert
		auswertbar				
pT						
1	24	23	52,2	13	34,8	
2	39	37	35,1	2,7	62,2	0.1646
3	89	87	37,9	3,5	58,6	
4	11	10	60	10	30	
pN						
pN0	67	65	46,2	9,2	44,6	0.2031
pN+	94	92	37	2,2	60,9	
pM						
pM0	142	139	38,9	5,8	55,4	0.0407
pM1	20	18	55,6	0	44,4	
Tumorgrad						
1	4	4	25	0	75	
2	113	110	39,1	4,6	56,4	0.1906
3	45	43	46,5	7	46,5	
UICC						
Status						
1	19	18	55,6	16,7	27,8	
2	63	61	41	4,9	54,1	
3	53	53	35,9	0	64,2	0.0336
4	27	25	40	8	52	

**Tabelle 10.** Es findet sich ein Zusammenhang zwischen CCND1-Amplifikation und pM-Status (p=0,0407) bzw. UICC-Status (p=0,0336) in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus.

Tabelle 11. CCND1-Alterationen (Immunhistochemie) in Adenokarzinomen des Ösophagus in Zusammenhang zum Tumorphänotyp

	N	n	negativ	schwach	mäßig	stark	p-
		auswertbar	(%)	(%)	(%)	(%)	Wert
pT							
1	24	22	36,4	27,3	18,2	18,2	
2	46	42	26,2	35,7	21,4	16,7	0.861
3	55	52	26,9	42,3	11,5	19,2	
4	4	4	25	50	0	25	
pN							
pN0	34	30	36,7	33,3	20	10	0.364
pN+	94	89	25,8	38,2	14,6	21,4	
pM							
pM0	96	89	30,3	34,8	15,7	19,1	0.739
pM1	33	31	22,6	45,2	16,1	16,1	
Tumorgrad							
1	1	1	0	0	0	100	0.569
2	50	44	34,1	36,4	15,9	13,6	
3	77	74	25,7	37,8	16,2	20,3	
UICC							
Status							
1	24	22	36,4	31,8	22,7	9,1	
2	39	35	31,4	34,3	17,1	17,1	0.713
3	34	32	25	37,5	9,4	28,1	
4	32	31	22,6	45,2	16,1	16,1	

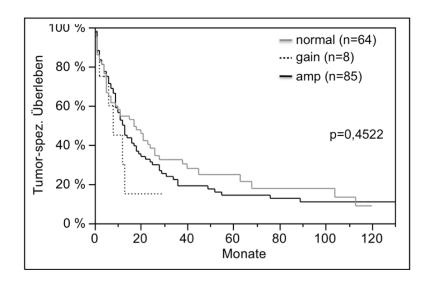
**Tabelle 11.** Es zeigt sich kein Zusammenhang zwischen Cyclin D1-Expression und Tumorphänotyp (pT-, pN-, pM-, UICC-Status und Tumorgrad) in Adenokarzinomen des Ösophagus.

Tabelle 12. CCND1-Alterationen (FISH) in Adenokarzinomen des Ösophagus in Zusammenhang zum Tumorphänotyp

	N	n	normal	Zugewinn	amplifiziert	p- Wert
		auswertbar				
pT						
1	24	23	91,3	0	8,7	
2	46	42	90,5	0	9,5	0.5422
3	55	52	82,7	3,9	13,5	
4	4	4	100	0	0	
pN						
pN0	34	32	90,6	0	9,4	0.5023
pN+	94	88	86,4	2,3	11,4	
pM						
pM0	96	89	85,4	2,3	12,4	0.3121
pM1	33	32	93,8	0	6,3	
Tumorgrad						
1	1	1	100	0	0	
2	50	46	89,1	0	10,9	0.6901
3	77	73	86,3	2,7	11	
UICC						
Status						
1	24	23	91,3	0	8,7	
2	39	35	85,7	0	14,3	0.338
3	34	32	81,3	6,3	12,5	
4	32	31	93,6	0	6,5	

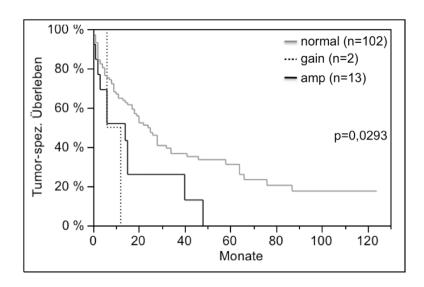
**Tabelle 12.** Es zeigt sich kein Zusammenhang zwischen CCND1-Amplifikation und Tumorphänotyp (pT-, pN-, pM-, UICC-Status und Tumorgrad) in Adenokarzinomen des Ösophagus.

Grafik 5. Kaplan Meier Analyse für CCND1-Amplifikationen in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (CCND1 amplifiziert vs. normal: p=0,4708)



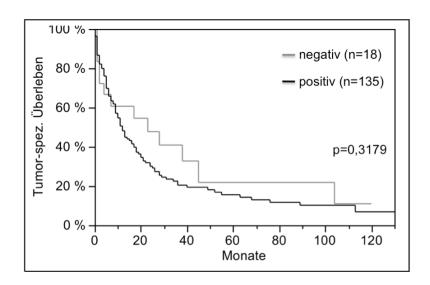
**Grafik 5.** Der Zusammenhang zwischen CCND1-Amplifikationsstatus und tumorspezifischem Überleben ist nicht signifikant (p=0,4522 bzw. p=0,4708- amplifiziert vs. normal) in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus.

### Grafik 6. Kaplan Meier Analyse für CCND1-Amplifikationen in Adenokarzinomen des Ösophagus (CCND1 amplifiziert vs. normal p=0,0241)



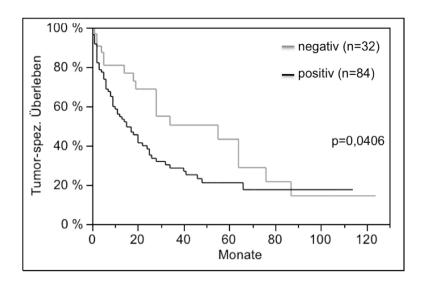
**Grafik 6.** Der Zusammenhang zwischen CCND1-Amplifikationsstatus und tumorspezifischem Überleben ist statistisch signifikant (p=0,0293 bzw. p=0,0241- amplifiziert vs. normal) in Adenokarzinomen des Ösophagus.

## Grafik 7. Kaplan Meier Analyse für die Cyclin D1-Expression in Plattenepithelkarzinomen (p=0,3179)



**Grafik 7.** Der Zusammenhang zwischen Cyclin D1-Expression und tumorspezifischem Überleben ist nicht signifikant (p=0,3179) in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus.

### Grafik 8. Kaplan Meier Analyse für die Cyclin D1-Expression in Adenokarzinomen (p=0,0406)



**Grafik 8.** Der Zusammenhang zwischen Cyclin D1-Expression und tumorspezifischem Überleben ist statistisch signifikant (p=0,0406) in Adenokarzinomen des Ösophagus.

#### **3.3.** CCND1 in Metastasen

Der CCND1 Status in Lymphknoten- und Fernmetastasen war stark assoziiert mit den Ergebnissen in den Primärtumoren. In der FISH-Untersuchung stimmten 91 der 99 analysierten Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen-Paare (p<0,0001; Tabelle 13) und 27 der 30 analysierten Primärtumoren und Fernmetastasen Paare (p<0,0001; Tabelle 14) überein. Alle diskrepanten Fälle wurden mittels FISH an einem Großflächenschnitt verifiziert.

Bei 25 Patienten (Adenokarzinome: n=18; Plattenepithelkarzinome: n=7) konnten sowohl der Primärtumor als auch die entsprechende Lymphknoten- und Fernmetastase beurteilt werden. In Adenokarzinomen gab es eine komplette Übereinstimmung bei 17 Patienten (83%) und in Plattenepithelkarzinomen bei 4 Patienten (71%). Sowohl in Adenokarzinomen als auch in Plattenepithelkarzinomen gab es je einen Patienten mit Amplifikation der Lymphknoten- und Fernmetastase jedoch nicht des Primärtumors. Ein Patient mit einem Plattenepithelkarzinom zeigte eine Amplifikation im Primärtumor jedoch keine Amplifikation weder in der Lymphknoten- noch in der Fernmetastase und ein anderer Patient zeigte im Lymphknoten einen Zugewinn, jedoch nicht im Primärtumor und der Fernmetastase. Diese drei Fälle wurden ebenfalls durch eine FISH-Analyse an einem Großflächenschnitt verifiziert.

