

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

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

Auswirkungen des Einzelnukleotid-Polymorphismus rs889312 auf klinisch-pathologische Parameter und die Prognose von Patienten mit Ösophaguskarzinom.

Dissertation

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

vorgelegt von:

Hannes Seese aus Leipzig

Hamburg 2020

Angenommen von der medizinischen Fakultät am: 27.05.2020

Veröffentlicht mit der Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

PD Dr. Matthias Reeh

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/-in:

PD Dr. Christoph Burdelski

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:

PD Dr. Georg Rosenberger

I INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	5
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	8
2.1 Plattenepithel- (SCC) und Adenokarzinome (AC) des Ösophagus	8
2.2 MAP3K1-SNP	12
2.3 Ziel der Arbeit/Arbeitshypothese	14
3 MATERIALIEN UND METHODEN	15
3.1 Studiendesign und Patienten	15
3.2 Klinisch-pathologische Daten	15
3.3 Experimentelle Techniken	16
3.3.1 Extraktion der Leukozyten DNS aus den venösen EDTA-Blutproben.	16
3.3.2 Amplifikation durch Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	16
3.3.3 Fragmentanalyse durch Gelelektrophorese	17
3.3.4 Aufsuchen der disseminierten Tumorzellen (DTC)	18
3.4 Statistik	18
4 ERGEBNISSE	19
4.1 Charakteristika der Studienpopulation	19
4.2 Ergebnisanalyse des MAP3K1 SNP im Ösophaguskarzinom	21
4.2.1 Der Vergleich von MAP3K1-SNP und klinischen Outcome	21
4.2.2 MAP3K1 SNP als unabhängiger prognostischer Faktor	27
5 DISKUSSION	28
6 ZUSAMMENFASSUNG	28
II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	34
III LITERATURVERZEICHNIS	36

IV DANKSAGUNG.....	46
V LEBENSLAUF	47
VI EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	48

1 Einleitung

Die personalisierte Therapie und Diagnostik bei malignen Tumorerkrankungen rücken zunehmend in den Fokus der Wissenschaft. Besonders die Suche nach geeigneten Biomarkern, welche eine Vorhersagbarkeit des klinischen Verlaufs oder des Ansprechens auf die unterschiedlichen, zur Verfügung stehenden Therapieoptionen ermöglichen könnten, sind von zentraler Bedeutung. Veränderungen in Blut- oder Gewebeprobe in Ausprägung oder Menge bestimmter Gene oder Genprodukten können als Biomarker verwendet werden. Dabei gibt der Biomarker spezifische Eigenschaften des Tumors wieder und basierend darauf kann eine zielgerichtete Therapie, abgestimmt auf den Patienten, ausgewählt werden. (Talukdar FR et al. 2018) Diese Therapie richtet sich dann gezielt gegen die speziellen Eigenschaften des Tumors und können dann zum Beispiel das Wachstum der Tumorzelle hemmen. Für die onkologische Therapie sind besonders prognostische und prädikative Marker von Bedeutung. Prognostische Biomarker können Hinweise auf den individuellen klinischen Verlauf einer malignen Erkrankung liefern und dementsprechend aus verschiedenen Behandlungsstrategien gewählt werden. Ein Beispiel dafür ist das Prostatakarzinom. Beim betroffenen Patienten ist ein niedriger Ausgangswert des Prostata-spezifischen Antigen (PSA) und im Verlauf ein nur langsames Ansteigen des PSA-Spiegels prognostisch günstig und die Tumorprogression und Metastasierungsrisiko gering. (Kirby R 2016) Prädikative Biomarker hingegen können eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit der Wirksamkeit einer spezifischen Therapie ermöglichen. Als Beispiel für einen prädikativen Biomarker lässt sich die Ausprägung von Genen der RAS-Familie in Tumorgewebe von Patienten mit Darmkrebs beschreiben. (Gustaw Lech et al. 2016) In diesem Fällen wird vor der Therapie mit einem Epidermal-Growth-Factor-Receptor-Antikörper (EGFR Antikörper) das KRAS-Gen untersucht, wobei im Falle des Auftretens von Mutationen in diesem Gen, eine Therapie mit dem EGFR-Antikörper nicht erfolgreich ist. (Kirby R 2016)

In den vergangenen Jahren ist die Anzahl der bekannten Biomarker vor allem aufgrund der vollständigen DNA-Entschlüsselung gestiegen und wie die oben bereits genannten Beispiele im klinischen Alltag angekommen. Ein weiteres, gutes Beispiel dafür ist die gezielte Behandlung mit EGF-Tyrosinkinase-Hemmern und Anaplastische-Lymphomkinase-Inhibitoren (ALK-Inhibitoren) von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkrebs und nachgewiesenen Mutationen des EGFR- oder anaplastische Lymphomkinase-Gen im Tumorgewebe. (Pfarr N et al. 2017, Bracht K 2009, Ludwig WD 2012)

In Besonderen bei soliden, hochaggressiven Tumorerkrankungen, wie dem des Ösophaguskarzinoms, fehlen bisher etablierte prognostische Biomarker, um Patienten in unterschiedliche Risikoprofile einzuteilen zu können und gezielte Therapie zu initialisieren. Durch großangelegte Genomanalysen und Assoziationsstudien mit Korrelation zu klinisch und pathologischen Parametern ist bekannt, dass Einzelnukleotid-Polymorphismen das Risiko für Auftreten und Verlauf verschiedener Erkrankungen beeinflussen können. (Eaton DF et al. 2007) Die Mechanismen dahinter sind komplex und zum größten Teil nicht vollständig verstanden. Als Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, engl. Single Nucleotide Polymorphism) werden Variationen eines einzelnen Basenpaares in einem komplementären DNA-Doppelstrang bezeichnet. (Brookes AJ 1999) Einzelnukleotid-Polymorphismen eignen sich aufgrund ihrer niedrigen Mutationsrate und häufigen Vorkommen im kompletten Genom im besonderen Maße für Assoziationsanalysen zur Identifikation komplexer Krankheiten. Diese SNP können zur Entstehung sogenannter Suszeptibilitätsgene führen. Darunter versteht man ein Gen, welches durch die Kombination von Genetik sowie Umwelteinflüssen, eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine multifaktorielle Erkrankung bedingt.

Im Jahr 2007 konnte eine große genomweit dreistufige Assoziationsstudie, zur Identifikation von unabhängigen SNPs für ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken, fünf vollständig neue SNP-Lokalisationen identifizieren. (Eaton DF et al. 2007) Dabei wurden in den ersten beiden Phasen dieser Studie 4398 Patientinnen und 4316 Kontrollen auf insgesamt 227 876 000 SNPs untersucht. In der dritten Phase wurden die 30 signifikantesten SNPs an weiteren 21860 Fällen und 22578 Kontrollen aus 22 Studien getestet. Keiner dieser neuen SNPs ist aus vorherigen Assoziationsstudien bekannt gewesen. Vier dieser SNPs lagen im Bereich bekannter Gene (FGFR2, TNRC9, MAP3K1 und LSP1). Die meisten bekannten Suszeptibilitätsgene für Brustkrebs sind involviert in DNA-Reparatur, Sexualhormon-Synthese und Stoffwechselwegen. Keine, der in diese Studie gefunden Assoziationen, gehört zu den bereits bekannten Genen diese Signalwege betreffend. (Eaton DF et al. 2007) Vor dem Hintergrund, dass solche SNPs auch für gastrointestinale Tumore eine entscheidende Rolle zur Entwicklung von Malignomen spielen könnten, ist die Erforschung dieser Zusammenhänge aufgrund möglicher, sich daraus ergebender therapeutischer Ansätze, von großer Bedeutung. (Roukos DH et al. 2007, Yang J 2019)

In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmalig einer dieser identifizierten SNPs im Allel codierend für die Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MAP3K1) für das

Ösophaguskarzinom untersucht. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob das Vorhandensein bestimmter Allele dieses SNPs einen Risikofaktor für den klinischen Verlauf und der Prognose des Ösophaguskarzinoms darstellt. Darüber hinaus soll auch die Frage untersucht werden, ob die unterschiedlichen Allele des untersuchten SNP mit der Entwicklung bestimmter Tumorcharakteristika, wie Tumorgröße, Tumordifferenzierung oder aber Lymphknotenstatus in einem Zusammenhang stehen und eine prognostische Relevanz für Patienten mit Ösophaguskarzinom besitzen. Ebenfalls wird untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten disseminierter Tumorzellen (DTC, Disseminated Tumor Cells) im Knochenmark und dem SNP rs889312 gibt. Dies geschieht vor dem Hintergrund, dass der Nachweis von DTCs im Knochenmark ein starker prognostischer Faktor für Patienten mit einem resektablen Ösophaguskarzinom ist. (Yogesh YK et al. 2012) Ein Großteil der Patienten bekommt trotz erfolgter Resektion im Gesunden (R0) im weiteren Verlauf ein Rezidiv der Grunderkrankung. Die Rezidive treten sogar in Patienten auf, deren Lymphknoten nicht betroffen waren. Das deutet auf die Dissemination von Tumorzellen auch in frühen Tumorstadien hin. Demzufolge verbleiben Tumorzellen auch nach Resektion im Körper des Patienten, dann spricht man von einer minimalen residualen Erkrankung. (Pantel und Brakenhoff 2004) Einen Zusammenhang zwischen dem SNP rs889312 und Lymphknotenstatus und Tumorgröße konnte in Untersuchungen bei Brustkrebspatientinnen bereits nachgewiesen werden. (Huijts PE 2007). Für die Durchführung dieser Studie wurde retrospektiv eine homogene Kohorte von Patienten mit einem Ösophaguskarzinom ausgewählt, welche eine primäre Ösophagektomie erhalten hatten. Die DNA wurde aus konservierten Blutproben der Patienten isoliert und mittels Polymerase Kettenreaktion das zu untersuchende Genfragment vervielfältigt und anschließend eine Fragmentanalyse mit Gelelektrophorese durchgeführt. Die erhobenen klinischen und pathologischen Daten wurden dann mit den Ergebnissen analysiert.

2 Theoretische Grundlagen

Das folgende Kapitel befasst sich mit den theoretischen Grundlagen dieser wissenschaftlichen Arbeit. Fundiertes sowie fachliches Wissen soll das Verständnis der behandelten Thematik unterstützen.

2.1 Plattenepithel- (SCC) und Adenokarzinome (AC) des Ösophagus

Plattenepithel- (SCC) und Adenokarzinome (AC) des Ösophagus zählen mit 95% zu den häufigsten, malignen Tumoren der Speiseröhre. (Robert Koch-Institut 2017) 2018 sind nach Angaben des Robert-Koch-Instituts in Deutschland 5700 Männer und 1700 Frauen neu an einem Ösophaguskarzinom erkrankt, mit zuletzt steigender Tendenz. (Robert Koch-Institut 2017) Dies entspricht einem Anteil von 3% der Männer und 1% der Frauen an allen bösartigen Neubildungen. Dennoch zählt das Ösophaguskarzinom zu den Tumor-entitäten mit einer insgesamt sehr schlechten Prognose. Die relative 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei in etwa 16-17%. (Robert Koch-Institut 2017) Besonders in der westlichen Welt hat die Anzahl der AC des Ösophagus im Vergleich zu den SCC deutlich zugenommen. (Thrift AP 2016) Ösophageale SCC und AC unterscheiden sich bezüglich ihrer Charakteristika, wie Tumorlokalisation und prädisponierender Faktoren. Das Rauchen sowie der Alkoholkonsum zählen zu den Hauptrisikofaktoren für das Auftreten von SCC. Das Vorliegen eines Barrett-Ösophagus mit intestinaler Metaplasie, als Komplikation der gastroösophagealen Reflux-Erkrankung, Übergewicht, und das Rauchen gehören dagegen zu den wesentlichen Risikofaktoren für die Entstehung eines AC. (Engel LS 2003)

In der Vergangenheit zählte bei lokal begrenzten Ösophaguskarzinomen die chirurgische Resektion zur Standardtherapie. Doch trotz Resektion im Gesunden (R0) weist das Ösophaguskarzinom aufgrund der frühen lymphatischen und vaskulären Metastasierung eine 5-Jahres Überlebensrate von 15-20% auf (Pennathur A et al. 2013, Siegel R 2013, so dass in den vergangenen Jahren multimodale Therapiekonzepte für das Adenokarzinom, als auch für das Plattenepithelkarzinom, etabliert wurden. Im Rahmen dieser multimodalen Therapiekonzepte werden Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren der Speiseröhre perioperativ oder neoadjuvant mit einer Chemotherapie oder Radiochemotherapie behandelt. (Smyth EC et al. 2017) So konnte in der MAGIC-Studie eine Steigerung des 5-

Jahres-Überleben durch eine perioperative Chemotherapie (Epirubicin, Cisplatin und Fluorouracil) gegenüber einer alleinigen chirurgischen Intervention bei Adenokarzinomen nachgewiesen werden. (Cunningham D et al. 2006) Im weiteren Verlauf konnten die Überlebenszeiten durch die Einführung vom perioperativen FLOT-Regime (5-Fluorouracil, Folinsäure, Oxaliplatin, Docetaxel) noch weiter verbessert werden. (Al-Batran Se et al. 2016) Zurückzuführen ist das verbesserte Ansprechen der Therapie vor allem auf die signifikant höheren kompletten Regressionsraten im Vergleich zu den etablierten Therapieregimen, unter anderem aus der MAGIC-Studie. Als Tumorregression bezeichnet man die Rückentwicklung des Tumors unter einer onkologischen Therapie. Dabei kann das Ausmaß einer solchen Regression bildmorphologisch im Verlauf der Therapie, durch zum Beispiel Computertomographie (CT), PET-CT (Positronen-Emissions-Tomographie kombiniert mit einem CT) oder endosonographisch kontrolliert werden. Auch nach erfolgter Resektion ist am endgültigen histologischen Präparat eine Einschätzung des Ansprechens auf die Therapie möglich. Dabei gibt der histologische Regressionsgrad an, wieviel Prozent Residualtumor nach neoadjuvanter Therapie verblieben sind. (Becker et al. 2003) Die prognostische Bedeutung einer kompletten histopathologischen Tumorregression nach neoadjuvanter Therapie konnte in mehreren Studien belegt werden. (Langen R et al. 2009) Auch die randomisierte CROSS-Studie konnte einen lebensverlängernden Effekt durch eine präoperative Radiochemotherapie (Carboplatin und Paclitaxel, sowie Radiotherapie mit insgesamt 41,4 Gray) gefolgt durch die Operation im Vergleich zur alleinigen Operation für Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus nachweisen. (Van Hagen P et al. 2012) Das mediane Gesamtüberleben bei den vorbehandelten Patienten in der CROSS-Studie lag bei 49 Monaten. Im Gegensatz dazu überlebten die Patienten ohne präoperative Therapie im Median nur 24 Monate. (Van Hagen P et al. 2012) In der Gruppe der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom ist der Überlebensvorteil für das Langzeitüberleben bei einem lokal begrenzten Tumor im Rahmen der CROSS-Studie sogar noch deutlicher, hier liegt das mediane Gesamtüberleben von 82 Monaten bei präoperativer Radiochemotherapie gegenüber 21 Monaten ohne präoperative Therapie. (Shapiro J et al. 2015)

Der Erfolg für das Gesamtüberleben der Patienten dieser Studien basiert im Wesentlichen auf der Untergruppe der Major-Responder, d.h. jener Patienten, welche eine sehr gute Regression des Tumors unter der neoadjuvanten Chemo- oder Radiochemotherapie zeigen. (Hölscher AH et al. 2014).

Aktuell ist der wichtigste Prognosefaktor für das Ösophaguskarzinom die postoperative Stadieneinteilung nach UICC (pTNM). (KatoH et al. 1993, Enzinger PC und Mayer RJ 2003) Wobei mit zunehmender Infiltrationstiefe das Risiko einer Lymphknotenmetastasierung signifikant zunimmt, dieses gilt für das Plattenepithel- als auch für das Adenokarzinom des Ösophagus. (Bollschweiler E et al. 2006) Weitere Prognosefaktoren sind eine Lymphgefäß- oder Veneninvasion und dem Verhältnis aus metastatisch befallenen Lymphnoten und der Gesamtzahl der postoperativ untersuchten Lymphknoten. (Brucher BL et al. 2001, Sarbia et al. 1994, Roder JD et al. 1994). Ein weiterer für die Prognose von Ösophaguskarzinompatienten wichtiger Parameter scheint das Vorliegen von disseminierten Tumorzellen zu sein (sog. Disseminated Tumor Cells, kurz DTC) Von DTCs wird gesprochen, wenn sich einzelne Tumorzellen im Knochenmark oder in den Lymphknoten befinden. (Braun S und Pantel K 2000) Im Falle des Vorhandenseins solcher Karzinomzellen nach Entfernung des Primärtumors und deren Nachweis bezeichnet man dies als minimal residuale Erkrankung. (Pantel K und Brakenhoff RH 2004) Die disseminierten Tumorzellen besitzen die Eigenschaft im Knochenmark zu ruhen und Metastasen in Organe streuen zu können. Für das Ösophaguskarzinom konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Anwesenheit von DTCs im Knochenmark von Ösophaguskarzinompatienten ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben und die Entwicklung von Rezidiven ist. (Macadam et al. 2003, Thorban et al 2000, Vashist et al. 2012) Die DTCs im Knochenmark treten bereits bei Patienten auf, welche keine messbaren Lymphknotenmetastasen haben und sind somit ein Anzeichen der frühen hämatologischen Streuung des primären Ösophaguskarzinoms. Das Knochenmark scheint ein wichtiges Reservoir für metastatischen Zellen zu sein, welche im späteren Verlauf in die Blutbahn rezirkulieren und in multiplen Organen zu Metastasen führen können. (Chiang AC und Massague J 2008, Kim MY et al 2009, O'Sullivan GC et al. 1997) In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Rezidivrate in Patienten mit DTCs signifikant höher ist, als bei Patienten ohne den Nachweis disseminierten Tumorzellen im Knochenmark. Jedoch nicht bei allen Patienten mit vorhandenen DTCs treten im Verlauf der Erkrankungen Rezidive, auf was auf eine Heterogenität dieser Patientenpopulation hindeutet. Dabei ist die Aktivierung ruhender DTCs im Knochenmark in eine dynamische Phase durch mögliche genetische Veränderungen oder äußere Stimuli im Mikroumfeld des Knochenmarks mitverantwortlich. (Stoecklein NH et al. 2008, Wikman H et al. 2008)

Ergänzend ist die Immunabwehr der Patienten ebenfalls ein Faktor dafür, dass vorhandene DTCs aus dem Knochenmark eliminiert werden können. (O'Sullivan GC et al. 1997) Molekularpathologische Analysen haben bisher keine zusätzliche diagnostische und prä-dikative Bedeutung für das Patientenkollektiv mit Ösophaguskarzinom und molekulare Prognosefaktoren sind derzeit nicht etabliert.

Trotz dieser Fortschritte in der Behandlung des Ösophaguskarzinoms fehlt es aktuell immer noch an verlässlichen Parametern, den klinischen Verlauf betroffener Patienten vorherzusagen (Kim TJ 2009). Der ideale prognostische Marker sollte einfach zu detektieren, sowie unabhängig von der Verfügbarkeit von Tumorgewebe sein und ebenfalls eine genetische Stabilität nach beispielsweise einer durchgeführten Chemo- oder Radiotherapie besitzen. Des Weiteren sollte der Marker reproduzierbar und untersucherunabhängig sein. Genetische Variationen der Keimbahn-DNS könnten als stabile Prognoseparameter bei Karzinomen verwendet werden. (Fareed KR 2009, Adjadj E 2009, Easton DF et al. 2007, Hunter KW 2004)

In einer genomweiten Assoziationsstudie konnte der Single Nucleotid Polymorphismus (SNP) rs889312 als genetisch signifikanter prädisponierender Faktor für das Mammakarzinom identifiziert werden. (Easton DF et al. 2007) Dabei zeigte sich, dass das in der untersuchten Population selten vorkommende Allel positiv assoziiert ist mit der Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken. (Easton DF et al. 2007) Dieser SNP liegt auf dem Chromosom 5 in einem Bereich, der für das Gen MAP3K1 codiert. Das MAP3K1-Gen kodiert das Signalprotein Mitogen-Activated-Protein-Kinase-Kinase-Kinase 1 und repräsentiert eine Serin/Threonin Kinase, welche in multiplen stress- und mitogen induzierten Protein-Kinase-Kaskade beteiligt ist, durch die Zellwachstum und Proliferation induziert werden. (Davis RJ 2000, Chang L und Karin M 2001) Der SNP rs889312 resultiert in drei verschiedenen Genotypen (AA, AC, CC). Die klinische Nützlichkeit des MAP3K1-SNP als prognostischer Marker konnte bereits in einer niederländischen Studie, zur Untersuchung des Einflusses des MAP3K1-SNP bei Patientinnen mit Mammakarzinom auf das klinische Ergebnis bewiesen werden. (Huijts PE et al. 2007) Dort zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang des Genotypen CC mit einem weniger wahrscheinlichen Auftreten von Lymphknotenmetastasen in der untersuchten Kohorte.

In dieser Studie konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten des SNP rs889312 und dem Gesamt- und rezidivfreien Überleben festgestellt werden. (Huijts PE et al. 2007)

2.2 MAP3K1 und der SNP 889312

Die Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MAP3K1) ist eine Serin/Threonin-Kinase, welche auf dem Chromosom 5 codiert ist. Dieses Protein ist Bestandteil einiger Signaltransduktionskaskaden, zum Beispiel die Extracellular-Signal Regulated Kinase (ERK) und der c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) Transduktionskaskaden, als auch des NF-kappa-B-Pfades. (Robinson MJ und Cobb MH 1997) Die MAP3K1 befindet sich im Zytosol der Zellen. Im menschlichen Körper besitzt die MAP3K1 keine organspezifische Expression und ist deshalb nicht gewebespezifisch. Gleiches gilt für die Expression in Tumorgewebe auch hier gibt es keine tumorspezifische Expressionsmuster. Das Enzym hat eine grundlegende Rolle im Netzwerk der phosphorylierenden Kinase-Enzyme, welche durch zahlreiche rezeptorvermittelte, mitogene und metabolischer Stimuli beeinflusst werden. Zu diesen Stimuli gehören unter anderen der Epidermal growth factor Rezeptor (EGFR) und der Transforming Growth Factor beta Rezeptor (TGFβR). (Schlesinger TK 1998, Suddason T und Gallagher E 2015) Die zu phosphorylierenden Substrate der MAP3K1 sind vor allem die Mitogen-activated protein kinase kinases (MAP2Ks). (Minden A et al. 1994) In mausgenetischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass MAP3K1 eine wichtige Rolle in der embryologischen Entwicklung, beim Zellwachstum, der Zellmigration sowie Zytokinproduktion und der B-Zell-Antikörper Produktion hat. (Suddason T und Gallagher E 2015) Schlesinger et al. konnten nachweisen, dass das vollständig lange Protein antiapoptotische und kürze Varianten eine apoptische Wirkung auf den Zellorganismus im Mausmodell haben. (Schlesinger et al. 2002)