Tabelle 13. Vergleich der CCND1-FISH Analyse von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen des Ösophaguskarzinoms

		Lym	p Wert		
		normal	Zugewinn	amplifiziert	p weit
or	Normal	54	3	2	
Primärtumor	Zugewinn	2	1	0	<0,0001
Pri	amplifiziert	0	1	36	

**Tabelle 13.** Es findet sich ein signifikanter (p<0,0001) Zusammenhang zwischen CCND1-FISH-Ergebnissen in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen des Ösophaguskarzinoms. Es ist eine Übereinstimmung in 91 von 99 analysierten Paaren zu finden.

Tabelle 14. Vergleich der CCND1-FISH von Primärtumoren und Fernmetastasen des Ösophaguskarzinoms

			Metastasen				
		Normal	Zugewinn	Amplifiziert	p Wert		
or	Normal	23	0	2			
Primärtumor	Zugewinn	0	0	0	<0,0001		
Pri	amplifiziert	0	1	4			

**Tabelle 14.** Es findet sich ein signifikanter (p<0,0001) Zusammenhang zwischen CCND1-FISH-Ergebnissen in Primärtumoren und Fernmetastasen des Ösophaguskarzinoms. Es ist eine Übereinstimmung in 27 von 30 analysierten Paaren zu finden.

Die Übereinstimmung einer Cyclin D1-Expression (mittels Immunhistochemie) zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen war statistisch signifikant (p=0,0002), zwischen Primärtumoren und Fernmetastasen war dieser Zusammenhang nicht signifikant (p=0,4140).

Tabelle 15. Vergleich der Cyclin D1-Immunhistochemie von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen des Ösophaguskarzinoms (alle Tumoren)

			p Wert			
		negativ	schwach	mäßig	Stark	p were
	negativ	8	5	2	0	
tumor	schwach	4	12	4	10	0,0002
Primärtumor	mäßig	4	3	0	9	0,0002
	stark	4	9	8	22	

**Tabelle 15.** Es zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Cyclin D1-Expression in Primärtumoren (alle Tumoren) und Lymphknotenmetastasen (p=0,0002).

Tabelle 16. Vergleich der Cyclin D1-Immunhistochemie von Primärtumoren und Fernmetastasen des Ösophaguskarzinoms

			p Wert			
		negativ	schwach	mäßig	stark	p weit
	negativ	2	1	1	3	
tumor	schwach	5	3	3	6	0,4140
Primärtumor	mäßig	2	0	1	1	0,4140
	stark	0	0	1	5	

**Tabelle 16.** Der Zusammenhang zwischen Cyclin D1-Expression in Primärtumoren (alle Tumoren) und Fernmetastasen war nicht signifikant (p=0,4140).

#### 4. Diskussion

der Studie wurde die TMA-Methode zur Untersuchung von CCND1-Amplifikationen und Cyclin D1-Expression bei Ösophaguskarzinomen und ihren Metastasen verwendet. Das TMA-Verfahren erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von hunderten von Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger (Bubendorf et al. 2001). Das Verfahren hat aber den Nachteil, dass pro Tumor nur sehr geringe Gewebemengen untersucht werden (jeweils ein Gewebefragment mit einem Durchmesser von 0,6 mm). Es wurde deswegen lange diskutiert, ob die TMA-Methode für den Nachweis statistischer Zusammenhänge zwischen molekularen Veränderungen Tumorphänotyp oder Prognose geeignet ist. Zahlreiche Studien haben in den letzten Jahren allerdings gezeigt, dass das TMA-Verfahren für solche Anwendungen hochgradig geeignet ist. Studien mit genügend großen Tumorkollektiven haben alle etablierten Zusammenhänge zwischen molekularen Parametern und klinischen bzw. pathologischen Parametern bestätigt. So wurde beim Mammakarzinom die Beziehung zwischen Amplifikationen von HER2/neu , Cyclin D1, Myc mit Tumorphänotyp oder Prognose (Al-Kuraya et al. 2004) ebenso bestätigt wie gleichartige Beziehungen mit immunhistochemisch nachgewiesenen Parametern, wie Östrogen- und Progesteronoder Ki67-Labeling-Index al. Rezeptor-Expression (Ruiz et 2006). Nierenkarzinomen konnten Beziehungen zwischen Vimentin-Expression und Prognose an Tissue-Micro-Arrays bestätigt werden (Moch et al. 1999), bei Harnblasenkarzinomen Beziehungen von Tumorzellproliferationen (Ki67-Labeling-Index), p53-Status und Differenzierungsgrad mit Prognose am TMA bestätigt werden (Moch et al. 1993, Nocito et al. 2001). An einem am Institut für Pathologie des Universtitätsklinikums Eppendorf hergestelltem Prostatakarzinom-TMA konnten Hamburg signifikante Beziehungen zwischen der Expression von HER2/neu bzw. EGFR und der Prognose bei Prostatakarzinomen an TMAs gezeigt werden (Minner et al. 2010, Schlomm et al. 2007).

Unsere Untersuchung an Primärtumoren des Ösophagus ergab zunächst eine deutlich größere Häufigkeit von CCND1-Amplifikationen und immunhistochemischer Nachweisbarkeit von Cyclin D1 in Plattenepithelkarzinomen als bei Adenokarzinomen. Dieser Zusammenhang ist in der Literatur gut bekannt. Mehrere frühere Studien hatten ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen

bezüglich Cyclin D1-Veränderungen gefunden. Zum Beispiel konnte in einer Studie mit 44 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom und 11 Patienten mit einem in 54% der Plattenepithelkarzinome und bei keinem der Adenokarzinom Adenokarzinome eine CCND1-Amplifikation gezeigt werden (Adelaide et al. 1995). In einer anderen Studie mit 19 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom und 26 Patienten mit einem Adenokarzinom konnte eine CCND1-Amplifikation in 26% der Plattenepithelkarzinome aber nur in 8% der Adenokarzinome gezeigt werden, was jedoch nicht statistisch signifikant war (Morgan et al. 1999). Auch die Mehrzahl der immunhistochemischen Studien welche Adeno- und Plattenepithelkarzinome untersucht haben, konnten einen Unterschied zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen finden. Dabei fand eine Gruppe (Arber et al. 1999) eine nachweisbare Cyclin D1-Expression bei 71% ihrer 17 Plattenepithelkarzinome aber nur bei 64% ihrer 22 Adenokarzinome; eine andere Gruppe (Morgan et al. 1999) fand im Gegensatz dazu eine Cyclin D1-Expression in 32% ihrer 26 untersuchten Adenokarzinome und nur in 11% ihrer untersuchten Plattenepithelkarzinome. Auffallend sind hier auch die sehr großen Häufigkeitsunterschiede zwischen den Studien. Derartig diskrepante Resultate sind durch methodische Unterschiede aber ohne weiteres zu erklären. Die Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen hängen sehr stark von der Auswahl der Antikörper, der Färbebedingungen und auch von den Auswertungsverfahren ab. In einer kürzlichen Studie an Prostatakarzinomen hatten wir an unserem TMA mit mehr als 3200 Prostatakarzinomen eine p53-Positivität in 2,5% der Fälle gesehen und einen starken prognostischen Effekt dieser so gemessenen p53-Positivität gefunden. Durch Anpassungen des p53-Immunhistochemieprotokolles war es am gleichen Kollektiv auch möglich mehr als 98% positive Fälle zu finden (Schlomm et al. 2008) wobei bei einem derartig sensitiven Protokoll natürlich keine signifikanten Prognoseunterschiede mehr auffindbar waren (G. Sauter, persönliche Mitteilung).