Rs889312 ist ein bekannter SNP im Bereich des MAP3K1-Gens auf Chromosom 5. (Easton DF et al. 2007) In Abhängigkeit des Einzelnukleotid-Polymorphismus kommt es zur Ausbildung von 3 verschiedener Allelkonfigurationen. Diese sind homozygot AA, heterozygot AC und homozygot CC. Bereits 2007 wurde durch Easton et al. erstmalig der rs889312 SNP auf dem Chromosom 5 im Bereich des MAP3K1-Gens beschrieben und als ein Suszeptibilitätsgen für Brustkrebs gekennzeichnet. (Easton DF et al. 2007) Dabei ist die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken signifikant höher assoziiert mit

dem seltener Vorkommenden C-Allel der Mutation. (Easton DF et al. 2007) Unter einem Suszeptibilitätsgen versteht man ein Gen, dass durch eine Kombination von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit für eine multifaktorielle Erkrankung bedingt. Bis heute konnten verschiedene Studien den Zusammenhang zwischen dem MAP3K1-Gene rs889312 SNP und dem erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken demonstrieren. (Rebbeck TR et al. 2009, Jara L et al. 2013) Des Weiteren haben Garcia-Closas et al. herausgefunden, dass MAP3K1 Genvarianten im hohen Maße relevant bei Östrogen-Rezeptor-positiven und weniger bei Östrogen-Rezeptor-negativen Brusttumoren sind. (Garcia-Closas M und Chanock 2008)

Aktuelle Untersuchungen zeigen weitere signifikante Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Genotypen des MAP3K1-SNP rs889312 und dem Langzeitüberleben bei Patienten mit einem Magenkarzinom. (Xiaowei Wie et al. 2014, Yang J et al. 2019) Xiaowei et al. haben in einer Studie gezeigt, dass heterozygote Allelträger (AC-Genotyp) mit einem diffusen Magenkarzinom und durchgeführter subtotaler oder totaler Gastrektomie eine signifikant kürzere Gesamtüberlebenszeit haben im Vergleich zu Patienten mit einem AA- oder AC-Genotyp. (Xiaowei Wie et al. 2014). Darauf basierend folgte 2019 eine weitere Studie, mit dem Ziel den Einfluss von rs889312 SNP in Patienten mit Magenkarzinom nach erfolgter kurativer totaler Gastrektomie und adjuvanter versus keiner adjuvanten Chemotherapie zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung waren, dass Patienten mit einem AC- oder CC-Genotyp ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben haben im Vergleich zum AA-Genotyp, wenn sie eine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten. Im Patientenkollektiv der Patienten, welche keine adjuvante Therapie erhalten hatten, konnte dies nicht bestätigt werden. Trotzdem legt diese Studie nahe, dass der SNP rs889312 in diesem Patientenkollektiv als ein Biomarker für das Ansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie dienen kann und einen prognostischen Einfluss auf die Patienten mit einem Magenkarzinom nach kurativer Operation und adjuvanter Chemotherapie hat. (Yang J et al. 2019) Weiterführende Untersuchungen zeigten zudem klinisch interessante Zusammenhänge zwischen Mutationen der MAP3K1 und dem Ansprechen auf bereits klinisch etablierte MEK-Inhibitoren, welche zum Beispiel in der Behandlung von malignen Melanomen eingesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass in Tumorzellmodellen mit einer erhöhten Aktivität der MAPK-Kaskaden (mitogen-activated pro-

tein kinasen), im Falle der Mutation von MAP3K1, eine Behandlung mit MEK-Inhibitoren erfolgreich sein könnte. Demzufolge sehen die Autoren in der MAP3K1 ein potentielles Ziel für zukünftige medikamentöse Therapien (Zheng Xue et al. 2018).

2.3 Ziel der Arbeit/Arbeitshypothese

Bisher wurde ein direkter und unabhängiger Einfluss eines Keimbahnpolymorphismus in den codierenden Genabschnitte für MAP3K1 auf den klinischen Verlauf des Ösophaguskarzinom nicht untersucht. Mit dieser Studie wird eine homogene Patientengruppe untersucht. Die eingeschlossenen Patienten haben vor und nach der alleinigen Tumoresektion keine neoadjuvante- oder adjuvante Therapie erhalten. Die Resektion erfolgte bei allen Patienten im Gesunden (R0). So ist es möglich den natürlich Krankheitsverlauf nach kompletter Resektion zu beobachten. Darüber hinaus wurde bei allen in diese Studie eingeschlossenen Patienten das Knochenmark auf das Vorhandensein disseminierte Tumorzellen untersucht, um einen möglichen Zusammenhang des SNP rs889312 und dem Auftreten von DTCs zu untersuchen, denn die zugrunde liegenden Mechanismen der prognostischen Relevanz der DTC im Ösophagus sind bisher nicht bekannt. Dafür wurden die Ergebnisse der molekularbiologischen Analyse mit den klinisch-pathologischen Patientenparametern, dem Status vorhandener disseminierter Tumorzellen und dem Gesamtüberleben, als auch dem rezidivfreien Überleben, verglichen.

Ziel dieser Studie ist es, den SNP rs889312 als unabhängigen prognostischen Marker für das Ösophaguskarzinom zu untersuchen.

3 Materialien und Methoden

Das dritte Kapitel dieser Dissertation befasst sich mit den allgemeinen Rahmendaten der Studie. Dabei wird die Stichprobe sowie die angewandten Forschungstechniken näher erläutert. Abschließend wird noch Auswertung mit SPSS® beschrieben.

3.1 Studiendesign und Patienten

Die hier vorliegende Studie ist vom Ethikkomitee der Ärztekammer Hamburg geprüft und zugelassen worden. Die in der Studie eingeschlossenen Patienten haben nach entsprechender Aufklärung für die Entnahme und Verwendung der EDTA-Blutproben zur Verwendung für wissenschaftliche Zwecke zugestimmt. Die hier retrospektiv erhobenen Daten zur Analyse des MAP3K1 SNP rs889312 stammen von insgesamt 136 Patienten mit dem Vorhandensein eines primären Ösophaguskarzinoms. Die Patienten wurden im Zeitraum vom Oktober 2000 bis Juni 2009 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf operiert. Die eingeschlossenen Patienten erhielten eine abdominothorakale Ösophagektomie mit Lymphadenektomie. Die Tumorentität ist in allen Fällen histologisch gesichert, die Resektionsränder tumorfrei (R0) und keiner der Patienten hatte vorab eine (neo-)adjuvante Chemotherapie erhalten.

3.2 Klinisch-pathologische Daten

Alle eingeschlossenen Daten, wie die histologische Klassifikation, Tumorinvasionstiefe, Lymphknotenmetastasierung und Tumorstadium wurden prospektiv dokumentiert. Die Entstehung eines Rezidivs wurde definiert als Entwicklung eines lokalem Tumorwachstums und als auch die Entstehung von Fernmetastasen nach initialer R0-Resektion. Die Daten zum postoperativen Überwachungszeitraum wurden über die Befragung der Hausärzte, in den Ambulanzen des UKEs, aus der Patientenakte und dem regionalen Krebsregister erhoben. Das rezidivfreie Überleben (DFS) wurde definiert als Zeitraum von der initialen Operation bis zum Tag der Diagnosestellung des Rezidivs, am Todestag oder am

Tag des letzten Follow-Up, je nachdem welches Ereignis als erstes auftrat. Als Sterbedatum für die Überlebensanalyse wurde der reelle Todestag oder das Datum des letzten erfolgte Follow-Up definiert, entsprechend welches Ereignis zuerst auftrat. Der Beginn des Überlebenszeitraum wurde als der Tag der initialen Operation definiert. Jene Patienten, welche im letzten Follow-Up noch ohne Rezidiv gewesen sind, wurden ebenfalls zensiert.

3.3 Experimentelle Techniken

Dieser Abschnitt der Dissertation beschreibt den experimentellen Prozess für die Auswertung der 2000 bis 2009 einbezogenen Fälle. Dabei wird unter anderem das explizite Vorgehen bei der Laboruntersuchung dargelegt und Hilfsmittel näher erläutert.

3.3.1 Extraktion der Leukozyten DNS aus den venösen EDTA-Blutproben.

Zunächst wurde die Patienten-DNS mittels einer standardisierten Methode („QIAamp Blood Tissue Kit“, Qiagen®, Hilden Deutschland) aus den in den EDTA-Blutproben enthaltenen Leukozyten extrahiert und gereinigt, sowie anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren.

3.3.2 Amplifikation durch Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Zur weiteren klinischen Untersuchung ist es notwendig den zu untersuchenden DNA-Abschnitt zu vervielfältigen. Das Verfahren der Wahl ist die 1983 durch Dr. Kary Mullis entwickelte Polymerase-Ketten-Reaktion. Mittels dieser Technik können die Zielsequenzen in vitro vervielfältigt werden. (Markham AF 1993) Das Prinzip ist eine maschinell gesteuerte Abfolge von Denaturierung der DNS, Annaeling mittels spezifischer Primer, anschließender Elongation durch die hinzugefügten Taq-Polymerase und den Nukleotiden. Durch Wiederholung dieses Zyklus wird die DNS exponentiell repliziert. Dazu wurde der gesuchte MAP3K1 SNP als Sens-Primer 5'-GGTCATTCGATGGCCATCTG-3' (Eurofins MWG Operon) und als entsprechender Antisense-Primer 5'-CTGCATAACCCCTCTTGA-3' (Eurofins MWG Operon) festgelegt.

Die Durchführung der PCR zur Fragmentanalyse erfolgte in einem Ansatz aus 0,25µl extrahierter DNS, 2µl des PCR Buffer (Taq DNA Polymerase, dNTPack, Roche®), 4~l dNTP (1,25mM), der Primer und 1,25µl Taq-Polymerase (Taq DNA Polymerase, dNTPack, Roche®). Abschließend wurde das Gemisch mit destillierten und gereinigtem H₂O aufgefüllt.

Die weiteren Bedingungen der maschinellen Zyklen der Synthese waren die Denaturierungsphase bei 95°C für insgesamt zwei Minuten. Anschließend folgten 40 Zyklen mit 95°C für jeweils eine Minute. Das Annealing erfolgte für 30 Sekunden bei 55°C und die Elongation bei 72°C für eine Minute. Abschließend erfolgte die Inkubation mit dem Restriktion Enzym NlaIII (Hin1II, Thermo Scientific™) für insgesamt eine Stunde. Dabei trennen sie die synthetisierten DNS-Fragmente im Falle des Vorliegens des SNP rs889312 in ein 111 Basenpaare (bp) langes und ein 177bp langes Fragment. Bei nicht Vorliegen des SNP rs889312 verbleibt ein 288 langes DNS Fragment. Somit ergeben sich die insgesamt drei Genotyp-Varianten Genotyp AA (Vorliegen langes Fragment), Genotyp AC (lange und kurze Fragmente) sowie Genotyp CC (kurze Fragmente).

3.3.3 Fragmentanalyse durch Gelelektrophorese

Nach Abschluss der PCR wurde nun das fertige PCR-Produkt auf einem 2,5% Agarosegel der klassischen Gelelektrophorese unterzogen. Dabei werden die einzelnen DNS Fragmente anhand ihrer Größe und der Wanderungseigenschaften der geladenen DNS-Fragmente im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei bilden sich DNS-Fragment-Banden aus, die aufgrund des bei der Herstellung des Agarosegels hinzugefügten Ethidiumbromid unter UV-Licht fluoreszieren. Zur Herstellung des 2,5% Agarosegels wurden 5g Agarose mit 200ml 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und nach Auflösung wurden 10µl Ethidiumbromid (1%ig) hinzugegeben. Die im Versuchsaufbau angelegte Spannung betrug 100V Gleichspannung für einen Zeitraum von zwei Minuten. Abschließend erfolgten die Fotodokumentation und Archivierung der Bilder.

3.3.4 Aufsuchen der disseminierten Tumorzellen (DTC)

Hierzu wird auf die bereits etablierte Prozedur der Detektion mikroskopische disseminierter Tumorzellen aus dem Institut für Tumorbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Prof. Dr. Pantel, nach hausinternem Standard durchgeführt. (Schurr P 2006)

Zuerst werden dem Patienten bei einer Punktion des Beckenkamms ca. 4-8ml Knochenmark extrahiert. Dies geschieht unmittelbar vor der eigentlichen thorakoabdominellen Ösophagektomie, im selben operativen Eingriff unter Vollnarkose. Dem Material wird umgehend Heparin hinzugefügt, um eine Gerinnung zu verhindern und eine Weiterbehandlung im Labor zu ermöglichen. Durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll Hypaque (Pharmacia®, Freiburg, Deutschland) bei 400g (g-Kraft) für 30 Minuten lassen sich die mononuklearen Zellen isolieren. Anschließend werden diese bei Raumtemperatur mittels Zytozentrifugation bei 150g (g-Kraft) für drei Minuten auf einen Glaträger appliziert. Für die spezifische Identifikation der Tumorzellen werden monoklonale Antikörper A45-B/B3 (IgG1; Micromet®, München, Deutschland) eingesetzt, welche ein Epitop der verschiedenen Zytokeratine, wie Zytokeratin 8,18 und 19 erkennen. Zur Kontrolle wurde ein unspezifisches IgG1 benutzt. Durch die APAAP-Technik erfolgte die Visualisierung nach Gegenfärbung mit Mayer's Hamätoxylin. Um das Screening der Proben durchzuführen wurde im Weiteren der automatisierte Zell-Imager ChromaVision (Medical System® Inc., USA) eingesetzt.

3.4 Statistik

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm SPSS® für Apple® (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Zur Identifizierung einer Korrelation zwischen den MAP3K1 SNP-Genotyp-Varianten wurde der Chi-Quadrat-Test benutzt. Die Überlebenskurven wurden nach Kaplan-Meier-Methode erstellt und mittels Log-Rank-Test analysiert. Für die multivariate Analyse zur Prüfung der Genotyp-Variationen als prognostischer Marker wurde die Cox-Regressionsanalyse verwendet. Signifikante Ergebnisse beziehen sich wie üblich auf p-Werte der bidirektionalen Tests kleinergleich als 0,05.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Studienpopulation

Eingeschlossen wurden insgesamt 136 Patienten mit Plattenepithel- und Adenokarzinomen der Speiseröhre. Bei insgesamt 77 (56,6%) Patienten wurde histologisch ein Plattenepithelkarzinom und bei 59 (43,4%) Patienten ein Adenokarzinom der Speiseröhre diagnostiziert. Das durchschnittliche Lebensalter zum Zeitpunkt der Operation betrug 64 Jahre, im Bereich von Minimum 39 und Maximum 82 Jahren. Der größte Anteil der Patienten mit insgesamt 109 (81,1%) waren männlichen Geschlechts, dem entsprechend waren 27 (19,9%) der Patienten weiblich. Bei allen Patienten erfolgte eine R0 Resektion und im Rahmen des präoperativen Stagings konnten keine soliden Fernmetastasen bildmorphologisch festgestellt werden. Keiner der Patienten erhielt vor Durchführung der Operation eine neoadjuvante-oder adjuvante Radio- oder Chemotherapie. Bei allen eingeschlossenen Patienten wurde der DTC-Status bestimmt. Insgesamt konnten bei 28 (20,6%) Patienten disseminierte Tumorzellen im Knochenmark diagnostiziert werden. Die Analyse des untersuchten SNP rs889312 ergab, dass über das gesamte Patientenkollektiv 75 (55,1%) homozygote AA-Genotyp Träger sind, der heterozygote AC-Genotyp lag bei 50 (36,8%) der Patienten vor und homozygote CC-Genotyp Träger gab es insgesamt elf (8,1%) mal.

		SCC				AC				
Variable	ges.	AA	AC	CC	p-Wert	ges.	AA	AC	CC	p-Wert
gesamt	77 (100)	41 (53,2)	28 (36,4)	8 (10,4)		59 (100)	34 (57,6)	22 (37,3)	3 (5,1)	
Geschl.										
männl.	59	31 (52,5)	22 (37,3)	6 (10,2)		50	29 (58,0)	18 (36,0)	3 (6,0)	
weibl.	18	10 (55,6)	6 (33,3)	2 (11,1)	0.954	9	5 (55,6)	4 (44,4)	0 (0)	0,707
Alter (Lj.)										
≤60	28	13 (46,4)	12 (42,9)	3 (10,7)	0.638	17	9 (52,9)	8 (47,1)	0 (0)	0.384
>60	49	28 (57,1)	16 (32,7)	5 (10,2)		42	25 (59,5)	14 (33,3)	3 (7,1)	
Tumorgr.										
pT1	13	8 (61,5)	3 (23,1)	2 (15,4)		15	9 (60)	5 (33,3)	1 (6,7)	
pT2	14	5 (35,7)	7 (50,0)	2 (14,3)		14	8 (57,1)	6 (42,9)	0 (0)	
pT3	41	22 (53,7)	16 (39,0)	3 (7,3)		29	17 (58,6)	11 (37,9)	1 (3,4)	
pT4	9	6 (66,7)	2 (22,2)	1 (11,1)	0.664	1	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0,003
LK-Stat.										
neg.	34	21 (61,8)	8 (23,5)	5 (14,7)		30	18 (60,0)	11 (36,7)	1 (3,3)	
pos.	43	20 (46,5)	20 (46,5)	3 (7)	0.096	29	16 (55,2)	11 (37,9)	2 (6,9)	0.805
Grading										
G1	2	0 (0)	2 (100)	0 (0)		5	4 (80,0)	0 (0)	1 (20)	
G2	40	18 (45,0)	17 (42,5)	5 (12,5)		22	12 (54,5)	9 (40,9)	1 (4,5)	
G3	35	23 (65,7)	9 (25,7)	3 (8,6)	0.146	32	18 (56,3)	13 (40,6)	1 (3,1)	0.291
Rezidiv										
Nein	54	34 (63,0)	17 (31,5)	3 (5,6)		45	25 (55,6)	17 (37,8)	3 (6,7)	
Ja	23	7 (30,4)	11 (47,8)	5 (21,7)	0.015	14	9 (64,3)	5 (35,7)	0 (0)	0.581
DTC										
neg.	62	35 (56,5)	20 (32,3)	7 (11,3)		46	28 (60,9)	15 (32,6)	3 (6,5)	
pos.	15	6 (40)	8 (53,3)	1 (6,7)	0.311	13	6 (46,2)	7 (53,8)	0 (0)	0.293

Tabelle 1: Aufgeführten Charakteristika der Studienpopulation getrennt nach der histologischen Aufteilung nach Plattenepithel- und Adenokarzinom.

4.2 Ergebnisanalyse des MAP3K1 SNP im Ösophaguskarzinom

Die drei zu untersuchenden Genotypen wurden mit den klinischen und pathologischen Parametern korreliert. In der folgenden statischen Auswertung sind die beiden Tumorentitäten getrennt analysiert.

Bei der Betrachtung der eingeschlossenen Patienten mit dem Vorliegen eines Plattenepithelkarzinoms zeigt sich statistisch signifikant ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des AA- und AC-Genotyps und dem Auftreten eines Tumorrezidivs im Beobachtungszeitraum. (Tabelle 1, $p = 0,015$) Von den insgesamt 54 Patienten, ohne Auftreten eines Rezidivs, hatten 34 (63%) Patienten den AA- Genotyp. Das Auftreten eines Rezidivs bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus korreliert signifikant mit dem Vorhandensein des C-Allel, d.h. Patienten mit einem AC- oder CC-Genotyp haben ein signifikant höheres Risiko ein Rezidiv zu entwickeln im Vergleich zu Patienten mit einem AA-Genotyp. In Bezug auf alle anderen klinisch-pathologischen Parameter zeigten sich keine weiteren signifikanten Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Genotypen in der Subpopulation der SCC-Patienten.

In der Analyse der Adenokarzinom-Patienten zeigt sich kein verwertbarer signifikanter Zusammenhang zwischen den klinisch-pathologischen Parametern und den unterschiedlichen MAP3K1-Genotypvarianten. Die vollständigen Daten sind als Übersicht in der Tabelle 1 aufgeführt. Die Korrelation von den MAP3K1-Genotypen und dem T-Stadium zeigt bei den Adenokarzinompatienten eine statistische Signifikanz, die aber am ehesten auf die geringe Fallzahl der Patienten zurückzuführen ist.

In der Auswertung des Vorhandenseins disseminierter Tumorzellen und der unterschiedlichen Genotypen des SNP rs889312 ergibt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang, weder beim Plattenepithel- noch beim Adenokarzinom des Ösophagus.

4.2.1 Der Vergleich von MAP3K1-SNP und klinischen Outcome

Von den initial 136 eingeschlossenen Patienten verstarben im Beobachtungszeitraum insgesamt 71 (52,2%) Patienten. Und bei 42 Patienten ist in diesem Zeitraum ein Rezidiv des Ösophaguskarzinoms aufgetreten.

Die Kaplan-Meier-Analyse für das SCC zeigt eine Zunahme des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Überlebens bei den Patienten mit dem Vorliegen eines AA-Genotyps. (Abbildung 1, 2) Wobei lediglich die Verlängerung der rezidivfreien Zeit nach Operation statistisch signifikant ist. D.h. SCC-Patienten mit einem AA-Genotyp haben ein signifikant längere rezidivfreie Zeit postoperativ, als Patienten mit einem AC-oder CC-Genotyp.

Die Auswertung des Patientenkollektivs mit einem Adenokarzinom zeigt in den Überlebenszeitanalysen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen MAP3K1 Genotypen und dem Gesamtüberleben und der rezidivfreien Zeit nach Operation.