Die Möglichkeit aus methodischen Gründen zu unterschiedlichen Resultaten zu kommen ist für die FISH-Untersuchung naturgemäß viel kleiner als bei der Immunhistochemie. Es wunderte deswegen nicht, dass die von uns gefundenen Häufigkeiten von Amplifikationen sich nur wenig von den Resultaten früherer Studien unterschieden. In unserer Studie haben wir in 53,8% (85/158) der Plattenepithelkarzinome und in 11% (13/121) der Adenokarzinome eine Amplifikation gefunden. Die entsprechenden Daten der Literatur reichen bei Plattenepithelkarzinomen von 23%-65% (Adelaide et al. 1995, Bizari et al. 2006, Inomata et al. 1998, Morgan et

al. 1999, Naitoh et al. 1995, Sheyn et al. 1997, Shimada et al. 1997, Shinozaki et al. 1996, Sunpawerayong et al. 2005) und in Adenokarzinomen von 7%-8% (Miller et al. 2003, Morgan et al. 1999). Die Spanne von Cyclin D1-Positivitäten welche immunhistochemisch gefunden wurde ist naturgemäß viel größer. Sie reicht von 11-75% bei Plattenepithelkarzinomen (Arber et al. 1999, Bizari et al. 2006, Chang et al. 2005, Guner et al. 2003, Ikeda et al. 1999, Ikeguchi et al. 2001, Inomata et al. 1998, Ishikawa et al. 1998, Itami et al. 1999, Lin et al. 2004, Mathew et al. 2002, Matsumoto et al. 1999, Morgan et al. 1999, Nagasawa et al. 2001, Naitoh et al. 1995, Sarbia et al. 1999, Sheyn et al. 1997, Shinozaki et al. 1996, Sunpaweravong et al. 2005, Takeuchi et al. 1997, Toyoda et al. 2000) und von 32-64 % bei Adenokarzinomen (Arber et al. 1999, Langer et al. 2006, Morgan et al. 1999). Unsere Werte von 68,8% bei Adenokarzinomen und 85,3% bei Plattenepithelkarzinomen liegen im höheren Bereich dieser Untersuchungen. Dieser Befund macht deutlich, dass die Verwendung von Tissue-Micro-Arrays nicht zu einem Verpassen einer relevanten Anzahl positiver Fälle in unserer Studie geführt haben dürfte. Insgesamt 285 Primärtumoren (280 mit Verlaufsdaten) wurden in unserer Analyse untersucht. Im Vergleich zu der Literatur ist das die größte Anzahl. Lediglich sechs weitere Studien, welche die Beziehung zwischen CCND1-Veränderungen und der Patientenprognose untersucht hatten, hatten mehr als 100 Fälle (n=122, n=156, n=118, n=111, n=137, n=210; Chang et al. 2005, Itami et al. 1999, Langer et al. 2006, Sarbia et al. 1999, Shinozaki et al. 1996, Takeuchi et al. 1997). Einige Studien konnten dabei einen signifikanten Zusammenhang von CCND1-Amplifikationen oder vermehrter Cyclin D1-Expression mit dem klinischen Verlauf finden (Itami et al. 1999, Sarbia et al. 1999, Shinozaki et al. 1996); andere Studien konnten dies nicht zeigen (Adelaide et al. 1995, Chang et al. 2005, Ikeda et al. 1999, Langer et al. 2006, Sunpaweravong et al. 2005). Wir konnten einen derartigen Zusammenhang sowohl in der FISH- als auch immunhistochemischen Untersuchung nur in Adenokarzinomen (p=0,0293 und p=0,0406 entsprechend), jedoch nicht in Plattenepithelkarzinomen (p=0,4522 und p=0,3179 entsprechend) finden. Die Beziehung zu einem malignen Phänotyp scheint insgesamt eher eine schwache zu sein. Wir konnten in unserer Studie nur bei Plattenepithelkarzinomen (FISH-Untersuchung) einen Zusammenhang zum pM-Status (p=0,0407) und UICC-Status (p=0,0336) finden. Alle anderen Untersuchungen sowohl an Platten- als auch an Adenokarzinomen lieferten keine weiteren Zusammenhänge. Mehrere andere Autoren fanden diesbezüglich ähnliche Resultate; in einer Studie (n=210 Tumoren) fand sich keine

signifikante Assoziation mit dem pT-Stadium (Sarbia et al. 1999); in einer weiteren Studie (n=22 Tumoren) konnte trotz signifikanter Assoziation mit der Prognose keine Korrelation zum Vorliegen von Lymphknotenmetastasen gezeigt werden (Shinozaki et al. 1996).

Der hoch signifikante Zusammenhang zwischen Cyclin D1-Expression und Amplifikation in unserer Untersuchung, welcher sowohl bei Adeno- wie auch bei Plattenepithelkarzinomen nachweisbar war, ist immerhin auch eine indirekte Validierung beider Methoden. Bei grob falsch gewähltem Immumhistochemieprotokoll mit irrelevanten immunhistochemischen Daten wäre ein solcher Zusammenhang nicht zu erwarten.

Insgesamt liefern die Ergebnisse unserer Untersuchung somit bezüglich Beziehungen zum Tumorphänotyp und Prognose keine wegweisenden neuen Informationen. Hauptzweck der durchgeführten Studie war auch nicht die weitere Erforschung der prognostischen Bedeutung von Cyclin D1-Veränderungen sondern die Untersuchung der Heterogenität solcher Veränderungen, insbesondere zwischen Primärtumoren und Metastasen. Dieser Aspekt erschien uns bedeutend, da mittlerweile Medikamente erprobt werden, welche direkt Cyclin D1 angreifen und somit bei Cyclin D1 positiven Tumoren einen besonders ausgeprägten zytostatischen Effekt haben sollten. Bei der modernen Krebsmedikamenten, welche Anwendung von eine spezifische Genveränderung attackieren ist es wichtig zu wissen, ob die Zielgenveränderung auch in der gesamten Tumormasse vorliegt. Da der Primärtumor in der Regel chirurgisch entfernt und danach auf der molekularen Ebene untersucht wird, stützt sich die Indikationsstellung für eine genspezifische Krebstherapie ausschließlich auf die Befunde in Primärtumoren, während dessen durch die Therapie im Patienten verbleibende Metastasen attackiert werden sollen. Um zu klären in wie weit die Befunde in Primärtumoren und Metastasen identisch sind, wurden 99 Paare von Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen und 30 Paare von Primärtumoren und Fernmetastasen untersucht, davon auch 25 Patienten von denen Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen vorlagen. Die FISH-Analyse von Primärtumoren und zugehörigen Metastasen ergab eine sehr hohe Übereinstimmung der Befunde in Primärtumoren und Metastasen. Nur bei ca. 10% der Fälle lag eine Diskrepanz vor, welche in allen Fällen durch die zusätzliche Untersuchung von Großschnitten bestätigt wurde. Die Übereinstimmung mit den Großschnitten macht darüber hinaus die hohe Zuverlässigkeit der FISH-Untersuchung für molekulare

Analysen deutlich. Deutlich weniger ausgeprägt war die Übereinstimmung bei der immunhistochemischen Untersuchung. Wir interpretieren dieses eher enttäuschende Resultat wiederum als Folge von "Immunhistochemieproblemen". Dabei ist auch zu beachten, dass Metastasen und Primärtumoren typischerweise in verschiedenen Gefäßen ans pathologische Institut geschickt werden und dementsprechend uneinheitlich fixiert werden. Ein häufiges Problem ist hierbei eine zu geringe Formalingmenge, welche großen chirurgischen Präparaten (z.B. Ösophagektomiepräparaten) beigefügt wird. Um eine zu große Verdünnung des Formalins durch "Gewebesäfte" zu verhindern, sollte jedem eingesandten Gewebe mindestens die zehnfache Volumenmenge an Formalin beigefügt werden. Insgesamt ist es schwer vorstellbar, dass sich der CCND1-Amplifikationsstatus zwischen Primärtumoren und Metastasen kaum unterscheidet, dass aber fast regelhaft signifikante Expressionsunterschiede vorliegen. Gegen eine derartige Annahme spricht auch die Tatsache, dass in Metastasen die Cyclin D1-Anfärbung statistisch gesehen genauso häufig stark ausgeprägt ist wie in Primärtumoren. Dies spricht gegen eine systematisch in Metastasen gesteigerte oder verminderte Expression. In der Literatur konnten wir nur eine weitere Studie finden, die Primärtumoren und Metastasen von Ösophagus-Karzinomen bezüglich ihres Cyclin D1-Status untersucht haben. Dabei hatten Gramlich et al 45 primäre Plattenepithelkarzinome und 12 Lymphknotenmetastasen mittels PCR untersucht. Von den 45 Primärtumoren zeigten 10 eine Amplifikation (22%) und von den 12 Lymphknotenmetastasen zeigten 3 (25%) eine Amplifikation. Von den 10 Patienten mit amplifizierten Tumoren zeigten 7 Lymphknotenmetastasen, von denen wiederum 5 der Untersuchung zur Verfügung standen; 3 davon zeigten letzten Endens eine Amplifikation. Die Ursache der deutlich größeren Diskrepanz in dieser Studie zwischen Amplifikation im Primärtumor und der entsprechenden Lymphknotenmetastase kann auch an der PCR-Methode liegen, wobei nicht zwischen Ergebnissen in metastatischen Karzinomzellen und residualen Lymphozyten im Lymphknoten unterschieden werden kann (Gramlich et al. 1994). Ein wesentlicher Befund unserer Untersuchung ist auch die eklatante Häufigkeit von CCND1-Amplifikationen in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen: 53,8% unserer (85/158) untersuchten Karzinome waren amplifiziert. Diese Zahl ist deutlich größer als bei den meisten anderen Tumorarten. CCND1-Amplifikationen wurden z.B. in 9,6%-30% der Mammakarzinome (Al-Kuraya et al. 2004, Cho et al. 2008a, Elsheikh et al. 2008, Jirstrom et al. 2005, Naidu et al. 2002, Reis-Filho et al. 2006, Roy et al. 2009) und 11%-21% der Harnblasenkarzinome (Bringuier et al. 1996, Proctor et al. 1991, G. Sauter et al. 1993, Schraml et al. 1999) beobachtet. In Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs wurden zum Teil auch ähnlich hohe Amplifikationsraten beobachtet (22%-57%, (Akervall et al. 1997, Davidson et al. 1996, el-Naggar et al. 1995, Jares et al. 1994, Kyomoto et al. 1997, Muller et al. 1994, Nogueira et al. 1998, Xu et al. 1994). Insgesamt sprechen die Befunde unserer Studie dafür, dass Plattenepithelkarzinome des Ösophagus die absolut ideale Indikation für die Erprobung von Cyclin D1-Antagonisten darstellen dürfte. Für die Annahme spricht die exorbitante Häufigkeit von CCND1-Amplifikationen ebenso wie die offenbar hohe Homogenität dieser

molekularen Veränderung in diesem Tumortyp.

Die hohe Häufigkeit von CCND1-Amplifikationen bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus spricht dafür, dass dieses Gen für diesen Tumortyp eine besonders hohe Bedeutung haben muss. Es könnte spekuliert werden, dass eine CCND1-Amplifikation mit einer speziellen Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms in Zusammenhang stehen könnte. Dramatisch ist auch der Unterschied der Häufigkeit von CCND1-Amplifikationen zwischen ösophagealen und anderen Plattenepithelkarzinomen. Bei eigenen FISH-Untersuchungen, bei denen exakt die gleichen Kriterien für die Bewertung der Cyclin D1-Positivität angewandt worden waren, waren CCND1-Amplifikationen bei 10,77% der Plattenepithelkarzinome der Harnblase (Zaharieva et al. 2003), 22,7% der Plattenepithelkarzinome des Larynx, 63,4% der Plattenepithelkarzinome des Oround Hypopharynx 18,4% und Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle gefunden worden. Für eine besondere ätiologische Bedeutung der CCND1-Amplifikationen spricht auch der markante Unterschied in der Häufigkeit dieser Amplifikation zwischen unterschiedlichen Tumoren aus dem HNO-Bereich. Zudem liegen Plattenepithelkarzinome des Ösophagus und der Mundhöhle ja in enger Nachbarschaft und sind beide z.B. mit Nikotinabusus assoziiert. So wurden in einer Studie CCND1-Amplifikationen in 61 von 201 (30,3%) der Karzinome der Mundhöhle, 73 von 147 (49,7%) der Karzinome des Pharynx und 22 von 85 (25,9%) der Karzinome des Larynx gefunden (Freier et al. 2003).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass CCND1-Amplifikationen im Ösophaguskarzinom häufiger vorkommen, vor allem bei Plattenepithelkarzinomen. Die hohe Homogenität der Veränderungen spricht für ein frühes Auftreten der CCND1-Amplifikationen in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und ein hohes Potential als Therapieziel.

### 5. Zusammenfassung

Das CCND1 Gen ist ein potentielles therapeutisches Ziel. Unterschiede von CCND1-Alterationen zwischen Primärtumoren und deren Metastasen sind daher von großem Interesse. Um Unterschiede im CCND1-Status zu finden, wurden 285 Primärtumoren und 144 korrespondierende Metastasen mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz-insitu-Hybridisierung auf CCND1-Alterationen untersucht. Amplifikationen wurden in 53,8% (85/158) der Plattenepithelkarzinome und in 11% (13/121) der Adenokarzinome beobachtet. Bei Plattenepithelkarzinomen konnte ein Zusammenhang zwischen Amplifikationsstatus und pM-Status (p=0,0407) bzw. Amplifikationsstatus und UICC-Status (p=0,0306) gezeigt werden. Es fand sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Überleben in der FISH-Untersuchung in der Gruppe der Adenokarzinome (p=0,0293). Es konnte kein weiterer signifikanter Zusammenhang zwischen CCND1-Alterationen und klinisch-pathologischen Parametern beobachtet. konnten in unserer Studie einen Zusammenhang zwischen CCND1-Amplifikationen und Cyclin D1-Expression sowohl in Plattenepithelkarzinomen (p<0,0001) als auch in Adenokarzinomen (p=0,0078) beobachten. Weiterhin konnten wir einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen CCND1-Amplifikationen in Primärtumoren und Amplifikationen in den entsprechenden Lymphknoten- bzw. Fernmetastasen finden (p<0,0001). Von insgesamt 129 analysierten Paaren fand sich eine Übereinstimmung in 118 Paaren.

Das gehäufte Auftreten von CCND1-Amplifikationen am Ösophagus (insbesondere bei Plattenepithelkarzinomen) und die Homogenität dieser zwischen Primärtumoren und Metastasen sprechen für ein hohes Potential von CCND1 als Therapieziel.

### 6. Abkürzungsverzeichnis

UICC:

A. dest.:	Aqua destillata
amp:	amplifiziert
CEP:	chromosome enumeration probe
CI:	Konfidenzintervall
CT:	Computertomographie
Cdk:	Cyclin abhängige Kinase
DAPI:	4',6- Diamidin-2'- phenylindol- dihydrochlorid
EGFR:	epidemal growth factor receptor
et al:	et alii
FISH:	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
gain:	Zugewinn
HE:	Hämatoxylin- Eosin
HER2:	human epidermal growth factor receptor 2
HCl:	Chlorwasserstoff
IHC:	Immunhistochemie
IGF:	insulin like growth factor
IR:	Inzidenzrate
LK:	Lymphknoten
MR:	Mortalitätsrate
NP 40:	Nonyl Phenoxylpolythoxylethanol
PCR:	Polymerase- Ketten-Reaktion
PET:	Positronen- Emissions- Tomographie
pRb:	Retinoblastom Suppressorprotein
SSC:	Sodium Chloride Sodium Citrate
STAT3:	signal transducer and activator of transcription 3
TGF:	transforming growth factor
Tis:	Tumor in situ
TMA:	tissue micro array
TNM:	Tumor, Lymphknoten (=Nodes), Metastasen
VS.:	versus

Internation Union against cancer

#### 7. Literatur

- Adelaide J, Monges G, Derderian C, Seitz JF, Birnbaum D. Oesophageal cancer and amplification of the human cyclin D gene CCND1/PRAD1. Br J Cancer 1995;71(1):64-8.
- Ahsan H, Neugut AI, Gammon MD. Association of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the esophagus with tobacco-related and other malignancies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1997;6(10):779-82.
- Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, Jin Y, Loftus B, Mertens F, Wennerberg JP. Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. Cancer 1997;79(2):380-9.
- Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zaharieva B, Novotny H, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Kochli O, Zuber M, Dieterich H, Mross F, Wilber K, Simon R, Sauter G. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. Cancer Res 2004;64(23):8534-40.
- Arber N, Gammon MD, Hibshoosh H, Britton JA, Zhang Y, Schonberg JB, Roterdam H, Fabian I, Holt PR, Weinstein IB. Overexpression of cyclin D1 occurs in both squamous carcinomas and adenocarcinomas of the esophagus and in adenocarcinomas of the stomach. Hum Pathol 1999;30(9):1087-92.
- Bible KC, Lensing JL, Nelson SA, Lee YK, Reid JM, Ames MM, Isham CR, Piens J, Rubin SL, Rubin J, Kaufmann SH, Atherton PJ, Sloan JA, Daiss MK, Adjei AA, Erlichman C. Phase 1 trial of flavopiridol combined with cisplatin or carboplatin in patients with advanced malignancies with the assessment of pharmacokinetic and pharmacodynamic end points. Clin Cancer Res 2005;11(16):5935-41.
- Bieche I, Olivi M, Nogues C, Vidaud M, Lidereau R. Prognostic value of CCND1 gene status in sporadic breast tumours, as determined by real-time quantitative PCR assays. Br J Cancer 2002;86(4):580-6.
- Bienvenu F, Gascan H, Coqueret O. Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism. J Biol Chem 2001;276(20):16840-7.
- Bitzer M, Stahl M, Arjumand J, Rees M, Klump B, Heep H, Gabbert HE, Sarbia M. Cmyc gene amplification in different stages of oesophageal squamous cell carcinoma: prognostic value in relation to treatment modality. Anticancer Res 2003;23(2B):1489-93.
- Bizari L, Borim AA, Leite KR, Goncalves Fde T, Cury PM, Tajara EH, Silva AE. Alterations of the CCND1 and HER-2/neu (ERBB2) proteins in esophageal and gastric cancers. Cancer Genet Cytogenet 2006;165(1):41-50.
- Blot WJ. Esophageal cancer trends and risk factors. Semin Oncol 1994;21(4):403-10.
- Boone J, van Hillegersberg R, Offerhaus GJ, van Diest PJ, Borel Rinkes IH, Ten Kate FJ. Targets for molecular therapy in esophageal squamous cell carcinoma: an immunohistochemical analysis. Dis Esophagus 2009;22(6):496-504.
- Bottger T, Dutkowski P, Kirkpatrick CJ, Junginger T. Prognostic significance of tumor ploidy and histomorphological parameters in adenocarcinoma of Barrett's esophagus. Dig Surg 1999;16(3):180-5.
- Bringuier PP, Tamimi Y, Schuuring E, Schalken J. Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification. Oncogene 1996;12(8):1747-53.

- Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Schmid HP, Gasser TC, Jordan P, Mihatsch MJ. Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. J Pathol 1996;178(4):437-41.
- Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. J Pathol 2001;195(1):72-9.
- Carlson B, Lahusen T, Singh S, Loaiza-Perez A, Worland PJ, Pestell R, Albanese C, Sausville EA, Senderowicz AM. Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. Cancer Res 1999;59(18):4634-41.
- Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, Worland PJ. Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. Cancer Res 1996;56(13):2973-8.
- Castellsague X, Munoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolon PA. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. Int J Cancer 2000;88(4):658-64.
- Chang MS, Lee HS, Lee BL, Kim YT, Lee JS, Kim WH. Differential protein expression between esophageal squamous cell carcinoma and dysplasia, and prognostic significance of protein markers. Pathol Res Pract 2005;201(6):417-25.
- Chen X, Yang CS. Esophageal adenocarcinoma: a review and perspectives on the mechanism of carcinogenesis and chemoprevention. Carcinogenesis 2001;22(8):1119-29.
- Cho EY, Choi YL, Han JJ, Kim KM, Oh YL. Expression and amplification of Her2, EGFR and cyclin D1 in breast cancer: immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. Pathol Int 2008a;58(1):17-25.
- Cho EY, Han JJ, Choi YL, Kim KM, Oh YL. Comparison of Her-2, EGFR and cyclin D1 in primary breast cancer and paired metastatic lymph nodes: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. J Korean Med Sci 2008b;23(6):1053-61.
- Chung SM, Kao J, Hyjek E, Chen YT. p53 in esophageal adenocarcinoma: a critical reassessment of mutation frequency and identification of 72Arg as the dominant allele. Int J Oncol 2007;31(6):1351-5.
- Coller HA. What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8(8):667-70.
- Contu SS, Contu PC, Damin DC, Fagundes RB, Bevilacqua F, Rosa AS, Prolla JC, Moreira LF. pRB expression in esophageal mucosa of individuals at high risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. World J Gastroenterol 2007;13(11):1728-31.
- Cook MB, Chow WH, Devesa SS. Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005. Br J Cancer 2009.
- Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, Smith DB, Langley RE, Verma M, Weeden S, Chua YJ, Participants MT. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. N Engl J Med 2006;355(1):11-20.
- Cuny M, Kramar A, Courjal F, Johannsdottir V, Iacopetta B, Fontaine H, Grenier J, Culine S, Theillet C. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. Cancer Res 2000;60(4):1077-83.

- Davidson BJ, Lydiatt WM, Abate MP, Schantz SP, Chaganti RS. Cyclin D1 abnormalities and tobacco exposure in head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck 1996;18(6):512-21.
- Demeester SR. Epidemiology and biology of esophageal cancer. Gastrointest Cancer Res 2009;3(2 Suppl):S2-5.
- Egashira A, Morita M, Kakeji Y, Sadanaga N, Oki E, Honbo T, Ohta M, Maehara Y. p53 gene mutations in esophageal squamous cell carcinoma and their relevance to etiology and pathogenesis: results in Japan and comparisons with other countries. Cancer Sci 2007;98(8):1152-6.
- el-Naggar AK, Steck K, Batsakis JG. Heterogeneity of the proliferative fraction and cyclin D1/CCND1 gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Cytometry 1995;21(1):47-51.
- Elnenaei MO, Jadayel DM, Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Atkinson S, Titley I, Mandala EM, Catovsky D. Cyclin D1 by flow cytometry as a useful tool in the diagnosis of B-cell malignancies. Leuk Res 2001;25(2):115-23.
- Elsheikh S, Green AR, Aleskandarany MA, Grainge M, Paish CE, Lambros MB, Reis-Filho JS, Ellis IO. CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. Breast Cancer Res Treat 2008;109(2):325-35.
- Ewen ME, Lamb J. The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis. Trends Mol Med 2004;10(4):158-62.
- Freier K, Joos S, Flechtenmacher C, Devens F, Benner A, Bosch FX, Lichter P, Hofele C. Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res 2003;63(6):1179-82.
- Gao N, Dai Y, Rahmani M, Dent P, Grant S. Contribution of disruption of the nuclear factor-kappaB pathway to induction of apoptosis in human leukemia cells by histone deacetylase inhibitors and flavopiridol. Mol Pharmacol 2004;66(4):956-63.
- Geh JI. The use of chemoradiotherapy in oesophageal cancer. Eur J Cancer 2002;38(2):300-13.
- Ghadirian P, Vobecky J, Vobecky JS. Factors associated with cancer of the oesophagus: an overview. Cancer Detect Prev 1988;11(3-6):225-34.
- Gibbs JF, Rajput A, Chadha KS, Douglas WG, Hill H, Nwogu C, Nava HR, Sabel MS. The changing profile of esophageal cancer presentation and its implication for diagnosis. J Natl Med Assoc 2007;99(6):620-6.
- Gotoh M, Takiuchi H, Kawabe S, Ohta S, Kii T, Kuwakado S, Katsu K. Epidermal growth factor receptor is a possible predictor of sensitivity to chemoradiotherapy in the primary lesion of esophageal squamous cell carcinoma. Jpn J Clin Oncol 2007;37(9):652-7.
- Gramlich TL, Fritsch CR, Maurer D, Eberle M, Gansler TS. Differential polymerase chain reaction assay of cyclin D1 gene amplification in esophageal carcinoma. Diagn Mol Pathol 1994;3(4):255-9.
- Guner D, Sturm I, Hemmati P, Hermann S, Hauptmann S, Wurm R, Budach V, Dorken B, Lorenz M, Daniel PT. Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. Int J Cancer 2003;103(4):445-54.
- Guo LL, Gao P, Wu YG, Jian WC, Hao CY, Li H, Lin XY. Alteration of cyclin D1 in Chinese patients with breast carcinoma and its correlation with Ki-67, pRb, and p53. Arch Med Res 2007;38(8):846-52.