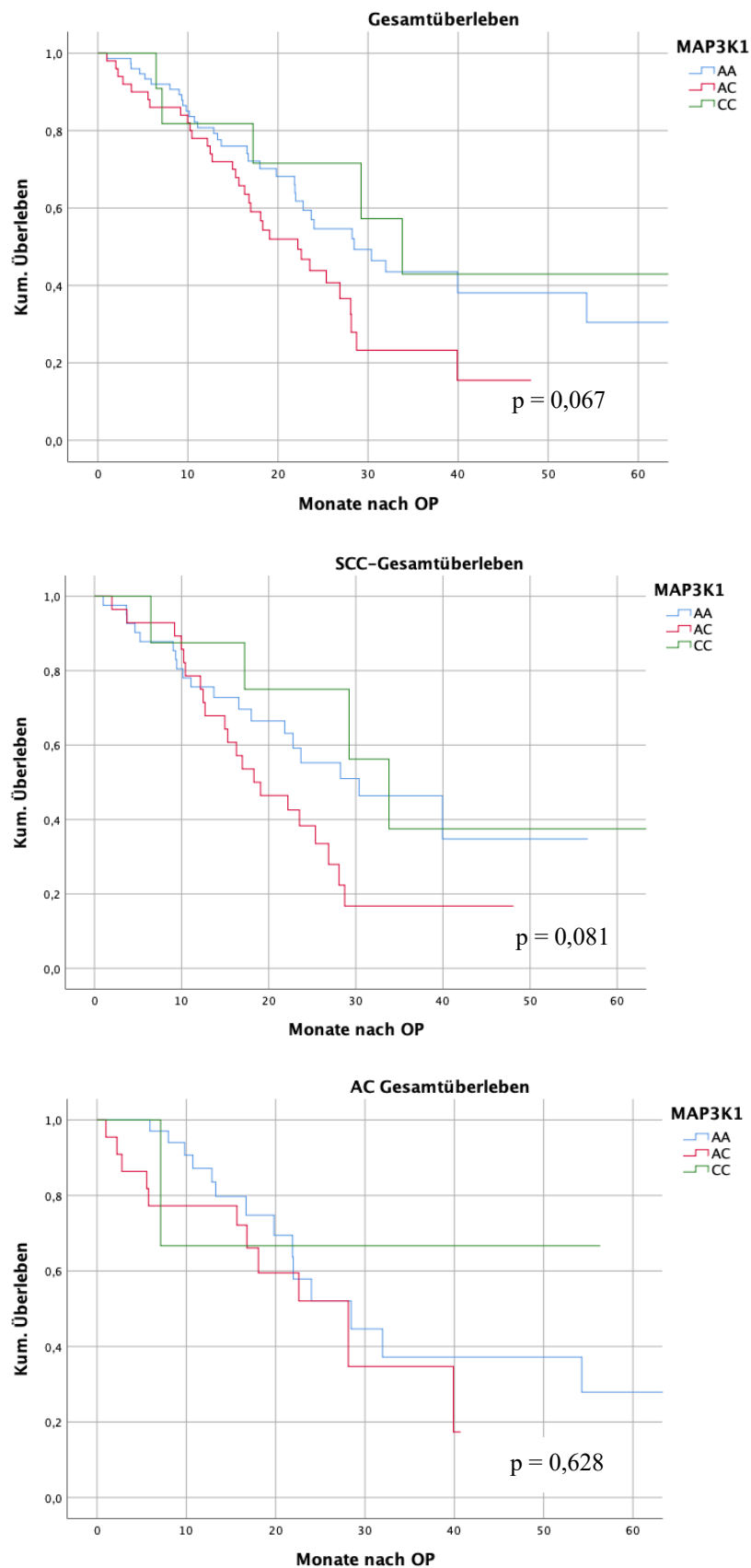


Abbildung 1: MAP3K1-Genotypen und das Gesamtüberleben

Gesamtüberleben														
MAP3K1	ges.				n	SCC			n	AC				
	n	Median	95%-CI	p-Wert		Me- din	95%-CI	p-Wert		n	Median	95%-CI	p-Wert	
AA	75	28,5	19,9-37,0		AA	41	30,4	15,9-44,9		AA	34	28,5	17,1-39,8	
AC	50	22,2	16,0-28,39		AC	28	18,3	10,9-25,8		AC	22	28,1	15,1-41	
CC	11	33,8	22,7-44,9		CC	8	33,8	24,1-43,5		CC	3	39,9	13,7-66,2	
ges.	136	26,9	22,2-31,5	0,067	ges.	77	25,4	19,9-30,9	0,081	ges.	59	28	20,3-35,9	0,628

Tabelle 2: MAP3K1-Genotypen und das Gesamtüberleben

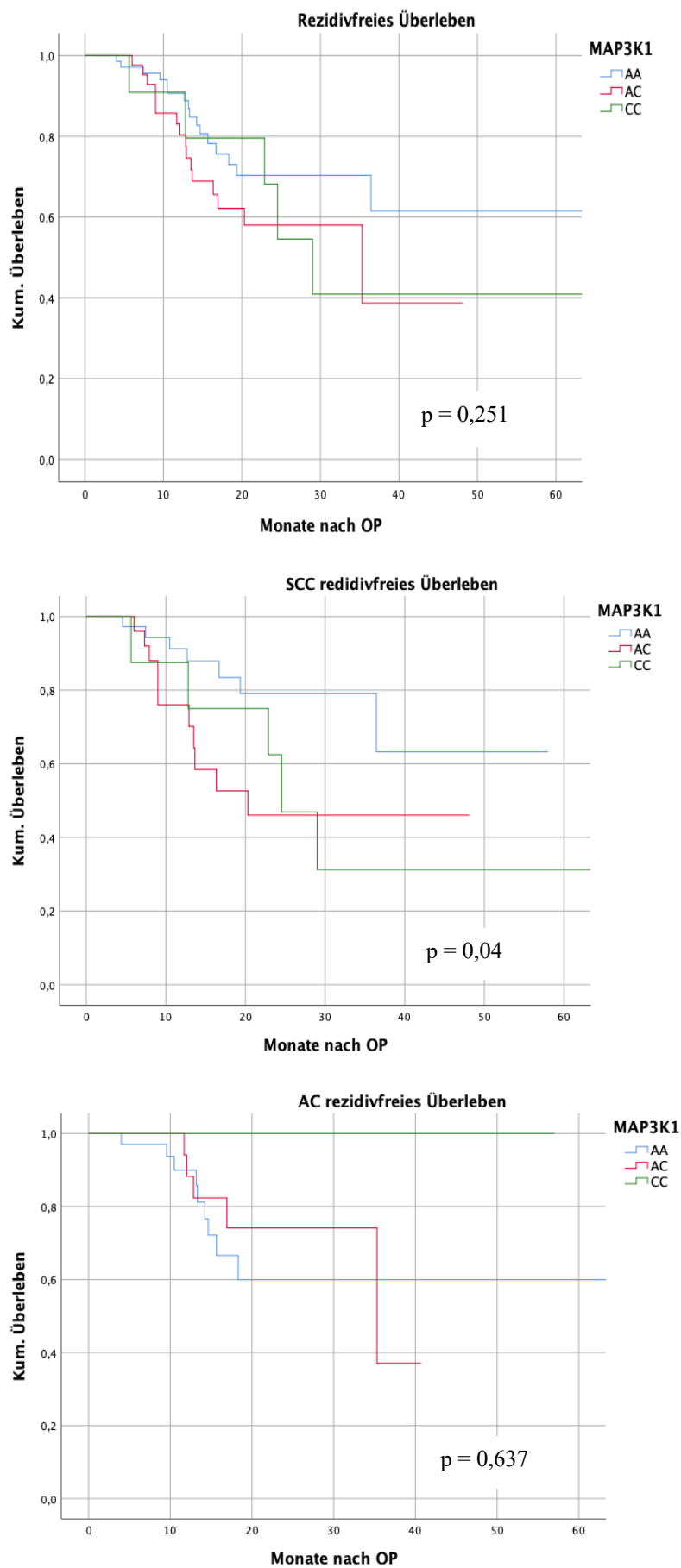


Abbildung 2: MAP3K1-Genotypen und rezidivfreies Überleben

rezidivfreies Überleben													
ges.					SCC					AC			
MAP3K1	n	Me- dian	95%-CI	p- Wert	n	Me- dian	95%-CI	p- Wert	n	Me- dian	95%-CI	p-Wert	
AA	75	61,1	49,0-73,24		AA 41	45,1	36,5-53,7		AA 34	57,9	42,2-73,8		
AC	50	35,3	9,8-60,9		AC 28	28,7	20,6-36,8		AC 22	35,3	9,3-61,4		
CC	11	29	21,3-36,7		CC 8	34,2	17,6-50,7		CC 3	zen- siert	zensiert		
ges.	136	54	45,7-63,7	0,251	ges. 77	42,3	34,5-50,0	0,04	ges. 59			0,637	

Tabelle 3: MAP3K1-Genotypen und rezidivfreies Überleben (Daten für AC sind bei nicht eintreten eines Rezidivs zensiert)

4.2.2 MAP3K1 SNP als unabhängiger prognostischer Faktor

Anhand einer Cox-Regression wurde der Einfluss der Polymorphismus auf das Überleben unter Berücksichtigung klinisch-pathologischer Parameter wie Alter, Geschlecht, Tumorstadium nach UICC, Lymphknotenstatus, Grading, dem Vorliegen von DTCs evaluiert.

Die Analyse ergab, dass der MAP3K1 ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Auftreten von Rezidiven im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ist (hazard ratio [HR] 1,9, 95% CI: 1,0-3,7, $p = 0.038$). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Adenokarzinom-Patienten. Hier konnte sich der untersuchte SNP rs889312 nicht als unabhängiger Faktor beweisen, weder für das Gesamtüberleben noch für das rezidivfreie Überleben. In der COX-RegreSSIONsanalyse zeigte sich der DTC-Status als ein starker unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben (HR 2,7, 95% CI: 1,6-4,6, $p < 0,0001$) und rezidivfreie Überleben (HR 5,5, 95% CI: 2,6-11,5, $p < 0,0001$) in der Gesamtpopulationen der Plattenepithel- und Adenokarzinomen.

Variable	ges. Tod			Re-zidiv			SCC Tod			Re-zidiv			AC Tod			Re-zidiv		
	HZ	95%-CI	p-Wert	HZ	95%-CI	p-Wert	HZ	95%-CI	p-Wert	HZ	95%-CI	p-Wert	HZ	95%-CI	p-Wert	HZ	95%-CI	p-Wert
Alter	0,8	0,5-1,3	0,3	0,5	0,2-0,9	0,028	0,8	0,4-1,5	0,5	0,5	0,2-1,2	0,1	0,6	0,2-1,6	0,3	0,3	0,08-0,98	0,046
Geschlecht	0,8	0,4-1,6	0,6	0,8	0,3-2,1	0,6	0,6	0,2-1,5	0,25	0,5	0,1-1,9	0,3	0,8	0,3-2,4	0,7	1,2	0,3-5,3	0,8
UICC Stadium	2	1,5-2,8	<0,0	1,4	0,8-2,5	0,3	1,4	0,9-2,4	0,19	1,2	0,6-2,6	0,6	2,9	1,8-4,7	<0,0	1,2	0,5-3,2	0,7
LK-Status	0,4	0,2-0,8	0,01	1,8	0,5-6,9	0,4	0,8	0,2-2,8	0,7	1,8	0,3-11,8	0,5	0,2	0,06-0,6	0,003	2,2	0,3-20,3	0,5
Grading	0,9	0,6-1,5	0,8	1,5	0,8-2,9	0,2	1	0,6-1,9	0,9	1,9	0,8-5,0	0,17	0,8	0,4-1,7	0,6	1,5	0,5-5,0	0,5
DTC	2,7	1,6-4,6	<0,0	5,5	2,6-11,5	<0,0	2,3	1,1-4,7	0,027	6,1	2,3-16,4	<0,0	3,6	1,5-8,7	0,005	4,6	1,5-14,6	0,01
MAP3K1	1,1	0,8-1,6	0,5	1,5	0,9-2,6	0,14	1	0,7-1,7	0,8	1,9	1,0-3,7	0,038	1,3	0,6-2,7	0,47	0,399	0,1-1,5	0,17

Tabelle 4: Multivariate Analyse für Tod und Rezidiv

5 Diskussion

Die weiterhin schlechte Prognose und steigende Inzidenz des Ösophaguskarzinoms hebt die Notwendigkeit hervor, die Diagnostik- und Vorhersagemethoden zu verbessern, welche essentiell für den Beginn einer personalisierten Therapie sind. (Pohl H und Welch HG 2005) Trotz der Verbesserungen des Managements und der Therapie des Ösophaguskarzinoms, im Rahmen der multimodalen Therapiekonzepte, bleibt das generelle Therapieergebnis, mit einer insgesamt 5-Jahresüberlebensrate von ca. 10% und 5-Jahresüberlebensrate nach Ösophagektomie mit ca. 15-40%, sehr schlecht. Das Ösophaguskarzinom wird häufig in lokal fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, in der Regel aufgrund des Fehlens von Frühsymptomen. Die meisten betroffenen Patienten benötigen anschließend umfangreiche Behandlungen mit Chemotherapie, Chemoradiotherapie, und oder chirurgischer Resektion. Patienten mit weit fortgeschrittenen oder metastasierten Ösophaguskarzinom bekommen eine palliative Therapie mit zytotoxischer Chemotherapie oder gegebenenfalls bei immunhistologischer Her2/neu-Positivität des Tumors eine Therapie mit Trastuzumab, einem Her2/neu-Antikörper. Darüber hinaus konnten erste Immunonkologische Therapien vielversprechende Resultate für das Plattenepithel- und Adenokarzinom des Ösophagus zeigen. (Kudo T et al. 2017, Doi T et al. 2016)

Biomarker können dem Behandler bei dieser Fragestellung wichtige Hilfestellung geben. Sie könnten Hinweise geben, ob ein Patient auf eine neoadjuvante, perioperative oder palliative Therapie anspricht oder überhaupt für eine solche in Frage kommt. Die Identifikation von Suszeptibilitätsgenen und Biomarkern kann dabei helfen das Ansprechen eine Therapie vorherzusagen und somit die Überlebensraten der betroffenen Patienten verbessern. (Talukdar FR et al. 2018)

Genomweite Assoziationsstudien haben Keimbahn-polymorphismen identifiziert, welche mit der individuellen Veranlagung zur Entstehung verschiedener Tumorentitäten assoziiert sind, darunter solide maligne Tumor der Schilddrüse, des Pankreas und der Brust. (Adjadj E et al. 2009, Easton DF et al. 2007, Hunter KW 2004, Couch FJ et al. 2009, Petersen GM et al. 2010, Amundadottir L et al. 2009) Darüber hinaus sind genomische Variationen auch in einigen pharmako-dynamischen und pharmako-kinetischen Studien untersucht worden, um Patienten zu identifizieren, welche wahrscheinlich Toxizität und Resistenzen gegenüber speziellen Medikamenten entwickeln. (DeMichele A et al. 2005,

Innocenti F et al. 2000, Innocenti F et al. 2004, Tanaka M et al. 2010, Okazaki T et al. 2009)

Im Jahr 2007 konnten Easton et al. in einer großen genomweite dreistufige Assoziationsstudie, zur Identifikation von unabhängigen SNPs für ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken, fünf vollständig neue Gen-Loci identifizieren. Dabei wurden in den ersten beiden Phasen dieser Studie 4398 Patientinnen und 4316 Kontrollen mit Hilfe von Microarrays auf insgesamt 227 876 000 SNPs untersucht. In der dritten Phase wurden die 30 signifikantesten SNPs an weiteren 21860 Fällen und 22578 Kontrollen aus 22 Studien getestet. (Easton DF et al. 2007) Interessanterweise ist keiner dieser Suszeptibilitätsgene aus vorherigen Assoziationsstudien bekannt gewesen. Insgesamt vier dieser SNPs lagen im Bereich bekannter Gene. (FGFR2, TNRC9, MAP3K1 und LSP1) Wie durch Easton DF et al. gezeigt werden konnte, korreliert das Auftreten des C-Allel des SNP rs889312 mit einem erhöhten Risiko für das Entstehen von Brustkrebs.

Nach Identifikation des SNP rs889312 und des C-Allels für ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken, ist diese Studie nun die erste, die den Einfluss vom MAP3K1 SNP rs889312 auf die klinisch-pathologischen Parameter und das klinische Outcome für Patienten mit einem Ösophaguskarzinom untersucht hat.

Der SNP rs889312 liegt auf dem Chromosom 5 im Bereich des MAP3K1-Gens. Die Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1 (MAP3K1) interagiert in der Signaltransduktionskaskade mit Ras, Raf, Mek und Erk. (Witosky JA und Johnson GL 2003, Xu S und Cobb MH 1997) Dabei kommt es unter dem SNP rs889312 nicht zu einem Strukturverlust von MAP3K1 und somit auch nicht zu Verlust der biochemischen Funktion, sondern zu vielmehr zu einer Modulation der MAP3K1-Expression und somit zu einer Veränderung der MAPK-Signaltransduktion. (Zheng Q et al. 2014) Die wohl wichtigste Funktion ist die Phosphorylierung und Aktivierung von der MAPK kinase (MAPK2), welche ihrerseits den MAPK/ERK-Komplex aktiviert und dadurch zahlreiche nachgeschaltete Tumorgenexpression beeinflusst. (Klinge CM et al. 2005) Die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) haben eine grundlegende Funktion in der Transmission von Signalen von der Zelloberfläche zum Zellkern. Dieser Prozess benötigt eine Kaskade von Phosphorylierungen insbesondere durch MAP3K1. (Davis RJ 2000, Chang L und Karin M 2001) Die Aktivierung der MAP-Kinasen resultiert in einer Translokation in den Zellkern, wo es durch eine Aktivierung und Deaktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einem durch das extrazelluläre Signal ausgelöste Beeinflussung der Genexpression führt. Aufgrund der Schlüsselrolle der MAP-Kinasen werden zahlreiche physiologische und

pathologische Prozesse, darunter auch Tumorzellwachstum und Tumorzellentwicklung, reguliert. (Davis RJ 2000, Chang L und Karin M 2001, Keshet Y und Seger R 2010, Kim EK Choi EJ 2010) Die Expression von MAP3K1 ist nicht gewebespezifisch, sondern kommt im Cytosol allen Zellen des menschlichen Organismus vor.

In unseren Ergebnissen zeigt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des AA-Genotyps und dem Auftreten eines Tumorrezidivs im Beobachtungszeitraum. Das Auftreten eines Rezidivs bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus korreliert signifikant mit dem Vorhandensein des C-Allel, d.h. Patienten mit einem AC- oder CC-Genotyp haben ein signifikant höheres Risiko ein Rezidiv zu bekommen im Vergleich zu Patienten mit einem AA-Genotyp. Auch in den Kaplan-Mayer Analysen für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus konnte statistisch signifikant gezeigt werden, dass Patienten mit einem AA-Genotyp ein längeres rezidivfreies Überleben haben.

Bisher konnte in verschiedenen klinischen Studien gezeigt werden, dass die Allelkonfiguration des SNP rs889312 nicht nur mit einem erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken einhergeht, sondern auch einen signifikanten Einfluss auf den klinischen Verlauf und die Prognose verschiedener Tumorentitäten hat. In Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Patientinnen mit einem hormonrezeptor-positiven Brustkrebs bei Vorliegen des CC-Genotyp ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben haben. (Kuo SH et al. 2017) Weitere Studien konnten den prognostischen Einfluss des SNP rs889312 auch auf das Magenkarzinom demonstrieren. (Xiaowei Wei et al. 2014, Yang J et al. 2019) Dabei hatten Patienten mit einem AC/CC-Genotyp ein signifikant reduziertes Gesamtüberleben im Vergleich zu AA-Genotyp Trägern. (Yang J et al. 2019) In dieser Studie wurden 575 Patienten mit einem Magenkarzinom eingeschlossen, welche primär in kurativer Intention operiert wurden. Nach erfolgter Operation erhielten 371 Patienten eine adjuvante Chemotherapie und 204 Patienten erhielten keine weitere Therapie. Die signifikante Assoziation des Gesamtüberlebens und dem SNP rs889312 konnte nur in der Kohorte der adjuvant behandelten Patienten beobachtet werden. Die Beobachtung des signifikant schlechteren Gesamtüberlebens der Patienten mit einem AC/CC-Genotyp kann in unserer Studie nicht dargestellt werden. Yang et al. kommen zu dem Schluss, dass MAP3K1 rs889312 ein prädiktiver Biomarker für das Ansprechen von

Patienten mit Magenkarzinom auf eine adjuvante Chemotherapie mit Cisplatin/Oxaliplatin ist. Diese Hypothese lässt sich auf das Ösophaguskarzinom übertragen. Basierend auf den Ergebnissen von Yang et al. könnte in weiterführenden Studien der Zusammenhang etablierter, neoadjuvanter und platinbasierter Therapiekonzepte mit dem prädiktiven bzw. prognostischen Einfluss durch rs889312 untersucht werden.

Darüber hinaus können wir in dieser Studie zeigen, dass das Vorliegen von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark ein starker unabhängiger prognostischer Faktor für das Ösophaguskarzinom ist. Das Gesamtüberleben von Patienten ist ohne DTCs zum Zeitpunkt der Operation mit einem Mittelwert von 42 vs. 20 Monate signifikant verlängert, im Vergleich zu den Patienten mit vorhandenen DTCs im Knochenmark. Der gleiche Trend konnte auch für das rezidivfreie Überleben gezeigt werden. Die Patienten mit dem Vorliegen von DTCs zum Zeitpunkt der Operation, haben nach einem signifikant kürzeren Intervall ein Rezidiv, als die Patienten ohne DTC. Dabei ist der DTC-Status ein stark unabhängiger prognostischer Faktor für das Ösophaguskarzinom (Tab. 4). Die Anwesenheit von DTC im Knochenmark von Ösophaguskarzinompatienten als unabhängigen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben und Rezidiventwicklung konnte bereits Macadam et al. nachweisen und durch weitere Forschungsgruppen bestätigt werden. (Thorban et al. 2000, Macadam et al. 2003, Vashist et al. 2012)

Das Vorhandensein von DTCs im Knochenmark, zeigt eine frühe, hämatologische Aussaat von Tumorzellen an, auch ohne den Nachweis eines messbaren Tumorbefalls. Dies kann darauf hindeuten, dass das Knochenmark ein wichtiges Reservoir für metastatische Zellen ist. Vom Knochenmark können diese Tumorzellen erneut in die Blutbahn rezirkulieren und zu Fernmetastasen oder Lokalrezidiven führen. (Kim MY et al. 2009, Chiang AC und Massague J 2008, O'Sullivan et al. 1997) Die DTCs scheinen sich an die Umgebung des Knochenmarks anzupassen und können so über lange Zeit überleben. (Pantel et al. 2008) Diese Hypothese hat einen wichtigen Einfluss auf die Gestaltung zukünftiger Studien, mit dem Ziel, diese Einnistung der DTCs im Knochenmarksmilieu zu verhindern oder zu beeinflussen. Aufgrund der primären Betrachtung des MAP3K1 SNP rs889312 in dieser Studie sind bezüglich der DTCs keine Subgruppenanalyse durchgeführt worden. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem SNP rs889312 Genotyp und dem DTC-Status zeigt sich jedoch nicht. (Tab.1) In den vergangenen Jahren konzentriert sich die klinische Forschung zunehmend auf die Bestimmung von zirkulierenden Tumorzellen im Blut (Circulating Tumor Cells, CTCs). Die Gewinnung der CTCs im klinischen Alltag ist

einfacher und weniger komplikativ im Vergleich zur Knochenmarkspunktion. Die Ergebnisse durch CTC für das Ösophaguskarzinom sind vergleichbar mit den der DTCs. (Reeh et al. 2015)

Wenngleich die Anzahl der Patienten für eine genetische Studie klein erscheint, ist die Assoziation zwischen dem SNP rs889312 und dem Auftreten eines Rezidivs und der rezidivfreien Zeit in unserer Studie für das Plattenepithelkarzinom signifikant. Insbesondere repräsentiert unsere Studie eine große homogene und nur chirurgisch behandelte Kohorte, welche den natürlichen Verlauf nach kompletter Resektion widerspiegelt.

Ein Schwachpunkt dieser Studie bleibt ihr retrospektiver Charakter, trotz dass die Blutproben präoperativ gesammelt wurden und die Patientendaten in einer prospektiven Datenbank zusammengeführt wurden. Darüber hinaus haben wir nicht die Proteinexpression von MAP3K1 als Marker für die Funktion im Tumorgewebe des Patienten untersucht. Dies bleibt weiterführenden Studien vorbehalten. Zudem vernachlässigt diese Untersuchung, dass auch andere Glieder der MAPK-Signalwege durch weitere Mutationen beeinflusst sein könnten und synergistische Effekte, die das Ergebnisse beeinflussen könnten.

Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse daraufhin, dass der SNP rs889312 ein unabhängiger prognostischer Marker für das rezidivfreie Überleben beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ist. Fortführende Studien mit dem Fokus auf den funktionalen Auswirkungen dieses MAP3K1-Polymorphismus im Ösophaguskarzinom sind notwendig, um die biologische Bedeutung diese Ergebnisse aufzuklären.

6 Zusammenfassung

Die Prognose von malignen Tumorerkrankungen ist für die betroffenen Patienten von herausragender Bedeutung. Beim Ösophaguskarzinom sind aktuell keine molekularpathologischen Prognoseparameter etabliert. Die anerkannten Prognoseparameter sind unter anderem die TNM-Klassifikation, der postoperative Resektionsstatus, Lymphgefäß- und Veneninvasion, der Tumorregressionsscore nach neoadjuvanter Therapie und auch das UICC-Stadium. Des Weiteren ist auch das erfolgreiche Downstaging nach neoadjuvanter Therapie ein starker unabhängiger prognostischer Faktor.