- Hamilton SR AL. WHO-Classification of Tumours
  Pathology & Genetics of Tumours of the Digestive System 2000; Tumours of the
  Oesophagus: 9-30.
- Han U, Can OI, Han S, Kayhan B, Onal BU. Expressions of p53, VEGF C, p21: could they be used in preoperative evaluation of lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma? Dis Esophagus 2007;20(5):379-85.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100(1):57-70.
- He J, Zhang RG, Zhu D. [Clinical significance of c-myc gene in esophageal squamous cell carcinoma]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 1995;75(2):94-6, 127.
- He Y, Li M, Shang X. [The relationship between p53 mutation and esophageal cancer biological behavior]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 1998;15(1):1-4.
- Hirayama K, Mori S. [Prognostic factors in early esophageal cancer]. Gan To Kagaku Ryoho 1990;17(1):37-45.
- Holscher AH, Bollschweiler E, Bumm R, Bartels H, Hofler H, Siewert JR. Prognostic factors of resected adenocarcinoma of the esophagus. Surgery 1995a;118(5):845-55.
- Holscher AH, Bollschweiler E, Schneider PM, Siewert JR. Prognosis of early esophageal cancer. Comparison between adeno- and squamous cell carcinoma. Cancer 1995b;76(2):178-86.
- Hsia JY, Chen CY, Hsu CP, Shai SE, Yang SS, Chuang CY, Wang PY, Chen JT. Expression of apoptosis-regulating proteins p53, Bcl-2, and Bax in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. Neoplasma 2001;48(6):483-8.
- Ide H, Nakamura T, Hayashi K, Endo T, Kobayashi A, Eguchi R, Hanyu F. Esophageal squamous cell carcinoma: pathology and prognosis. World J Surg 1994;18(3):321-30.
- Ikeda G, Isaji S, Chandra B, Watanabe M, Kawarada Y. Prognostic significance of biologic factors in squamous cell carcinoma of the esophagus. Cancer 1999;86(8):1396-405.
- Ikeguchi M, Unate H, Maeta M, Kaibara N. Detection of telomerase activity in esophageal squamous cell carcinoma and normal esophageal epithelium. Langenbecks Arch Surg 1999;384(6):550-5.
- Ikeguchi M, Sakatani T, Ueta T, Kaibara N. Cyclin D1 expression and retinoblastoma gene protein (pRB) expression in esophageal squamous cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol 2001;127(9):531-6.
- Ilson DH. New developments in the treatment of esophageal cancer. Clin Adv Hematol Oncol 2004;2(2):97-104.
- Imsumran A, Adachi Y, Yamamoto H, Li R, Wang Y, Min Y, Piao W, Nosho K, Arimura Y, Shinomura Y, Hosokawa M, Lee CT, Carbone DP, Imai K. Insulinlike growth factor-I receptor as a marker for prognosis and a therapeutic target in human esophageal squamous cell carcinoma. Carcinogenesis 2007;28(5):947-56.
- Inada S, Koto T, Futami K, Arima S, Iwashita A. Evaluation of malignancy and the prognosis of esophageal cancer based on an immunohistochemical study (p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor). Surg Today 1999;29(6):493-503.
- Inomata M, Uchino S, Tanimura H, Shiraishi N, Adachi Y, Kitano S. Amplification and overexpression of cyclin D1 in aggressive human esophageal cancer. Oncol Rep 1998;5(1):171-6.
- Ishikawa T, Furihata M, Ohtsuki Y, Murakami H, Inoue A, Ogoshi S. Cyclin D1 overexpression related to retinoblastoma protein expression as a prognostic marker in human oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer 1998;77(1):92-7.

- Itami A, Shimada Y, Watanabe G, Imamura M. Prognostic value of p27(Kip1) and CyclinD1 expression in esophageal cancer. Oncology 1999;57(4):311-7.
- Jares P, Fernandez PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G, Nayach I, Traserra J, Cardesa A. PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. Cancer Res 1994;54(17):4813-7.
- Jiang W, Zhang YJ, Kahn SM, Hollstein MC, Santella RM, Lu SH, Harris CC, Montesano R, Weinstein IB. Altered expression of the cyclin D1 and retinoblastoma genes in human esophageal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90(19):9026-30.
- Jirstrom K, Stendahl M, Ryden L, Kronblad A, Bendahl PO, Stal O, Landberg G. Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification. Cancer Res 2005;65(17):8009-16.
- Kalinina T, Bockhorn M, Kaifi JT, Thieltges S, Gungor C, Effenberger KE, Strelow A, Reichelt U, Sauter G, Pantel K, Izbicki JR, Yekebas EF. Insulin-like growth factor-1 receptor as a novel prognostic marker and its implication as a cotarget in the treatment of human adenocarcinoma of the esophagus. Int J Cancer.
- Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. J Clin Oncol 2006;24(14):2137-50.
- Kawahara K, Maekawa T, Okabayashi K, Shiraishi T, Yoshinaga Y, Yoneda S, Hideshima T, Shirakusa T. The number of lymph node metastases influences survival in esophageal cancer. J Surg Oncol 1998;67(3):160-3.
- Kim SG, Hong SJ, Kwon KW, Jung SW, Kim WY, Jung IS, Ko BM, Ryu CB, Kim YS, Moon JH, Kim JO, Cho JY, Lee JS, Lee MS, Shim CS, Kim BS. [The expression of p53, p16, cyclin D1 in esophageal squamous cell carcinoma and esophageal dysplasia]. Korean J Gastroenterol 2006;48(4):269-76.
- Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 2000;96(2):393-7.
- Knudsen KE, Cavenee WK, Arden KC. D-type cyclins complex with the androgen receptor and inhibit its transcriptional transactivation ability. Cancer Res 1999;59(10):2297-301.
- Kodet R, Mrhalova M, Krskova L, Soukup J, Campr V, Neskudla T, Szepe P, Plank L. Mantle cell lymphoma: improved diagnostics using a combined approach of immunohistochemistry and identification of t(11;14)(q13;q32) by polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization. Virchows Arch 2003;442(6):538-47.
- Komori T, Doki Y, Kabuto T, Ishikawa O, Hiratsuka M, Sasaki Y, Ohigashi H, Murata K, Yamada T, Miyashiro I, Mano M, Ishiguro S, Imaoka S. Prognostic significance of the size of cancer nests in metastatic lymph nodes in human esophageal cancers. J Surg Oncol 2003;82(1):19-27.
- Konig A, Schwartz GK, Mohammad RM, Al-Katib A, Gabrilove JL. The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia lines. Blood 1997;90(11):4307-12.
- Korst RJ, Rusch VW, Venkatraman E, Bains MS, Burt ME, Downey RJ, Ginsberg RJ. Proposed revision of the staging classification for esophageal cancer. J Thorac Cardiovasc Surg 1998;115(3):660-69; discussion 669-70.

- Kruse P, Boesby S, Bernstein IT, Andersen IB. Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. Endoscopic and histologic surveillance. Scand J Gastroenterol 1993;28(3):193-6.
- Kunisaki C, Shimada H, Akiyama H, Nomura M, Matsuda G, Ono H. Prognostic factors in esophageal cancer. Hepatogastroenterology 2004;51(57):736-40.
- Kyomoto R, Kumazawa H, Toda Y, Sakaida N, Okamura A, Iwanaga M, Shintaku M, Yamashita T, Hiai H, Fukumoto M. Cyclin-D1-gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein over-expression in human head-and-neck squamous-cell carcinoma. Int J Cancer 1997;74(6):576-81.
- Lagergren J, Bergstrom R, Adami HO, Nyren O. Association between medications that relax the lower esophageal sphincter and risk for esophageal adenocarcinoma. Ann Intern Med 2000;133(3):165-75.
- Lambert R, Hainaut P. The multidisciplinary management of gastrointestinal cancer. Epidemiology of oesophagogastric cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2007;21(6):921-45.
- Langer R, Von Rahden BH, Nahrig J, Von Weyhern C, Reiter R, Feith M, Stein HJ, Siewert JR, Hofler H, Sarbia M. Prognostic significance of expression patterns of c-erbB-2, p53, p16INK4A, p27KIP1, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor in oesophageal adenocarcinoma: a tissue microarray study. J Clin Pathol 2006;59(6):631-4.
- Lerut TE, de Leyn P, Coosemans W, Van Raemdonck D, Cuypers P, Van Cleynenbreughel B. Advanced esophageal carcinoma. World J Surg 1994;18(3):379-87.
- Lin HM, Zhao L, Cheng SY. Cyclin D1 Is a Ligand-independent Co-repressor for Thyroid Hormone Receptors. J Biol Chem 2002;277(32):28733-41.
- Lin L, Hicks D, Xu B, Sigel JE, Bergfeld WF, Montgomery E, Fisher C, Hartke M, Tubbs R, Goldblum JR. Expression profile and molecular genetic regulation of cyclin D1 expression in epithelioid sarcoma. Mod Pathol 2005;18(5):705-9.
- Lin YC, Wu MY, Li DR, Wu XY, Zheng RM. Prognostic and clinicopathological features of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, gamma-catenin and cyclin D1 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. World J Gastroenterol 2004;10(22):3235-9.
- Macfarlane GJ, Macfarlane TV, Lowenfels AB. The influence of alcohol consumption on worldwide trends in mortality from upper aerodigestive tract cancers in men. J Epidemiol Community Health 1996;50(6):636-9.
- Malthaner RA, Collin S, Fenlon D. Preoperative chemotherapy for resectable thoracic esophageal cancer. Cochrane Database Syst Rev 2006;3:CD001556.
- Mariette C, Piessen G, Briez N, Triboulet JP. The number of metastatic lymph nodes and the ratio between metastatic and examined lymph nodes are independent prognostic factors in esophageal cancer regardless of neoadjuvant chemoradiation or lymphadenectomy extent. Ann Surg 2008;247(2):365-71.
- Marx AH, Tharun L, Muth J, Dancau AM, Simon R, Yekebas E, Kaifi JT, Mirlacher M, Brummendorf TH, Bokemeyer C, Izbicki JR, Sauter G. HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. Hum Pathol 2009;40(6):769-77.
- Mathew R, Arora S, Khanna R, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Alterations in p53 and pRb pathways and their prognostic significance in oesophageal cancer. Eur J Cancer 2002;38(6):832-41.
- Matsumoto M, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Comparison of deregulated expression of cyclin D1 and cyclin E with that of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK2 in human oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer 1999;80(1-2):256-61.

- Matsumoto M, Natsugoe S, Nakashima S, Sakamoto F, Okumura H, Sakita H, Baba M, Takao S, Aikou T. Clinical significance of lymph node micrometastasis of pN0 esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Lett 2000;153(1-2):189-97.
- Miller CT, Moy JR, Lin L, Schipper M, Normolle D, Brenner DE, Iannettoni MD, Orringer MB, Beer DG. Gene amplification in esophageal adenocarcinomas and Barrett's with high-grade dysplasia. Clin Cancer Res 2003;9(13):4819-25.
- Minner S, Jessen B, Stiedenroth L, Burandt E, Kollermann J, Mirlacher M, Erbersdobler A, Eichelberg C, Fisch M, Brummendorf TH, Bokemeyer C, Simon R, Steuber T, Graefen M, Huland H, Sauter G, Schlomm T. Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. Clin Cancer Res;16(5):1553-60.
- Moch H, Sauter G, Moore D, Mihatsch MJ, Gudat F, Waldman F. p53 and erbB-2 protein overexpression are associated with early invasion and metastasis in bladder cancer. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1993;423(5):329-34.
- Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. [Identification of prognostic parameters for renal cell carcinoma by cDNA arrays and cell chips]. Verh Dtsch Ges Pathol 1999;83:225-32.
- Moonen L, Ong F, Gallee M, Verheij M, Horenblas S, Hart AA, Bartelink H. Apoptosis, proliferation and p53, cyclin D1, and retinoblastoma gene expression in relation to radiation response in transitional cell carcinoma of the bladder. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001;49(5):1305-10.
- Morgan RJ, Newcomb PV, Hardwick RH, Alderson D. Amplification of cyclin D1 and MDM-2 in oesophageal carcinoma. Eur J Surg Oncol 1999;25(4):364-7.
- Motwani M, Delohery TM, Schwartz GK. Sequential dependent enhancement of caspase activation and apoptosis by flavopiridol on paclitaxel-treated human gastric and breast cancer cells. Clin Cancer Res 1999;5(7):1876-83.
- Motwani M, Jung C, Sirotnak FM, She Y, Shah MA, Gonen M, Schwartz GK. Augmentation of apoptosis and tumor regression by flavopiridol in the presence of CPT-11 in Hct116 colon cancer monolayers and xenografts. Clin Cancer Res 2001;7(12):4209-19.
- Muller D, Millon R, Lidereau R, Engelmann A, Bronner G, Flesch H, Eber M, Methlin G, Abecassis J. Frequent amplification of 11q13 DNA markers is associated with lymph node involvement in human head and neck squamous cell carcinomas. Eur J Cancer B Oral Oncol 1994;30B(2):113-20.
- Nagasawa S, Onda M, Sasajima K, Makino H, Yamashita K, Takubo K, Miyashita M. Cyclin D1 overexpression as a prognostic factor in patients with esophageal carcinoma. J Surg Oncol 2001;78(3):208-14.
- Naidu R, Wahab NA, Yadav MM, Kutty MK. Expression and amplification of cyclin D1 in primary breast carcinomas: relationship with histopathological types and clinico-pathological parameters. Oncol Rep 2002;9(2):409-16.
- Naitoh H, Shibata J, Kawaguchi A, Kodama M, Hattori T. Overexpression and localization of cyclin D1 mRNA and antigen in esophageal cancer. Am J Pathol 1995;146(5):1161-9.
- Nguyen DM, Schrump WD, Tsai WS, Chen A, Stewart JHt, Steiner F, Schrump DS. Enhancement of depsipeptide-mediated apoptosis of lung or esophageal cancer cells by flavopiridol: activation of the mitochondria-dependent death-signaling pathway. J Thorac Cardiovasc Surg 2003;125(5):1132-42.

- Nigro JJ, DeMeester SR, Hagen JA, DeMeester TR, Peters JH, Kiyabu M, Campos GM, Oberg S, Gastal O, Crookes PF, Bremner CG. Node status in transmural esophageal adenocarcinoma and outcome after en bloc esophagectomy. J Thorac Cardiovasc Surg 1999;117(5):960-8.
- Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Anabitarte M, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jager P, Fehr JL, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. J Pathol 2001;194(3):349-57.
- Nogueira CP, Dolan RW, Gooey J, Byahatti S, Vaughan CW, Fuleihan NS, Grillone G, Baker E, Domanowski G. Inactivation of p53 and amplification of cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer. Laryngoscope 1998;108(3):345-50.
- Onuk MD, Oztopuz A, Memik F. Risk factors for esophageal cancer in eastern Anatolia. Hepatogastroenterology 2002;49(47):1290-2.
- Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. Clin Breast Cancer 2004;5(1):63-9.
- Proctor AJ, Coombs LM, Cairns JP, Knowles MA. Amplification at chromosome 11q13 in transitional cell tumours of the bladder. Oncogene 1991;6(5):789-95.
- Reichelt U, Duesedau P, Tsourlakis M, Quaas A, Link BC, Schurr PG, Kaifi JT, Gros SJ, Yekebas EF, Marx A, Simon R, Izbicki JR, Sauter G. Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus. Mod Pathol 2007;20(1):120-9.
- Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB, James M, Steele D, Jones RL, Dowsett M. Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis. Mod Pathol 2006;19(7):999-1009.
- Rosen PP, Saigo PE, Braun DW, Weathers E, Fracchia AA, Kinne DW. Axillary microand macrometastases in breast cancer: prognostic significance of tumor size. Ann Surg 1981;194(5):585-91.
- Roy PG, Pratt N, Purdie CA, Baker L, Ashfield A, Quinlan P, Thompson AM. High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer. Int J Cancer 2009.
- Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, Maurer R, Spichtin H, Torhorst J, Popovska S, Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. Int J Cancer 2006;118(9):2190-4.
- Sarbia M, Stahl M, Fink U, Heep H, Dutkowski P, Willers R, Seeber S, Gabbert HE. Prognostic significance of cyclin D1 in esophageal squamous cell carcinoma patients treated with surgery alone or combined therapy modalities. Int J Cancer 1999;84(1):86-91.
- Sarbia M, Gabbert HE. Modern pathology: prognostic parameters in squamous cell carcinoma of the esophagus. Recent Results Cancer Res 2000;155:15-27.
- Sato F, Shimada Y, Li Z, Watanabe G, Maeda M, Imamura M. Lymph node micrometastasis and prognosis in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Surg 2001;88(3):426-32.

- Sato S, Kajiyama Y, Sugano M, Iwanuma Y, Sonoue H, Matsumoto T, Tsurumaru M. Alvocidib (Flavopiridol) suppresses tumor growth in SCID mice with human esophageal cancer xenografts without inducing apoptosis. Surg Oncol 2006;15(2):107-13.
- Sauter ER, Keller SM, Erner S, Goldberg M. HER-2/neu: a differentiation marker in adenocarcinoma of the esophagus. Cancer Lett 1993;75(1):41-4.
- Sauter G, Moch H, Gudat F, Mihatsch MJ, Haley J, Meecker T, Waldman F. [Demonstration of gene amplification in urinary bladder cancer by fluorescent in situ hybridization (FISH)]. Verh Dtsch Ges Pathol 1993;77:247-51.
- Schlomm T, Kirstein P, Iwers L, Daniel B, Steuber T, Walz J, Chun FH, Haese A, Kollermann J, Graefen M, Huland H, Sauter G, Simon R, Erbersdobler A. Clinical significance of epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer. Clin Cancer Res 2007;13(22 Pt 1):6579-84.
- Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Kollermann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, Haese A, Steuber T, Simon R, Huland H, Sauter G, Erbersdobler A. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. Mod Pathol 2008;21(11):1371-8.
- Schneider PM, Vallbohmer D, Brabender J, Holscher AH. [Preoperative evaluation of prognostic factors in esophageal squamous cell cancer]. Chirurg 2005;76(11):1011-7.
- Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. Clin Cancer Res 1999;5(8):1966-75.
- Schwartz GK. Development of cell cycle active drugs for the treatment of gastrointestinal cancers: a new approach to cancer therapy. J Clin Oncol 2005;23(20):4499-508.
- Sedlacek HH. Mechanisms of action of flavopiridol. Crit Rev Oncol Hematol 2001;38(2):139-70.
- Senderowicz AM, Headlee D, Stinson SF, Lush RM, Kalil N, Villalba L, Hill K, Steinberg SM, Figg WD, Tompkins A, Arbuck SG, Sausville EA. Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms. J Clin Oncol 1998;16(9):2986-99.
- Sengpiel C, Konig IR, Rades D, Noack F, Duchrow M, Schild SE, Ludwig D, Homann N. p53 Mutations in carcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. Cancer Invest 2009;27(1):96-104.
- Seshadri R, Lee CS, Hui R, McCaul K, Horsfall DJ, Sutherland RL. Cyclin DI amplification is not associated with reduced overall survival in primary breast cancer but may predict early relapse in patients with features of good prognosis. Clin Cancer Res 1996;2(7):1177-84.
- Sheyn I, Noffsinger AE, Heffelfinger S, Davis B, Miller MA, Fenoglio-Preiser CM. Amplification and expression of the cyclin D1 gene in anal and esophageal squamous cell carcinomas. Hum Pathol 1997;28(3):270-6.
- Shimada Y, Imamura M, Shibagaki I, Tanaka H, Miyahara T, Kato M, Ishizaki K. Genetic alterations in patients with esophageal cancer with short- and long-term survival rates after curative esophagectomy. Ann Surg 1997;226(2):162-8.
- Shinozaki H, Ozawa S, Ando N, Tsuruta H, Terada M, Ueda M, Kitajima M. Cyclin D1 amplification as a new predictive classification for squamous cell carcinoma of the esophagus, adding gene information. Clin Cancer Res 1996;2(7):1155-61.
- Siersema PD. Pathogenesis, diagnosis and therapeutic possibilities of esophageal cancer. Curr Opin Gastroenterol 2007;23(4):456-61.

- Siewert JR, Stein HJ, Feith M, Bruecher BL, Bartels H, Fink U. Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer: lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the Western world. Ann Surg 2001;234(3):360-7; discussion 368-9.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987;235(4785):177-82.
- Stahl M, Oliveira J. Esophageal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2008;19 Suppl 2:ii21-2.
- Stein HJ, Brucher BL, Sendler A, Siewert JR. Esophageal cancer: patient evaluation and pre-treatment staging. Surg Oncol 2001;10(3):103-11.
- Stein HJ, Feith M, Bruecher BL, Naehrig J, Sarbia M, Siewert JR. Early esophageal cancer: pattern of lymphatic spread and prognostic factors for long-term survival after surgical resection. Ann Surg 2005;242(4):566-73; discussion 573-5.
- Sunpaweravong P, Sunpaweravong S, Puttawibul P, Mitarnun W, Zeng C, Baron AE, Franklin W, Said S, Varella-Garcia M. Epidermal growth factor receptor and cyclin D1 are independently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol 2005;131(2):111-9.
- Sutter AP, Hopfner M, Huether A, Maaser K, Scherubl H. Targeting the epidermal growth factor receptor by erlotinib (Tarceva) for the treatment of esophageal cancer. Int J Cancer 2006;118(7):1814-22.
- Suwa Y, Takano Y, Iki M, Takeda M, Asakura T, Noguchi S, Masuda M. Cyclin D1 protein overexpression is related to tumor differentiation, but not to tumor progression or proliferative activity, in transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol 1998;160(3 Pt 1):897-900.
- Syrjanen KJ. HPV infections and oesophageal cancer. J Clin Pathol 2002;55(10):721-8.
- Taira N, Doihara H, Oota T, Hara F, Shien T, Takahashi H, Yoshitomi S, Ishibe Y, Shimizu N. Gefitinib, an epidermal growth factor receptor blockade agent, shows additional or synergistic effects on the radiosensitivity of esophageal cancer cells in vitro. Acta Med Okayama 2006;60(1):25-34.
- Takagi Y, Takashi M, Koshikawa T, Sakata T, Ohshima S. Immunohistochemical demonstration of cyclin D1 in bladder cancers as an inverse indicator of invasiveness but not an independent prognostic factor. Int J Urol 2000;7(10):366-72.
- Takeuchi H, Ozawa S, Ando N, Shih CH, Koyanagi K, Ueda M, Kitajima M. 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 1997;3(12 Pt 1):2229-36.
- Takubo K, Nakamura K, Izumiyama N, Mafune K, Tanaka Y, Miyashita M, Sasajima K, Kato M, Oshimura M. Telomerase activity in esophageal carcinoma. J Surg Oncol 1997;66(2):88-92.
- Terry P, Lagergren J, Wolk A, Nyren O. Drinking hot beverages is not associated with risk of oesophageal cancers in a Western population. Br J Cancer 2001;84(1):120-1.
- Tew WP, Kelsen DP, Ilson DH. Targeted therapies for esophageal cancer. Oncologist 2005;10(8):590-601.
- Toyoda H, Nakamura T, Shinoda M, Suzuki T, Hatooka S, Kobayashi S, Ohashi K, Seto M, Shiku H, Nakamura S. Cyclin D1 expression is useful as a prognostic indicator for advanced esophageal carcinomas, but not for superficial tumors. Dig Dis Sci 2000;45(5):864-9.

- von Rahden BH, Stein HJ, Feith M, Puhringer F, Theisen J, Siewert JR, Sarbia M. Overexpression of TGF-beta1 in esophageal (Barrett's) adenocarcinoma is associated with advanced stage of disease and poor prognosis. Mol Carcinog 2006;45(10):786-94.
- Wagner U, Suess K, Luginbuhl T, Schmid U, Ackermann D, Zellweger T, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Jordan P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G. Cyclin D1 overexpression lacks prognostic significance in superficial urinary bladder cancer. J Pathol 1999;188(1):44-50.
- Walch A, Specht K, Bink K, Zitzelsberger H, Braselmann H, Bauer M, Aubele M, Stein H, Siewert JR, Hofler H, Werner M. Her-2/neu gene amplification, elevated mRNA expression, and protein overexpression in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett's esophagus. Lab Invest 2001;81(6):791-801.
- Wang KL, Wu TT, Choi IS, Wang H, Resetkova E, Correa AM, Hofstetter WL, Swisher SG, Ajani JA, Rashid A, Albarracin CT. Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. Cancer 2007;109(4):658-67.
- Wilkinson NW, Black JD, Roukhadze E, Driscoll D, Smiley S, Hoshi H, Geradts J, Javle M, Brattain M. Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma. J Gastrointest Surg 2004;8(4):448-53.
- Xu L, Davidson BJ, Murty VV, Li RG, Sacks PG, Garin-Chesa P, Schantz SP, Chaganti RS. TP53 gene mutations and CCND1 gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Int J Cancer 1994;59(3):383-7.
- Yoshida K, Tsuda T, Matsumura T, Tsujino T, Hattori T, Ito H, Tahara E. Amplification of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and oncogenes in human gastric carcinomas. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1989;57(5):285-90.
- Zaharieva BM, Simon R, Diener PA, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knonagel H, Rist M, Wilber K, Hering F, Schonenberger A, Flury R, Jager P, Fehr JL, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G, Toncheva DI. High-throughput tissue microarray analysis of 11q13 gene amplification (CCND1, FGF3, FGF4, EMS1) in urinary bladder cancer. J Pathol 2003;201(4):603-8.
- Ziegler RG. Alcohol-nutrient interactions in cancer etiology. Cancer 1986;58(8 Suppl):1942-8.
- zur Hausen A, Sarbia M, Heep H, Willers R, Gabbert HE. Retinoblastoma-protein (prb) expression and prognosis in squamous-cell carcinomas of the esophagus. Int J Cancer 1999;84(6):618-22.
- Zwijsen RM, Wientjens E, Klompmaker R, van der Sman J, Bernards R, Michalides RJ. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. Cell 1997;88(3):405-15.

### 8. Danksagung

Einen großen Dank für die Entstehung dieser Arbeit schulde ich Prof. Dr. G. Sauter, PD R. Simon und Dr. U. Reichelt. Für die liebevolle Unterstützung im FISH-Labor danke ich Fr. S. Schnöger sehr. Dr. S. Minner, C. Burdelski und Dr. rer. nat. P. Tennstedt, danke ich, dass sie immer da sind, wenn man einfach mal kurz eine Frage hat. Dr. K. Paraskevopoulos danke ich für sein Engagement während meines Studiums. Ich danke meinen Eltern, Bruder, Oma, Onkel und Tante, die mich all die Jahre in jeder Hinsicht unterstützen. Meinem Christos danke ich für Alles.

### 9. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir eingegebenen 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.