Einzel-Nukleotid-Keimbahnpolymorphismen sind leicht detektierbare und stabile genomische Varianten. Diese bleiben selbst nach einer Behandlung mit Radio-Chemotherapie in der Leukozyten-DNS aus peripheren Blutproben unverändert, auch wenn die DNS des Tumorgewebes teils starken Schwankungen unterliegen. Der MAP3K1-Polymorphismus, rs889312, wurde als Stadien abhängige Prognosefaktoren für das Ösophaguskarzinom evaluiert.

In dieser Studie konnte insbesondere für das Plattenepithelkarzinoms der Speiseröhre gezeigt werden, dass die betroffenen Patienten mit dem Vorliegen des AA-Genotyp signifikant weniger Rezidive im untersuchten Zeitraum entwickeln. Darüber hinaus konnte die Cox-Regression-Analyse für das rezidivfreie Überleben zeigen, dass der MAP3K1-Polymorphismus ein unabhängiger Prognosefaktor ist. Des Weiteren haben Patienten mit dem Vorliegen eines AA-Genotyps in der Gruppe der SCC-Patienten ein signifikant längeres, rezidivfreies Überleben. Für das Adenokarzinom des Ösophagus zeigt sich in dieser Untersuchung kein signifikanter Zusammenhang der klinisch-pathologischen Parameter und des gesamt- und rezidivfreien Überlebens mit dem MAP3K1-Polymorphismus.

Die diesen Ergebnissen zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen sind bisher nicht ausreichend evaluiert. Diesbezüglich besteht noch weiterer Forschungsbedarf, um in Zukunft wissenschaftlich fundierte und anwendbare Therapiekonzepte für das Ösophaguskarzinom zu entwickeln.

Summary

The prognosis of malignant tumor diseases is of tremendous importance for the affected patients. No molecular pathological prognostic parameters are currently established for esophageal carcinoma. The recognized prognostic parameters include the TNM classification, the postoperative resection status, lymphatic and venous invasion, the tumor regression score after neoadjuvant therapy and also the UICC stage. Furthermore, successful downstaging after neoadjuvant therapy is a strong, independent prognostic factor.

Single nucleotide germline polymorphisms are easily detectable and stable genomic variants. These remain unchanged even after treatment with radio-chemotherapy in the leukocyte DNA from peripheral blood samples, even if the DNA of the tumor tissue is sometimes subject to strong fluctuations. The MAP3K1 polymorphism, rs889312, was evaluated as stage-dependent prognostic factors for esophageal carcinoma.

In this study, in particular for squamous cell carcinoma of the esophagus, it could be shown that the affected patients with the presence of the AA genotype developed significantly fewer recurrences in the examined period. In addition, the Cox regression analysis for relapse-free survival showed that the MAP3K1 polymorphism is an independent prognostic factor. Furthermore, patients with an AA genotype in the group of SCC patients have a significantly longer, recurrence-free survival. For this adenocarcinoma of the esophagus there was no significant correlation between the clinical-pathological parameters and the overall and recurrence-free survival with the MAP3K1 polymorphism.

The pathophysiological mechanisms on which these results are based have not yet been sufficiently evaluated. In this regard, there is still a need for further research to develop scientifically profound and applicable therapy concepts for esophageal carcinoma in the future

II Abkürzungsverzeichnis

AA	Genotyp AA, zwei lange Allele
AC	Adenocarcinoma
AC	Genotyp AC, ein langes und ein kurzes Allel
ALK	Anaplastische-Lymphomkinase
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
CC	Genotyp CC, zwei kurze Allele
CI	Confidence interval
CROSS	The ChemoRadiotherapy for Esophageal cancer followed by Surgery Study
CT	Computertomographie
CTC	Circulating tumor cell
DFS	Disease-free survival
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTC	Dissaminated tumor cell
EDTA	Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular-Signal Regulated Kinase
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2
FLOT	5-Fluorouracil, Folinsäure, Oxaliplatin, Docetaxel
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HR	Hazard ratio
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
LK	Lymphknoten
LSP1	Lymphocyte Specific Protein 1
MAGIC	Medical Research Council Adjuvant Gastric Infusional Chemotherapy
MAP	Mitogen-activated protein
MAP3K1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen
OS	Overall survival
PCR	Polymerase chain reaction
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
Raf	Rapidly growing fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SNP	Single-nucleotide polymorphism
TGFβR	Transforming Growth Factor beta Rezeptor
TNRC9	Trinucleotide-repeat-containing 9
UICC	Union internationale contre le cancer

III Literaturverzeichnis

Adjadj E, Schlumberger M, de Vathaire F (2009)

Germ-line DNA polymorphisms and susceptibility to differentiated thyroid cancer. *Lancet Oncol.* 10(2): 181-90.

Al-Batran SE, Hofheinz RD, Pauligk C, Kopp HG, Haag GM, Luley KB, Meiler J, Homann N, Lorenzen S, Schmalenberg H, Probst S, Koenigsmann M, Egger M, Prasnikar N, Caca K, Trojan J, Martens UM, Block A, Fischbach W, Mahlberg R, Clemens M, Illerhaus G, Zirlik K, Behringer DM, Schmiegel W, Pohl M, Heike M, Ronellenfitsch U, Schuler M, Bechstein WO, Königsrainer A, Gaiser T, Schirmacher P, Hozaeel W, Reichart A, Goetze TO, Sievert M, Jäger E, Mönig S, Tannapfel A (2016)

Histopathological regression after neoadjuvant docetaxel, oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil or capecitabine in patients with resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4-AIO): results from the phase 2 part of a multicentre, open-label, randomised phase 2/3 trial. *Lancet Oncol.* 17(12):1697-1708.

Amundadottir L et al. (2009)

Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet.* 41(9): 986-90.

Becker K, Mueller JD, Schulmacher C, Ott K, Fink U, Busch R, Böttcher K, Siewert JR, Höfler H (2003)

Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer.* 98(7):1521-30.

Bollschweiler E, Baldus SE, Schröder W, Schneider PM, Hölscher AH (2006)

Staging of esophageal carcinoma: length of tumor and number of involved regional lymph nodes. Are these independent prognostic factors? *J Surg Oncol.* 94(5): 355-63.

Bracht K (2009)

Biomarker - Indikation für Diagnose und Therapie. *Pharmazeutische Zeitung Online.* Ausgabe 12.

Braun S, Pantel K (2000)

Diagnosis and clinical significance of disseminated tumor cells in bone marrow. *Dtsch Med Wochenschr.* 125(41):1237-9.

Brookes AJ (1999)

Gene 1999. Vol. 234. 177-186.

Burtin P, Bouche O, Giovannini M, Pelletier M, Conroy T, Ruget O, Arsène D, Milian C, Bedenne L (2008)

Endoscopic ultrasonography is an independent predictive factor of prognosis in locally advanced esophageal cancer. Results from the randomized FFCD 9102 study from the Federation Francophone de Cancerologie Digestive. Gastroenterol Clin Biol. 32(3): 213-20.

Capon F, Allen MH, Ameen M, Buren AD, Tillman D, Barker JN, Trembath RC (2004)

A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. Hum Mol Genet. 13(20): 2361-8.

Chang L, Karin M (2001)

Mammalian MAP kinase signaling cascades. Nature. 410(6824):37-40.

Chiang AC, Massague J (2008)

Molecular basis of metastasis. N Engl J Med. 359: 2814–2823.

Couch FJ, Wang X, Mcilliams RR, Bamlet WR, de Andrade M, Petersen GM (2009)

Association of breast cancer susceptibility variants with risk of pancreatic cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 18(11): 3044-8

Cunningham D, Allum WH, Stenning SP et al. (2006)

Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. N Eng J Med. 355: 11-20.

DeMichele A, Aplenc R, Botbyl J, Colligan T, Wray L, Klein-Cabral M, Foulkes A, Gimotty P, Glick J, Weber B, Stadtmauer E, Rebbeck TR (2005)

Drug-metabolizing enzyme polymorphisms predict clinical outcome in a node-positive breast cancer cohort. J Clin Oncol. 23(24): 5552-9.

Davis RJ (2000)

Signal transduction by the JNK group of MAP Kinases. Cell. 103(2): 239-52

Davies AR, Ossage JA, Zylstra J, Mattsson F, Lagergren J, Maisey N, Smyth EC, Cunningham D, Allum WH, Mason RC (2014)

Tumor stage after neoadjuvant chemotherapy determines survival after surgery for adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. J Clin Oncol 32(27): 2983-90.

- Doi T, Piha-Paul SA, Jalal SI, Mai-Dang H et al. (2016)
Updated results for the advanced esophageal carcinoma cohort of the phase Ib KEYNOTE-028 study of pembrolizumab (MK-3475). *Journal of Clinical Oncology*. 34: 4046-4046
- Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saiton N, Sanders AR, Gelernter J, Gejman PV (2003)
Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet*. 12(3): 205-16.
- Easton DF et al. (2007)
Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*. 447(7148): 1087-93.
- Engel LS, Chow WH, Vaughan TL, Gammon MD, Risch HA, Stanford JL, Schoenberg JB, Mayne ST, Dubrow R, Rotterdam H, West AB, Blaser M, Blot WJ, Gail MH, Fraumeni JF Jr. (2003)
Population attributable risks of esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst*. 95(18): 1404-13.
- Enzinger PC und Mayer RJ (2003)
Esophageal cancer. *N Engl J Med*. 349(23): 2241-52
- Fareed, KR, Kaye P, Soomro IN, Ilyas M, Martin S, Parson SL, Madhusudan S (2009)
Biomarker of response to therapy in oesophageal-gastric cancer. *Gut*. 58(1): 127-43.
- Garcia-Closas M, Chanock S (2008)
Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor status. *Clin Cancer Res*. 14: 8000–8009.
- Gebski V, Burmeister B, Smithers BM, Foo K, Zalcberg J, Simes J (2007)
Survival benefits from neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy in oesophageal carcinoma: a meta-analysis. *Lancet Oncol*. 8(3): 226-34.
- Greil R, Stein HJ (2007)
Is it time to consider neoadjuvant treatment as the standard of care in oesophageal cancer? *Lancet Oncol*. 8(3): 189-90.
- Hermanek P (1999)
Tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: histopathology, staging and prognosis. *Anticancer Res*. 19(4a): 2393-6.

Höscher AH, Bollschweiler E, Bogoevski D et al. (2014)

Prognostic impact of neoadjuvant chemoradiation in cT3 oesophageal cancer- a propensity score matched analysis. *Eur J Cancer*. 50: 29050-2957.

Huijts, PE, Vreeswijk MP, Kroeze-Jansema KH, Jacobi CE, Seynaeve C, Krol-Warmerdam EM, Wijers-Koster PM, Blom JC, Pooley KA, Klijn JG, Tolleaar RA, Devilee P, van Asperen CJ (2007)

Clinical correlates of low-risk variants in FGFR2, TNRC9, MAP3K1, LSP1 and 8q24 in a Dutch cohort of incident breast cancer cases. *Breast cancer res*. 9(6): R78.

Hunter KW (2004)

Host genetics and tumour metastasis. *Br. J Cancer*. 90(4): 752-5.

Innocenti F, Iyer L, Ratain MJ (2000)

Pharmacogenetics: a tool for individualizing antineoplastic therapy. *Clin Pharmacokinet*. 39(5): 315-25.

Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, Karrison T, Janisch L, Ramirez J, Rudin CM, Vokes EE, Ratain MJ (2004)

Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol*. 22(8): 1382-8.

Jara L, Gonzalez-Hormazabal P, Cerceno K, Di Capua GA, Reyes JM, Blanco R, Brova T, Peralta O, Gomez F, Waugh E, Margarit S, Ibanes G, Romero C, Pakomio J, Roizen G (2013)

Genetic variants in FGFR2 and MAP3K1 are associated with the risk of familial and early-onset breast cancer in a South- American population. 2013 *Breast Cancer Res Treat*. 137(2): 559-69.

Langer R, Becker K, Zlobec I, Gertler R, Sisic L, Büchler M, Lordick F, Slotta-Huspenina J, Weichert W, Höfler H, Feith M, Ott K (2014)

A multifactorial histopathologic score for the prediction of prognosis of resected esophageal adenocarcinomas after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 21(3):915-21.

Kato H et al. (1993)

Evaluation of the new (1987) TNM classification of thoracic esophageal tumors. *Int J Cancer*. 53(2): 220-3

- Katsonis P, Koire A, Wilson SJ, Hsu TK, Lua RC, Wilkins AD, Lichtarge O (2014)
Single nucleotide variations: biological impact and theoretical interpretation.
Protein Sci. 23(12):1650-66.
- Keshet Y, Seger R (2010)
The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions, Methods Mol Biol. 661: 3-38.
- Kim EK, Choi EJ (2010)
Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases., Biochim Biophys Acta. 1802(4): 396-405.
- Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S (2009)
Tumor self-seeding by circulating cancer cells. Cell. 139: 1315–1326.
- Kim TJ, Kim HY, Lee KW, Kim MS (2009)
. Radiographics. 29(2): 403-21.
- Kirby R (2016)
The role of PSA in detection and management of prostate cancer. Practitioner. 260(1792):17-21, 3.
- Kline Cm, Blankenship KA, Risinger KE, Bhatnagar S, Noisin EL (2005)
Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptor alpha and beta in endothelial cells. J Biol Chem. 280: 7460-7468.
- Kraft P, Pharoah P, Chanock SJ, et al. (2005)
Genetic variation in the HSD17B1 gene and risk of prostate cancer. PLoS Genet. 1(5): e68
- Kudo T, Hamamoto Y, Kato K, Ura T, Kojima T, Tsushima T, Hironaka S, Hara H, Satoh T, Iwasa S, Muro K, Yasui H, Minashi K, Yamaguchi K, Ohtsu A¹, Doki Y, Kitagawa Y (2017)
Nivolumab treatment for oesophageal squamous-cell carcinoma: an open-label, multicentre, phase 2 trial. Lancet Oncol. 18(5): 631-639)
- Kuo SH, Yang SY, You SL, Lien HC, Lin CH, Lin PH, Huang CS (2017)
Polymorphisms of ESR1, UGT1A1, HCN1, MAP3K1 and CYP2B6 are associated with the prognosis of hormone receptor-positive early breast cancer. Oncotarget. 8(13): 20925-20938.

- Kutup A, Link BC, Schurr PG, Strate T, Kaifi JT, Bubenheim M, Seewald S, Yekebas EF, Soehendra N, Izbicki JR (2007)
Quality control of endoscopic ultrasound in preoperative staging of esophageal cancer. *Endoscopy*. 39(8): 715-9.
- Lech G, Słotwiński R, Słodkowski M, Krasnodębski IW (2016)
Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World J Gastroenterol*. 22(5): 1745-55.
- Ludwig WD (2012)
Möglichkeiten und Grenzen der stratifizierenden Medizin am Beispiel von prädiagnostischen Biomarkern und „zielgerichteter“ medikamentöser Therapien in der Onkologie. *Zeitschrift für Evidenz, Fortbildung und Qualität im Gesundheitswesen*. 106(1): 11-22.
- Macadam R, Sarela A, Wilson J, MacLennan K, Guillou P (2003)
Bone marrow micrometastases predict early post-operative recurrence following surgical resection of oesophageal and gastric carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 29(5): 450–454.
- Markham AF (1993)
The polymerase chain reaction: a tool for molecular medicine. 306(6875):441-6.
- Meyer KB, Maia AT, O'Reilly M, Teschendorff AE, Chin SF, Caldas C, Ponder BA (2008)
Allel-specific up-regulation of FGFR2 increase susceptibility to breast cancer. *PLoS Biol*. 6(5): e108.
- Minden A, Lin A, McMahon M, Lange-Carter, Dériard B, Davis RJ, Johnson GL, Karin M (1994)
Differential activation of ERK und JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*. 266 (5191): 1719-23.
- Okazaki T, Javle M, Tanaka M, Abbruzzese JL, Li D (2009)
Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. *Clin Cancer Res*. 16(1): 320-9.
- O'Sullivan GC, Collins JK, Kelly J (1997)
Micrometastases: marker of metastatic potential or evidence of residual disease? *Gut*. 40: 512–515.
- Pantel K, Brakenhoff RH (2004)
Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*. 4(6): 448–456.

- Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt, B (2008)
Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature reviews. Cancer*, 8(5): 329–40.
- Pennathur A, Gibson MK, Jobe BA et al. (2013)
Oesophageal carcinoma. *Lancet*. 381: 400-412.
- Petersen GM, Amundadottir L, Fuchs CS, et al. (2010)
A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33. *Nat Genet*. 42(3): 224-8.
- Pfarr N, Katja Specht K, Weichert W (2017)
Bestimmung molekularer Biomarker in der Behandlung solider Tumoren: Methodik und Verlässlichkeit, *Forum*. 32(3): 222-229.
- Pohl H, Welch HG (2005)
The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. *J Natl Cancer Inst*. 97(2): 142-6.
- Rebeck TR, DeMichele A, Tran TV, Panossian S, Bunin GR, Troxel AB, Strom BL (2009)
Hormone-dependent effects of FGFR2 and MAP3K1 in breast cancer susceptibility in a population-based sample of post-menopausal African-American and European-American women. *Carcinogenesis*. 30: 269–274.
- Reh M, Effenberger KE, Koenig AM, Riethdorf S, Eichstädt D, Vettorazzi E, Uzunoglu FG, Vashist YK, Izicki JR, Pantel K, Bockhorn M. (2015)
Circulating Tumor Cells as a Biomarker for Preoperative Prognostic Staging in Patients With Esophageal Cancer. *Ann Surg*. 261(6): 1124-30.
- Robert Koch Institut (2013)
Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregisters in Deutschland e.v. (Hrsg). Berlin 2013
[Online im Internet] URL:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/vergangene_ausgaben/downloads/krebs_in_deutschland_9.pdf?__blob=publicationFile [Stand: 05.04.2020]
- Robinson MJ, Cobb MH (1997)
Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 9(2):180-6.

Roukkos DH, Murray S, Briasoulis E (2007)

Molecular genetic tools shape a roadmap towards a more accurate prognostic prediction and personalized management of cancer. *Cancer Biol Ther.* 6(3): 308-12.

Schurr P, Wolter S, Kaifi J, Reichelt U, Kleinhans H, Wachowiak R, Yekebas, Strate T, Kalinin V, Simon R, Sauter G, Schaefer H, Izbicki JR (2006)

Microsatellite DNA alterations of gastrointestinal stromal tumors are predictive for outcome. *Clin Cancer Res.* 12(17): 5151-7.

Schlesinger TK, Fanger GR, Yujiri T, Johnson GL (1998)

The TAO of MEKK. *Front in Biosci.* 3: D1181-6.

Schlesinger TK, Bonvin C, Jarpe MB, Fanger GR, Cardinaux JR, Johnson GL, Widmann C (2002)

Apoptosis stimulated by the 91-kDa caspase cleavage MEKK1 fragment requires translocation to soluble cellular compartments. *J. Biol. Chem.* 277(12): 10283-10291.

Shapiro J, van Lanschot JJ, Hulshof MC et al. (2015)

Neoadjuvant chemoradiotherapy plus surgery versus surgery alone for esophageal or junctional cancer (CROSS): long-term results of a randomized trials. *Lancet Oncol.* 16: 1090-1098

Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013)

Cancer Statistics 2013. *CA Cancer J Clin.* 63: 11-30.

Smyth EC, Lagergren J, Fitzgerald RC, Lordick F, Shah MA, Lagergren P, Cunningham D (2017)

Oesophageal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 3:17048.

Straton MR, Rahman N (2008)

The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat Genet.* 40(1): 17-22

Stoecklein NH, Hosch SB, Bezler M, et al. (2008)

Direct genetic analysis of single disseminated cancer cells for prediction of outcome and therapy selection in esophageal cancer. *Cancer Cell.* 13: 441-453.

Suddason T, Gallagher E (2015)

A RING to Rule them all? Insights into the Map3k1 PHD motif provide a new Mechanistic understanding into the diverse roles of Map3k1. *Cell Death and Differentiation.* 22(4): 540-8.

- Talukdar FR, di Pietro M, Secrier M, Moehler M, Goepfert K, Lima SSC, Pinto LFR, Hendricks D, Parker MI, Herceg Z (2018)
- Molecular landscape of esophageal cancer: implications for early detection and personalized therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1434(1):342-359.
- Tanaka M, Javle M, Dong X, Eng C, Abbruzzese JL, Li D (2010)
- Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Cancer.* 116(22): 5325-35.
- Tierney MJ, Medcalf RL (2001)
- Plasminogen activator inhibitor type 2 contains mRNA instability elements within exon 4 of the coding region. Sequence homology to coding region instability determinants in other mRNAs. *J Biol Chem.* 276(17): 13675-84.
- Thorban S, Rosenberg R, Busch R, Roder RJ (2000)
- Epithelial cells in bone marrow of oesophageal cancer patients: a significant prognostic factor in multivariate analysis. *British journal of cancer.* 83(1): 35-9.
- Thrift AP (2016)
- The epidemic of esophageal carcinoma: Where are we now? *Cancer Epidemiology.* 41: 88-95.
- Van Hagen P, Hulshof MC, van Lanschot JJ et al.
- Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N Eng J Med.* 366: 2074-2084.
- Vashist YK, Effenberger KE, Vettorazzi E, Riethdorf S, Yekebas EF, Izbicki JR, Pantel K (2012)
- Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow and the Natural Course of Resected Esophageal Cancer. *Annals of Surgery.* 255(6): 1105–1112.
- Wikman H, Vessella R, Pantel K (2008)
- Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *APMIS.* 116: 754–770.
- Witowski JA, Johnson GL (2003)
- Ubiquitylation of MEKK1 inhibits its phosphorylation of MEKK1 and MKK4 and activation of the ERK1/2 and JNK pathways. *J Biol Chem.* 278: 1403-1406.
- Yang J, Zheng W, Xu Z, Chen J (2019)
- MAP3K1 rs889312 genotypes influence survival outcomes of Chinese gastric cancer patients who received adjuvant chemotherapy based on platinum and fluorouracil regimens. *Onco Targets Ther.* 12: 6843-6855.

- Xiaowei Wei, Enke Zhang, Chun Wang, Dongying Gu, Lili Shen, Meilin Wang, Zhi Xu, Weida Gong, Cuiju Tang, Jinglong Gao, Jinfei Chen, Zhengdong Zhang (2014)
A MAP3K1 SNP Predicts Survival of Gastric Cancer in a Chinese population.
PLoS One. 9(4): e96083
- Xu S, Cobb MH (1997)
MEKK1 bind directly to the c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases. J Biol Chem. 272: 32056-32060.
- Xue Z, Vis DJ, Bruna A, Sustic T, van Wageningen S, Batra AS, Rueda OM, Bosdriesz E, Caldas C, Wessels LFA, Bernards R (2018)
MAP3K1 and MAP2K4 mutations are associated with sensitivity to MEK inhibitors in multiple cancer models. Cell Res. 28(7): 719-729.
- Zheng Q, Ye J, Wu H, Yu Q, Cao J (2014)
Association between mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis of 20 case-control studies. PLoS One. 9(3): 290771.

IV Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki für die Möglichkeit der Durchführung dieser Studie in der von ihm geleiteten Klinik.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Matthias Reeh und Priv.-Doz. Dr.med. Yogesh Vashist für die Betreuung während der Arbeit an dieser Dissertation.

Herrn Prof. Viacheslav Kalinin und dem Team des chirurgischen Forschungslabors für die Einführung und Hilfe bei den experimentellen Arbeiten.

Meiner Freundin Silvina, für tatkräftige Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Mutter Anita, für all die menschliche und nicht zuletzt auch finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums.

V Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.



VI Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: