

**Chirurgische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar der
Technischen Universität München**

**Expressionsanalyse der Prostaglandin-E-Synthase des
Adenokarzinoms des distalen Ösophagus
auf mRNA-Ebene**

Stefan Andreas Hartl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

- 1. Priv.-Doz. Dr. K. Ott**
- 2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend** (schriftliche Beurteilung)
- 2. Univ.-Prof. Dr. A. A. Perren** (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 05.06.2007 bei der Technischen Universität eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.10.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1 Cyclooxygenasen (COX-1, COX-2)
- 1.2 COX-Inhibition und seine Konsequenzen
- 1.3 Prostaglandin E und Prostaglandin-E-Synthase
- 1.4 Transforming growth factor β
- 1.5 Überlebensraten
- 1.6 Angiogenese und Lymphangiogenese
- 1.7 Zielsetzung

2. Material und Methoden

- 2.1 Analyse der Mikrogefäßdichte
 - 2.1.1 Tissue-Arrays
 - 2.1.2 Immunhistochemie
 - 2.1.2.1 Antikörper
 - 2.1.2.2 Durchführung
 - 2.1.3 Morphometrische Analyse
- 2.2 Quantitative Expressionsanalyse der Prostaglandin-E-Synthase
 - 2.2.1 Mikrodissektion
 - 2.2.2 Lysebehandlung der Zellen
 - 2.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion
 - 2.2.4 RNA-Fällung
 - 2.2.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)
 - 2.2.6 Real-time quantitative PCR (RT-PCR), allgemeine Technik
 - 2.2.7 Real-time quantitative PCR (RT-PCR), unsere Anwendung
 - 2.2.8 Verarbeitung der erhobenen Daten
- 2.3 Statistische Tests
 - 2.3.1 Spearman's Rho Test
 - 2.3.2 Mann-Whitney-Test (U-Test)
 - 2.3.3 Univariate Überlebensanalyse

3. Ergebnisse

- 3.1 PGES-Expression auf mRNA-Ebene (Quantitative RT-PCR)
- 3.2 Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern
- 3.3 Korrelation mit dem Survival

4. Diskussion

- 4.1 Cyclooxygenasen und PGES
- 4.2 TGF β und PGES
- 4.3 VEGF-A/VEGF-C und PGES
- 4.4 Microvessel-Density
- 4.5 Univariate Überlebensanalyse
- 4.6 Klinische Implikationen / Anwendung

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Lebenslauf

8. Erklärung

1. Einleitung

Aufgrund des alarmierenden Anstiegs seiner Inzidenz gewinnt das Adenokarzinom des distalen Ösophagus zunehmend an Bedeutung. Es handelt sich dabei insbesondere um eine Erkrankung der westlichen Welt (von Rahden et al., 2003). Seit Mitte der 70-er Jahre hat sich seine Häufigkeit – insbesondere bei weißen Männern ab dem fünften Lebensjahrzehnt – mehr als versechsfacht. Der relative Anstieg der Inzidenz von Tumoren dieser Entität überragt jene von Melanomen, Brust- oder Prostatatumoren (Devesa et al., 1998; Pohl et Welch, 2005). Es handelt sich hierbei um einen echten Inzidenzanstieg.

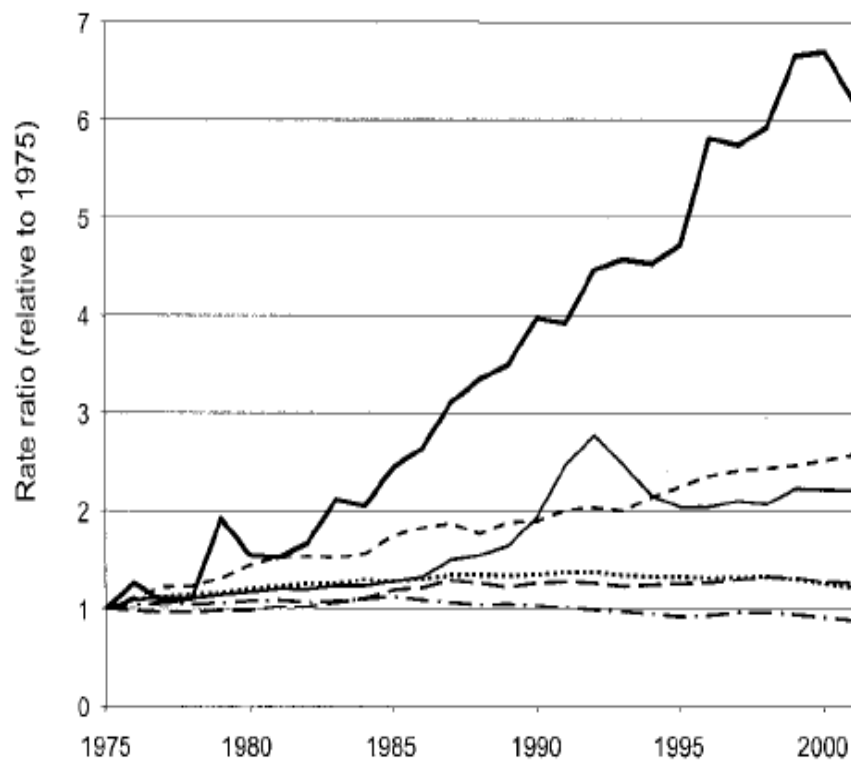


Abb. 1 Relative Veränderung der Inzidenz von ösophagealen Adenokarzinomen und anderen Tumoren. Die Daten entstammen dem „National Cancer Institute’s Surveillance, Epidemiology, and End Results Program“ orientiert an der amerikanischen Standardbevölkerung von 2002. Die Baseline entspricht der durchschnittlichen Inzidenz von 1973 bis 1975. **Dicke schwarze Linie:** Adenokarzinome des Ösophagus. **Kurz gestrichelte Linie:** Melanome. **Feine schwarze Linie:** Prostata-CA. **Gestrichelte Linie:** Brustkrebs. **Gepunktete Linie:** Lungenkrebs. **Punkte und Striche:** Kolorektales Karzinom. *Quelle: Pohl et al., 2005.*

Im Patientengut der chirurgischen Klinik des Klinikum rechts der Isar wird beim Adenokarzinom des distalen Ösophagus eine stetig ansteigende Prävalenz verzeichnet (Siewert et al., 2001). Mittlerweile übertrifft das Barrett-Karzinom an

Häufigkeit sogar das vormals prädominante Plattenepithelkarzinom. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Diagnose liegt beim Adenokarzinom des distalen Ösophagus und ösophago-gastralen Übergangs bei etwa 63 Jahren. Es liegt damit etwa 10 Jahre höher als beim Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre.

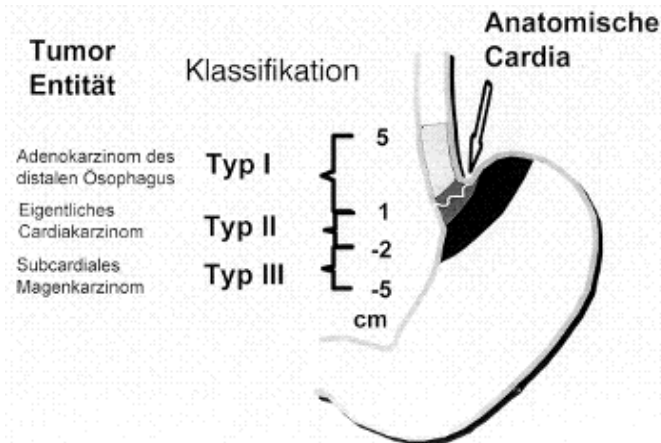


Abb. 2: Klassifikation der Adenokarzinome des ösophago-gastralen Übergangs nach topographischen Gesichtspunkten

Zumeist handelt es sich bei den Adenokarzinomen des distalen Ösophagus um Barrett-Karzinome (90%), die auf dem Boden eines präkanzerösen Barrett-Ösophagus unter dem chronisch schädigenden Einfluss von gastro-ösophagealem Reflux (Gastroesophageal Reflux Disease, GERD) entstehen. 5-10% der Patienten mit GERD entwickeln einen Barrett-Ösophagus. In den vergangenen Jahren wurde eine Zunahme der Inzidenz des Barrett-Ösophagus verzeichnet (van Soest et al., 2005). Letzterer entartet maligne mit einem geschätzten Risiko von 0,5% pro Patient und Jahr (Shaheen et al., 2000; Spechler, 2003). Die Diagnose von Metaplasie und Karzinom erfolgt endoskopisch unter Biopsieentnahme und anschließender histologischer Aufarbeitung (Spechler, 2002). Dabei handelt es sich um eine spezialisierte intestinale Metaplasie, die durch eine (low-grade/high-grade) Sequenz intraepithelialer Neoplasien (Vorstufen eines Adenokarzinoms) in einen invasiven Tumor übergeht (Spechler, 2002; Montgomery et al., 2001; von Rahden et al., 2003). Dies ist ein idealisiertes Modellkonstrukt; nicht alle „Mutationsetappen“ sind bei jedem Patienten vollständig ausgeprägt. Die Karzinogenese beim Barrett-Ösophagus beinhaltet die Anhäufung von DNA-Abnormitäten. Letztere befähigen Zellen dazu, 1. ihre eigenen Wachstumssignale auszusenden, 2. wachstumshemmende Faktoren zu ignorieren, 3. Apoptose zu vermeiden, 4. sich unbegrenzt zu teilen, 5. die

Angiogenese zu beeinflussen und 6. invasiv in neue Lokalisationen einzuwachsen (Hanahan et al., 2000; Morales et al., 2002; Spechler, 2005). Einige dieser genetischen Veränderungen wurden bereits – als Ergänzung zur Morphologie – für Screening und Überwachung von Patienten mit Barrett-Ösophagus vorgeschlagen (Werner et al., 1999). Zu den Auffälligkeiten bei Barrett-Metaplasie und Barrett-Karzinom zählt eine homozygote Deletion im FHIT-Genlocus (fragile histidine triad gene), einem mutmaßlichen Tumorsuppressorgen – mit veränderter FHIT-Gentranskription (Michael et al., 1997). Mutationen von p53 scheinen sich im Übergang von niedrig- zu hochgradigen Dysplasien zu häufen. Die Ausschaltung anderer Tumorsuppressorgene durch Mutation (APC, p16) oder Hypermethylierung (p16), sowie die Amplifikation von Onkogenen (wie *cerbB2*) sind relativ späte Ereignisse in der Entwicklung zum Adenokarzinom (Werner et al., 1999; Morales et al., 2002).

Magensäure und Pepsin initiieren den Vorgang der Metaplasie durch mukosale Verletzungen. Sie sind beide Bestandteile des Refluxats. Gallensäuren, biläres Lysolecithin, sowie pankreatisches Trypsin stehen im Verdacht zusätzlich kanzerogenen Einfluss auszuüben (Kaur et al., 2002).

Sodbrennen, Regurgitation und jahrelange Beschwerden führen zu einer Zunahme des Erkrankungsrisikos am Adenokarzinom des distalen Ösophagus (Faktor bis zu 43,5) und der Kardia (Faktor bis zu 4,4; Lagergren et al., 1999).

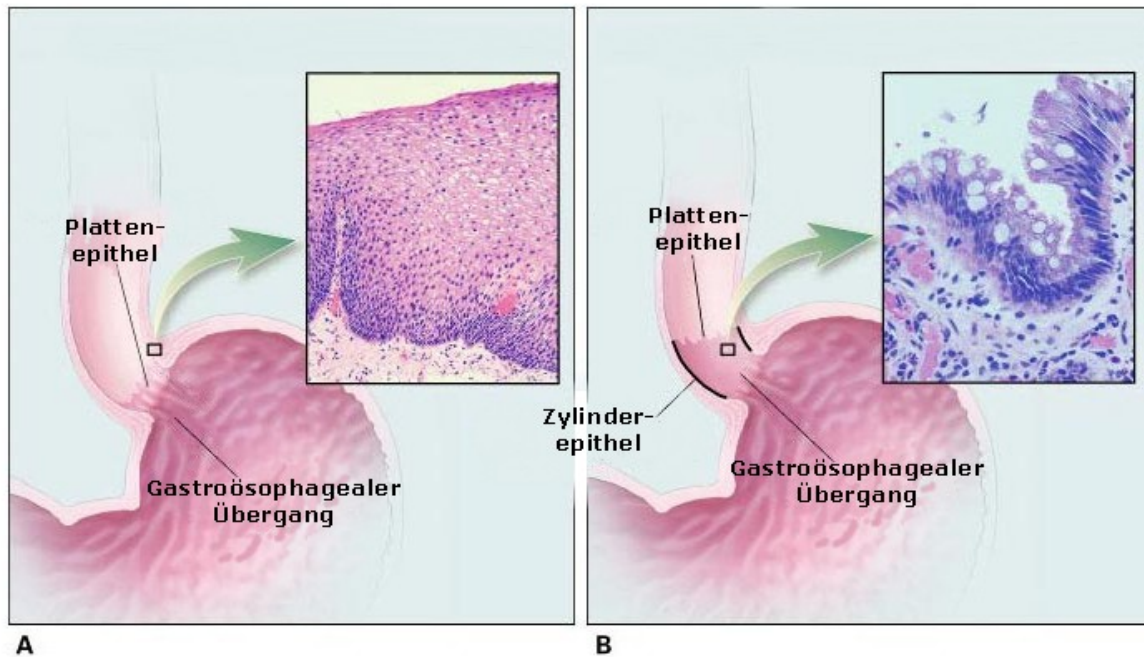


Abb. 3: Endoskopische Merkmale dienen der Unterscheidung von normalem Ösophagus (Bild A) und Barrett-Ösophagus (Bild B). Die Z-Linie entsteht durch das Aneinanderstoßen von Platten- und Zylinder-Epithel. Endoskopisch ist der gastroösophageale Übergang als das orale Ende der Magenfalten definiert. Die histologische Aufnahme (Bild A) zeigt normales Plattenepithel. Im Barrett-Ösophagus ist die histologische Grenze pathologisch zur anatomischen Grenze oralwärts verschoben. Dazwischen befindet sich metaplastisches Epithel (Histologie in Bild B). Histologie: HE-Färbung. *Modifiziert nach Spechler, 2002.*

In einer Publikation wird postuliert, dass durch konsequente chirurgische und medikamentöse Refluxtherapie der Fortschritt einer Metaplasie zum Adenokarzinom aufgehalten werden könne und sogar mit einer Regression zu rechnen sei (DeMeester, 2002). Dies steht im Widerspruch zu einer Studie unseres Hauses, der zur Folge eine maligne Entartung des Barrett-Ösophagus durch medikamentöse oder chirurgische Refluxtherapie nicht überzeugend verhindert werden kann (von Rahden et al., 2003).

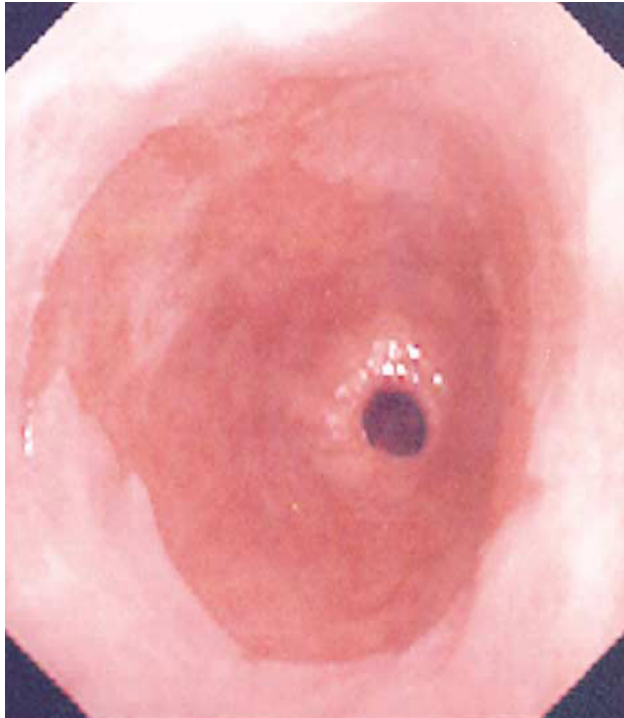


Abb. 4: Endoskopisches Bild eines Barrett-Ösophagus. Rötliches Epithel breitet sich bis mehr als 3 cm oberhalb des gastroösophagealen Übergangs aus.
Quelle: Spechler, 2002.

An der TU München wird diese Tumorentität wegen seiner zunehmenden Bedeutung im Rahmen des von der Deutschen Krebshilfe geförderten Barrett-Cancer-Projekts intensiv untersucht. Die chirurgische Klinik des Klinikum rechts der Isar ist ein „High-Volume-Zentrum“ für Chirurgie des oberen Gastrointestinaltrakts. Von 1982 bis 2000 wurde unter kurativem Ansatz an mehr als 1059 Patienten mit Adenokarzinomen eine Tumorresektion vorgenommen (Siewert et al., 2001). Insbesondere bei der Ösophaguschirurgie trägt das Krankenhausvolumen als auch die Eingriffszahl des ausführenden Chirurgen zum optimalen Operationsergebnis bei (Birkmeyer et al., 2004; Birkmeyer et Birkmeyer, 2006; Dimick et al., 2005).

1.1. Cyclooxygenasen (COX-1, COX-2)

Die Cyclooxygenase hat mit seinen beiden Isoformen, COX-1 und COX-2, zentrale Modulatorfunktion im Arachidonsäurestoffwechsel. Beide Isoformen sind stark homolog (60-65%) hinsichtlich ihrer Sequenz (COX-1 kodiert durch 2.8 kb mRNA, COX-2 durch 4.0-4.5 kb mRNA) und enzymatischen Aktivität. Der Hauptunterschied ist definiert durch das enzymatisch aktive Zentrum. Jenes von COX-2 ist 20% größer als das von COX-1 und leicht unterschiedlich geformt aufgrund drei differenter Aminosäuren. Es wird so zum Angriffspunkt für selektive COX-2-Inhibitoren (Smith et al., 2000). Bei COX-2 befinden sich C-terminal 18 individuelle Aminosäuren, die bei COX-1 fehlen. Die Funktion dieser Aminosäuren ist nicht bekannt. Sie könnten aber COX-2 für schnelle Proteolyse markieren (schnellerer Umsatz, kürzere Halbwertszeit) oder subzelluläre Kommunikation ermöglichen. Das aktive Zentrum schließt jeweils einen hydrophoben Kanal mit ein, der Fettsäuren als Substrat binden kann – oder NSAIDs (non-steroidal antiinflammatory drugs; Smith et al., 2000). Beide Isoformen verfügen über Wasserkanäle, die entweder nur strukturgebende Funktion haben oder auf die Katalyse Einfluss nehmen könnten (z.B. durch kontrollierten Protonendurchfluss; Smith et al., 2000).

Das kodierende Gen für COX-1 liegt auf Chromosom 9 (9q32-9q33.3; Funk et al., 1991), es besteht aus 576 Aminosäuren. Das Gen für COX-2 liegt auf Chromosom 1 (1q25.2-25.3; Tay et al., 1994), es hat 587 Aminosäuren. Beide COX sind Homodimere – funktional und strukturell (Smith et al., 2000).

COX-1 soll eine Art Housekeeping-Funktion zukommen (u.a. nachgewiesen im Gastrointestinaltrakt; Kargman et al., 1996). Sie wird in vielen Geweben konstitutiv bei gleichbleibendem Niveau und Aktivität exprimiert. COX-1 führt unmittelbar zur Freisetzung großer Mengen von Arachidonsäure und zu konsekutiver Prostaglandin-Produktion durch Agonisten-vermittelte intrazelluläre Calcium-Freisetzung (Murakami et al., 2003). Die COX-2-Expression ist üblicherweise niedrig oder fehlt ganz (mit Ausnahme bei Niere, Plazenta, Gehirn). Sie wird aber verzögert induziert durch zahlreiche physiologische Stimuli (Williams et al., 1999; Ermert et al., 2003; Harris et al., 1994). Auffällig dabei: COX-2 ist in Kernnähe vermehrt nachweisbar. Seine Produkte könnten somit bevorzugt Zugang zum Nukleoplasma haben und durch Stimulation nuklearer Rezeptoren Kernaktivitäten modulieren (Smith et al., 2000). Auch für diese COX-Isoform sind Funktionen bei der Gewebshomöostase beschrieben (Morita, 2002). Die am Besten untersuchten Stimuli der COX-2 sind

bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), die proinflammatorischen Zytokine Interleukin (IL)-1 β , -2 und Tumor-Nekrose-Faktor α (tumor necrosis factor α , TNF α ; Chen et al., 2001; Fong et al., 2000; Hempel et al., 1994; Laporte et al., 2000). Wachstumsfaktoren (z.B. epidermal growth factor (EGF), platelet derived growth factors [PDGF]) und einige Kanzerogene (z.B. phorbol-12-myristate-13-acetate [PMA]) stimulieren COX-2 ebenfalls (Peppelenbosch et al., 1993; Goerig et al., 1987). Andererseits supprimieren anti-inflammatorische Moleküle, wie Kortikoide, IL-3, IL-10 und IL-4, die COX-2-Expression (Niiron et al., 1998).

Den Cyclooxygenasen (COX) wird eine zentrale Bedeutung bei der Kanzerogenese zugeschrieben. Für verschiedene Tumorentitäten, insbesondere intestinale Tumoren (Tsuji et al., 1997), ist die pathologische Bedeutung der Überexpression von COX-2 (für manche Tumoren auch von COX-1, z.B. Ovarialtumoren, Zervixkarzinom) aufgezeigt worden. COX-2 ist durch Mitogene induzierbar. Auch künstlich mit Lipopolysacchariden (LPS) behandelte Gewebe weisen erhöhte COX-2-Spiegel auf (Ermer et al., 2000). Verschiedene Tumorentitäten (Kolon, Pankreas, Haut, Lunge) exprimieren auf einem hohen Niveau COX-2 (Eberhart et al., 1994; Tucker et al., 1999; Okami et al., 1999; Higashi et al., 2000; Wolff et al., 1999). Letzteres ist ebenfalls überexprimiert in 50% der benignen Colonpolypen und in 80-85% der Adenokarzinome (Williams et al., 1999).

COX hat im Rahmen der Karzinogenese u.a. folgende Effekte (Amir et Agarwal, 2005):

- Immunsuppression
- Erhöhung des metastatischen Potentials der Zellen
- Apoptoseinhibition
- Angiogeneseinduktion

Die in Tumoren induzierte Aktivität von COX-2 und der damit gekoppelten „stromabwärts“ befindlichen Enzyme scheint durch seine Schlüsselposition im Arachidonsäure-Stoffwechsel eine grundlegende Rolle bei der Angiogenese, Tumorinvasion und Metastasierung (Tsuji et al., 1997), Apoptose-Resistenz, Osteogenese (Tsuji et al., 1998; Murakami et al., 2000) und abgeschwächter Wirtsimmunität (Huang et al., 1998) zu spielen. Zahlreiche Studien in der Vergangenheit haben sich der Expression von COX-2 und seiner möglichen Rolle bei Onkogenese und Tumorwachstum gewidmet und sich mit potentiellen

Therapieansätzen befaßt (Eli et al., 2001; Sawoaka et al., 1999; Grosch et al.;2006; Martin Sanz et al., 2006).

Die Cyclooxygenasen können die karzinombedingte Angiogenese durch zwei Mechanismen regulieren: COX-2 kann die Produktion angiogenetischer Faktoren modulieren, COX-1 nimmt auf die Angiogenese endothelialer Zellen Einfluss (Tsuji et al., 1998).

Auch bei Vorarbeiten unseres Instituts im Rahmen des Barrett-Cancer-Projekts wurden umfangreiche Studien zur Expression der Cyclooxygenasen auf Protein und RNA-Ebene durchgeführt. Beim Adenokarzinom des distalen Ösophagus wurde gezeigt, dass beide Isoformen der Cyclooxygenase beim Barrett-Karzinom hochvariabel exprimiert werden und mit wichtigen Parametern der Angiogenese korrelieren (von Rahden et al., 2005). COX-2 ist in nicht-neoplastischer Barrett-Mukosa hoch exprimiert – vor Entwicklung einer Dysplasie. Auch Gastrin wird eine Rolle bei der Entstehung früher Dysplasie-Stadien beigemessen (Abdalla et al., 2004).

1.2. COX-Inhibition und seine Konsequenzen

Bei nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Medikamenten (NSAIDs), zu denen Aspirin¹ (ASS), Indomethacin, Piroxicam, Sulindac und Ibuprofen gehören, handelt es sich um eine strukturell inhomogene Gruppe ähnlich wirkender Medikamente. Sie werden zur Rheumatherapie und bei Entzündungen eingesetzt. Primär inhibieren sie die Cyclooxygenasen und somit im selben Zug die Synthese der Prostaglandine. Chronische Entzündung führt zu freien Radikalen. Zell- und DNA-Schäden sind die Folge. Durch Eicosanoide wird nun Zellproliferation gefördert (Karzinogenesefaktor). NSAIDs greifen in diesen Zyklus hemmend ein (Ulrich et al., 2006).

Studien belegen, dass NSAIDs das Risiko von Tumorerkrankungen signifikant senken können (Evans et Kargman, 2004). Dies ist insbesondere für das in dieser Studie relevante Adenokarzinom des distalen Ösophagus beschrieben (Corley et al., 2003). Aspirin reduziert die Mortalität von Patienten mit Colon- und Rektumtumoren um 40%. Dabei ist ein dosisabhängiger Effekt beschrieben (teils ASS über 300 mg/Tag). Das Risiko an Prostatakrebs zu erkranken ist studienabhängig um 55-66% reduziert (Mazhar et al., 2005).

Die Hemmung (selektiv oder unselektiv) von COX-2 führt u.a. zu einer Zunahme der Apoptose, sowie zu einer Abnahme der Zellproliferation (Kaur et al., 2002; Buttar et al., 2000). Positive Effekte wurden u.a. erzielt durch die Etablierung von COX-2-Hemmern (z.B. Celecoxib) zur Prävention von Kolorektalkarzinomen (30-50% Risikoreduktion; Taketo, 1998; Chan et al., 2005). Eine weitere Studie belegt, dass Aspirin das Wachstum von Pankreaskarzinomen bei gleichzeitiger Abnahme der COX-2-Expression reduzieren kann (Kokawa et al., 2001).

COX-2-Hemmer weisen ein unbedenklicheres Spektrum an Nebenwirkungen auf als unselektive COX-Hemmstoffe (50% niedrigere gastrointestinale Toxizität, z.B. Magenulzera; Smith et al., 2000). Trotzdem gibt es Kritik hinsichtlich COX-2 als Zielenzym in der Krebsprävention. Im Kolon wird COX-2 nur in einem Teil potentieller Tumorzellen exprimiert. NSAIDs wirken oftmals auch dann, wenn zellulär kein COX-2 nachweisbar ist. COX-2-Hemmer stehen im Verdacht ihre Effekte auch andernorts als an COX-2 zu entfalten (Kashfi et Ragas, 2005; Grosch et al., 2006).

¹ Natürliche Salicylsäure und Salicylate werden bereits seit langem als Medikament eingesetzt. Salicylsäure wurde erstmals 1860 synthetisiert und als Antiseptikum, Antipyretikum und Antirheumatikum verwendet. 40 Jahre später entdeckte man neue Formen, die teils ähnliche Wirkungen wie Aspirin hatten – die Gruppe wurde als „aspirin-like drugs“ bezeichnet, heute „nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)“ genannt.

Am Beispiel des kolonrektalen Karzinoms wurde deshalb die selektive Inhibition von Enzymen und Strukturen untersucht, die im Arachidonsäure-Abbau unterhalb von COX-2 eingreifen (PGES und EP1-4, siehe folgendes Kapitel; Chell et al., 2005).

1.3. Prostaglandin E und Prostaglandin-E-Synthase

Die Synthese von Prostaglandin E (PGE) beginnt mit der Abspaltung der Arachidonsäure aus der Zellmembran durch die Phospholipase A2 (PLA2). Die Muttersubstanz des Eicosanoid-Metabolismus, die Arachidonsäure (AA), ist eine 20 Kohlenstoffe enthaltende ungesättigte Fettsäure im Lipidbilayer der Zellmembran. Sie ist gewöhnlich an der SN2-Position verestert. Zytosolische und sekretorische Phospholipasen (PLA2) spalten das membrangebundene Arachidonat. Sie machen es so zum Substrat für eine Konversion zu bioaktiven Lipiden.

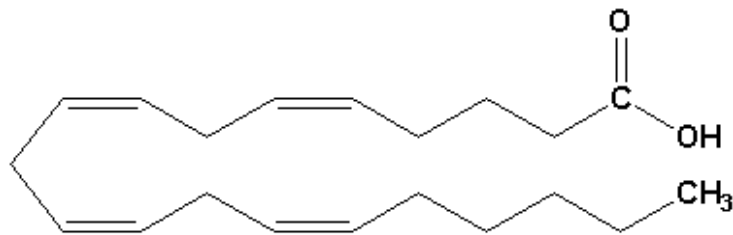


Abb. 5: Arachidonsäure (all-cis-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid)

Die Arachidonsäure kann unmittelbar nach ihrer Freisetzung über folgende drei Signalwege metabolisiert werden:

- Cyclooxygenase Weg
- Lipoxygenase Weg
- Cytochrom P-450 Monooxygenase Weg

In unserer Studie fokussieren wir uns auf den gut untersuchten Cyclooxygenase Signalweg.

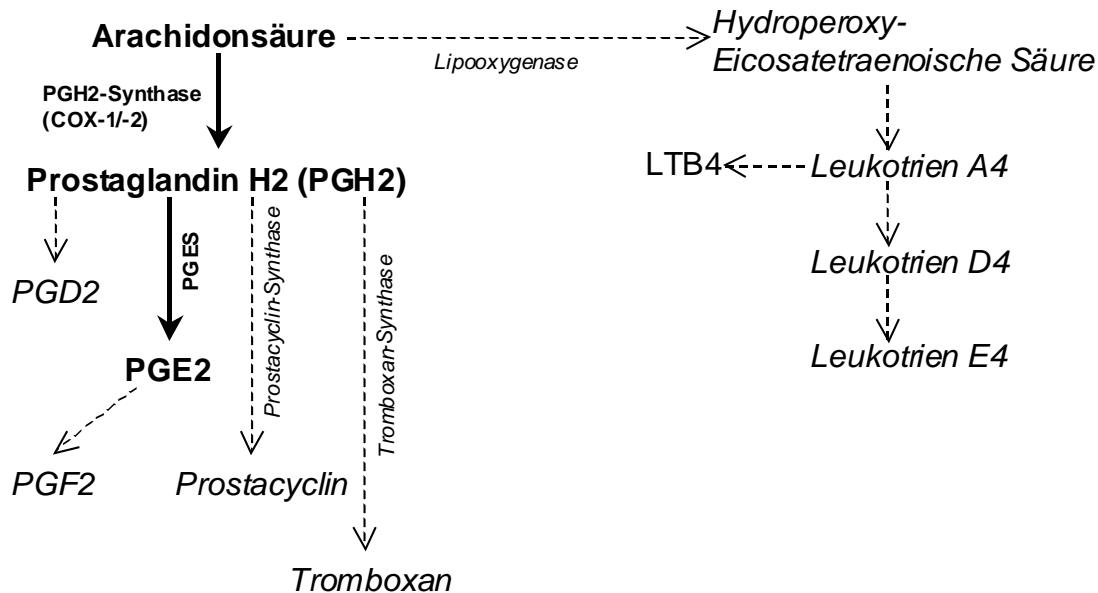


Abb. 6: Prostaglandin-Synthese

COX überführt die Arachidonsäure in Prostaglandin G2 (PGG₂). Letzteres wird in ein instabiles Intermediärprodukt für zellspezifische Prostaglandin- und Tromboxan-Synthasen², PGH₂, umgebaut (DeWitt, 1991). PGH₂ ist Substrat zur Bildung von Prostaglandin E₂ (PGE₂) und anderen Prostaglandinen, wie PGD₂, PGF₂ α , Prostacyclin (PGI₂) und Tromboxan A₂ (TXA₂). Zahlreiche terminale Enzyme, die an der Konversion von PGH₂ beteiligt sind, wurden in den vergangenen Jahren geklont und charakterisiert. Diese Enzyme sind die Prostaglandin-E-Synthase (PGES) für PGE₂, PGDS für PGD₂, PGFS für PGF₂ α , PGIS für PGI₂ und TXS für TXA₂. Isoenzyme von PLA₂, COX und verschiedener terminaler Synthasen sind bekannt. Sie sind funktionell miteinander gekoppelt (Ueno et al., 2001). Im finalen Schritt zur PGE₂-Biosynthese katalysiert PGES die Bildung von PGE₂ aus PGH₂. Für die PGES wurden bei ihrer Charakterisierung unterschiedliche Isotypen beschrieben: zwei mikrosomale Formen und eine cytosolische Form.

² Diese Isomerisierung erfolgt durch einen Prozess bestehend aus zwei Schritten: zunächst werden zwei Sauerstoffmoleküle in Arachidonat eingefügt; ein bicyklisches Peroxid-Intermediat entsteht (Prostaglandin G₂, PGG₂). Im zweiten Schritt folgt die Reduktion von PGG₂ zum frei diffusiblen Prostaglandin H₂ (PGH₂) an definiertem Reaktionsort durch die membranassoziierte Peroxidase (Williams et al, 1999).

Die perinukleare Membran-gebundene, mikrosomale Form (mPGES-1) gehört zur MAPEG-Familie (membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism), die in vier Unterklassen aufgliedert wird. Sie ist insbesondere durch proinflammatorische Stimuli induzierbar. Im Tierversuch wird mPGES-1 durch LPS-vermittelte Pyrese (Fieber) und durch Stimulation mit IL-1 β vermehrt exprimiert (Mancini et al., 2001; Yamagata et al., 2001). mPGES-1 ist funktionell vorrangig mit COX-2 assoziiert. Es liegt co-lokalisiert mit COX-1 und ist mit letzterer hauptsächlich bei Arachidonsäure-Überschuss gekoppelt (Murakami et al., 2000). mPGES-1 soll in vivo mit zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen assoziiert sein, darunter Entzündung (Mancini et al., 2001; Stichtenoth et al., 2001; Yamagata et al., 2001), Tumorgenese (Kamei et al., 2003), Reproduktion (Guan et al., 2001).

Ein weiteres mikrosomales Enzym, mPGES-2, fördert die PGE₂-Produktion aus PGH₂, das beiden Cyclooxygenasen entstammt (unter geringfügiger Bevorzugung von COX-2). Sie ist Golgi-Membran assoziiert. mPGES-2 kommt als Dimer vor, das N-terminal membranassoziiert ist³ (Yamada et al., 2005). Sie wird in zahlreichen Zellen und Geweben konstitutiv exprimiert und tritt – im Gegensatz zu mPGES-1 – nicht vermehrt bei Entzündung oder Verletzung auf. Ein auffälliger mPGES-2-Anstieg wurde bei kolorektalen Tumoren gefunden. Es spielt somit eine Rolle bei pathologischen Prozessen als auch bei der gewöhnlichen Homöostase (Murakami et al., 2003).

Die cytosolische, glutathion-abhängige Form der PGES (cPGES) ist als p23-Protein bekannt (GSH S-Transferase, GST). Sie wird ubiquitär und konstitutiv exprimiert. Sie konvertiert – in enger Verbindung mit dem Hitzeschockprotein 90⁴ (Heat Shock Protein 90, Hsp90) – PGH₂ (vornehmlich von COX-1 stammendes, nicht aber von

³ Zwei hydrophobe Ketten, die V-förmig miteinander verbunden sind, befinden sich in der Tiefe einer großen Höhle und bilden das katalytische Zentrum, das durch Indometacin hemmbar ist.

⁴ Hitzeschockproteine sind Proteine, die in erhöhtem Maße gebildet werden, nachdem Zellen Hitze oder anderen Arten von belastenden Umwelteinflüssen, wie UV-Strahlung, Schwermetallen oder Ethanol, ausgesetzt wurden. In Situationen von zellulärem Stress stabilisieren Hitzeschockproteine zelluläre Proteine um sie vor Denaturierung zu schützen oder beschleunigen den Abbau nicht mehr funktionsfähiger Proteine über das Proteasom. Hitzeschockproteinen könnte zukünftig eine Rolle in der Tumorthherapie zukommen. In physiologisch normalen Situationen spielen ubiquitär vorkommende Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle als Chaperone, die an der korrekten Faltung und Reifung von Proteinen beteiligt sind. Hitzeschockproteine werden nach ihrem Molekulargewicht unterteilt in die Familie der „kleinen“ Hitzeschockproteine (z.B. HSP27 mit einer Masse von 27 kDa) und der Hsp70-Familie der Hitzeschockproteine.

COX-2) zu PGE₂. cPGES ist bedeutsam für die Gewebshomöostase (Tanioka et al., 2000). Es wird vermutet, dass die Eicosanoid-Biosynthese unter der Kontrolle molekularer Chaperone (franz. „Anstandsdame“; Faltungshelfer, Hitze-Schock-Protein, HSP) steht (Tanioka et al., 2003).

Ergänzend wurde gezeigt, dass das mikrosomale GST1-like 1 (mGST1-L1), Mitglied der MAPEG-Superfamilie (membrane associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism), Membran-gebunden ebenfalls signifikante PGES-Aktivität zeigt. Es ist Glutathion-abhängig und wird durch das proinflammatorische Cytokin IL-1 β stimuliert (Jakobsson et al., 1999).

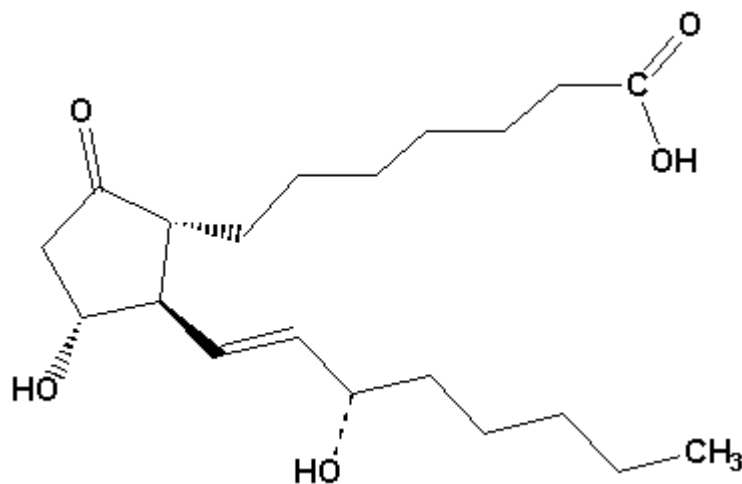


Abb. 7: Prostaglandin-E (PGE)

Prostaglandine⁵ spielen eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl biologischer Prozesse (siehe Tab. 1); mit inbegriffen sind die Regulation des Immunsystems, der Reproduktionsbiologie, Blutgerinnung, Angiogenese (Jones et al., 1999) und gastrointestinalen Integrität. Im Tierversuch wurde gezeigt, dass eine langfristige Behandlung von Ratten mit 16,16-dimethyl-PGE₂ eine Zunahme der Schleimhautdicke des Magens bewirkt. Dies wird begleitet von einer erhöhten Mucosa-Zellzahl (Reinhart et al., 1983).

⁵ Prostaglandine sind durch v. Euler in der Samenflüssigkeit entdeckte und in der – falschen – Annahme, sie würden nur in der Prostata gebildet, nach dieser benannte Stoffe. Sie werden jedoch in verschiedenen Körpergeweben aus Arachidonsäure gebildet.

	Prostaglandine			Prosta-cyclin	Thromb-oxan	Leukotriene			
	E2	F2 α	D2			B4	C4	D4	E3
Gefäßtonus			↓	↓	↑		↑	↑	
Nierendurchblutung	↑	↓		↑	↓				
Natriumaus-scheidung	↑	↓							
Thrombozyten-aggregation			↓	↓↓	↑↑				
Bronchialtonus	↓	↑	↑		↑		↑↑	↑	↑
Darmtonus							↑	↑	↑
Uterus-kontraktion	↑	↑							
Chemotaxis				↓			↑↑		
Gefäß-permeabilität	(↑)						↑	↑↑	

Tab. 1: Bekannte Wirkungen der **Prostaglandine** und anderer Metabolite der Arachidonsäure

PGE2 entfaltet seine Wirkung an den ihm zugehörigen Membran-gebundenen Rezeptoren, EP1-4. Dabei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

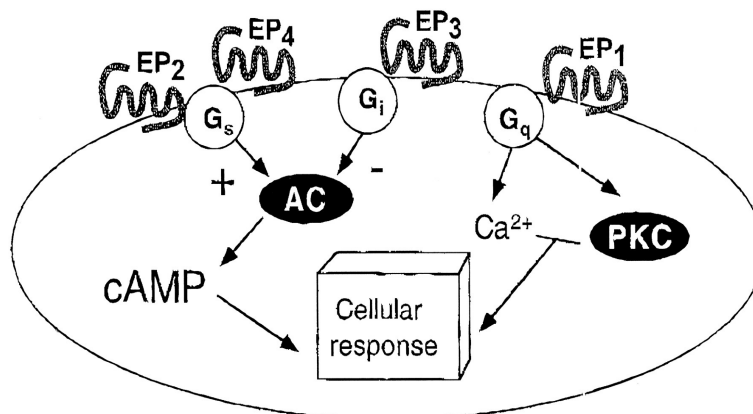


Abb. 8 Prostaglandin-Rezeptoren EP1-4: Darstellung der Art der Kopplung an G-Protein

Unterschiedliche PGE2-Rezeptoren scheinen verantwortlich zu sein für die Karzinogenese verschiedener Tumormodelle und Tumortypen (Sonoshita et al., 2001; Kawamori et al., 2001). Dabei wird EP2 mit der Induktion von VEGF assoziiert, das für Angiogenese verantwortlich ist (Hiroshi et al., 2002). Kürzlich wurde ein signifikanter Zusammenhang des EP4-Rezeptors mit pathologischen Parametern bei Tumoren des oberen Harntrakts nachgewiesen (Miyata et al., 2005). Bei EP1 besteht der Verdacht des Zusammenhangs mit Colon- und Mamma-Karzinomen (Chang et

al., 2004). Durch Antagonisierung von EP1 wurden chemoprotektive Effekte erzielt (Kawamori et al., 2001 et 2005).

PGE wird Bedeutung beigemessen bei tumorbedingter Neovaskularisation und Tumorwachstum. Wahrscheinlich setzen Magen- und Kolontumoren im Vergleich zu Normalgewebe ein höheres Niveau an PGE2 frei (Rigas et al., 1993). Im Barrett-Ösophagus wird PGE2 eine Mediatorfunktion in der Metaplasieentstehung durch Säuren und Gallensalze zugeschrieben (Kaur et Triadafilopoulos, 2002). Seit wenigen Jahren ist bekannt, dass PGE2 seine Wirkung auch durch Transaktivierung des Epidermal Growth Factor Rezeptors (EGFR) bei epithelialen Magenzellen, Colonkarzinomzellen und Magenschleimhaut entfalten kann (Pai et al., 2002). Es wurde eine signifikante Korrelation von erhöhtem PGE2-Niveau mit COX-2 bei Adenokarzinomen des Magens festgestellt (Uefuji et al., 2000). Diese Phänomene scheinen spezifisch für PGE2, da die anderen Prostanoid⁶ nicht auffällig in Qualität und Quantität waren. PGE2 scheint in mechanistischer Verbindung zur Karzinogenese zu stehen. Es hemmt die Apoptose und verstärkt Wachstum und Motilität von Colonkarzinomzellen (Sheng et al., 1998 und 2001).

Verschiedene Studien belegen, dass Aspirin und andere NSAIDs durch ihre hemmende Wirkung auf den Signalweg (Mechanismus: siehe Kapitel 1.1) das Tumorrisiko und -wachstum reduzieren. Für das Kolonkarzinom ist dieser chemoprotektive Effekt seit längerem bekannt (Thun et al., 1993). Jedoch die protektiven Effekte von Aspirin auf die Tumorentstehung erwiesen sich unter anderem auch beim Ösophagus (Funkhouser et Sharp, 1995) und Magen (Farrow et al., 1998) als wahrscheinlich.

Eine Überexpression der mPGES-1 wurde bislang u.a. am Tierexperiment und an humanen Resektaten für kolorektale Adenome und Karzinome (Yoshimatsu et al., 2001; Kamei et al., 2003), an humanen Tumorproben und in Zellkultur für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (Yoshimatsu et al., 2001), sowie an humanen Tumorproben und durch Zellkultur für Plattenepithelkarzinome von Hals und Kopf (Cohen et al., 2003) gezeigt.

Beim Kolonkarzinom besteht eine Kopplung der Induktion von mPGES-1 mit COX-2 (Yoshimatsu et al., 2001). Dies ließe den Schluss zu, dass die simultane Induktion von mPGES-1 und COX-2 synergistisch auf die Karzinogenese wirkt. In der Zellkultur

⁶ Prostanoid sind definiert als Gruppe der Prostaglandine, einschließlich Endoperoxide, Prostacyclin und Thromboxane, die aus der Eicosapentensäure gebildete Prostanoid werden zusammen mit den Leukotrienen auch als Eicosanoide bezeichnet.

ist eine PGES-Überexpression außer bei Kolonkarzinom-Zelllinien auch bei Magenkarzinom-Zelllinien gezeigt worden.

Bei verschiedenen Karzinomen ist eine Überexpression von mPGES gefunden worden, und zwar insbesondere in Tumoren, die auch COX-2 überexprimieren. Die Rolle und der Funktionsmechanismus dieses Markers ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist nicht sicher, ob tatsächlich eine Korrelation zur Tumorangio-genese besteht. MPGES ist bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) überexprimiert. Hier wirkt es proangiogenetisch und prometastatisch (Yoshimoto et al., 2005). Beim Magenkarzinom gilt ein Zusammenhang von mPGES und der Karzinogenese als gesichert (Jang, 2004).

Für das Adenokarzinom des distalen Ösophagus ist die Rolle der mPGES noch nicht hinreichend untersucht.

1.4. Transforming growth factor β (TGF β)

Der Transforming growth factor β (TGF β) ist ein ubiquitärer, sowie essentieller Regulator zellulärer und physiologischer Prozesse, einschließlich der Proliferation, Differenzierung, Migration, des Zellüberlebens, der Angiogenese und der Immunüberwachung. TGF β ist ein Zytokin mit starker immunsuppressiver Wirkung. Veränderungen des Signaltransduktionswegs und Unempfindlichkeit gegen TGF β -vermittelte Hemmung der Proliferation werden gelegentlich bei humanen Krebszellen beobachtet. Beim Barrett-Ösophagus sind in diesem Signaltransduktionsweg durch Methylierung, Deletionen und Proteinmodifikationen Veränderungen in der TGF β -Wirkung beschrieben (Onwuegbusi et al., 2006). Umgekehrt kann der Verlust des TGF β -Signals zu einer aktivierten „Mikro-Umwelt“ führen, die zelluläre Transformationen fördert – oder gar auslöst. Der TGF β -Signalweg hat bei Tumoren einen entscheidenden Einfluß auf Tumorauslösung, -progression und -metastasierung (Stover et al., 2007). Bei Magentumoren kann TGF β durch Modulation von p15 und p21 die Zellproliferation und -apoptose steuern (Li et al., 2005). Der TGF β -Ligand entfaltet seine Wirkung über Typ I- und II-Ser/Thr-Kinasen (Narayan et al., 2005). Dabei kommt es zur Aktivierung von Smad2 und Smad3 unter Bildung eines zellulären, die Transkription-regulierenden Komplexes, Smad 2/3/4. Neben Tumorsuppressor-Funktionen von TGF β kommt diesem zusätzlich eine tumorfördernde Wirkung zu – entweder durch Effekte auf Tumor- oder Stromazellen, oder durch fundamentale Veränderungen der TGF β -Ansprechbarkeit bei den Tumorzellen selbst. TGF β hat stark T-Zell-inhibierende Wirkung (Becker et al., 2007). Die Überproduktion von TGF β durch Tumorzellen kann zu Unterwanderung der Immunüberwachung und somit zur Tumorprogression führen. Bei Ösophagus-Karzinomen entsprechend der von uns untersuchten Entität gingen fortgeschrittene Stadien (T3/4) mit einer TGF β -Überexpression einher (von Rahden et al., 2006). Der TGF β -Serumspiegel steht in signifikantem, statistischem Zusammenhang mit der venösen Gefäßinvasion bei Magentumoren (Lin et al., 2006). Beim kolorektalen Karzinom zeigten sich ebenfalls signifikante Korrelationen zur Neovaskularisations- und Metastasierungsrate (Guzinska-Ustymowicz et Kemono, 2005). TGF β oder Mitglieder des TGF β -Pathways werden zunehmend als prognostische Marker bei Krebspatienten herangezogen (Elliott et Blobe, 2005; Lin et al., 2005).

1.5. Überlebensraten

Das Karzinom der Speiseröhre mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von insgesamt 10 Prozent hat eine der niedrigsten Aussichten auf Heilung. Noch schlechter sind die Prognosen nur bei hepatobiliären und pankreatischen Tumoren (Wong et Malthaner, 2000). Das Adenokarzinom der Speiseröhre metastasiert später als das PE-Karzinom. Es hat somit eine bessere Prognose (Siewert et Ott, 2007). Verschiedene Therapieansätze stehen zur Verfügung. Bei Diagnosestellung allerdings besteht oft bereits Inoperabilität.

Zahlreiche prognostische Faktoren sind beschrieben. Beim Magenkarzinom erwiesen sich ASA-, TMN- und UICC-Klassifikation, als auch die Tumorgröße für die Prognose als entscheidend (Potrc et al., 2007).

Die Überlebensdauer Betroffener steht in engem Zusammenhang mit der Expression verschiedener krebsassoziierter Gene: die Bedeutung von PGES hinsichtlich des Survivals beim Adenokarzinom des distalen Ösophagus ist bisher nicht bekannt. Bei Tumoren dieser Entität übt eine TGF β -Überexpression einen signifikant negativen Einfluß auf das Überleben aus (von Rahden et al., 2006). Beim Adenokarzinom des Ösophagus zeigte sich ein statistisch negativer Effekt von erhöhtem COX-2 auf Metastasierung und das Überleben (Möbius et al., 2005; Baguma-Nibasheka et al., 2007). Entsprechend sind Untersuchungsergebnisse am kolorektalen Karzinom: durch NSAR reduzierte COX-2-Aktivität führen konsekutiv zu erniedrigten PGES-Werten und prolongiertem Survival (Pozzi et al., 2004). Hohe VEGF-C-Werte bei Plattenepithel-Karzinomen des Ösophagus gehen statistisch mit fortgeschrittenen Tumorstadien einher. Bei Adenokarzinomen der von uns untersuchten Entität wurde diese Verbindung bisher nicht nachgewiesen (Möbius et al., 2007).

Beim Bronchialkarzinom ist für die PGES eine prognostische Bedeutung beschrieben, die bereits als Parameter in ein Prognose-Scoresystem⁷ dieser Entität Eingang gefunden hat (Endoh et al., 2004).

⁷ Aus einem Kollektiv von 44 Genen wurden 8 herausgearbeitet, die für die Überlebensprognose der 85 in eine Studie eingeschlossenen Tumorpatienten relevant erschienen. Mittels RT-PCR wurden diese Gene quantitativ bestimmt – darunter die Prostaglandin-E-Synthase (PGES). Die Ergebnisse flossen in einen errechneten Risikofaktor (RF) ein. Eine signifikante Assoziation zwischen RF und Tumorstadium bzw. Tumordifferenzierung wurde verzeichnet.

Ein Prognose-Scoresystem wurde geschaffen in das RF und ebenso konventionelle Prognosefaktoren (Geschlecht, Alter, Tumorstadium und -differenzierung) einfließen. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven, die signifikant eine Korrelation zwischen RF und Überleben aufzeigten, bewiesen die Treffsicherheit des neuen Systems.

1.6. Angiogenese und Lymphangiogenese

Für jede Zelle, insbesondere für Tumorzellen, sind Nährstoffe und Sauerstoff von essentieller Bedeutung. Daher ist die unmittelbare Nähe zu Blutgefässen von unabdingbarem Vorteil. Während der Organogenese wird diese Nähe durch das zeitgleiche Wachstum von Blutgefässen und Parenchym sichergestellt. Später jedoch ist die Angiogenese ein präzise regulierter Mechanismus. Aufgrund der Abhängigkeit von Blutgefässen scheint es plausibel, dass proliferierende Gewebe die intrinsische Fähigkeit besitzen müssen, das Gefässwachstum anzuregen. Um an Grösse zuzulegen, müssen Neoplasien die Fähigkeit entwickeln, die Angiogenese zu beeinflussen (Hanahan et Weinberg, 2000).

Das Wachstum von neuen Blutgefässen ist Voraussetzung für die Entwicklung, Progression und Metastasierung maligner Tumoren. Die Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) sind eine Familie potenter angiogenetischer Wachstumsfaktoren, welche das Wachstum und Migration endothelialer Tumoren stimulieren (Morales, 2002). Und viele Tumoren selbst halten die Angiogenese aufrecht indem sie ein breites Spektrum an speziellen, beeinflussenden Faktoren produzieren; darunter TGF β und ebenso VEGF (Koolwijk et al., 1996; Warren et al., 1995; Tsujii et al., 1998). VEGF und seine Rezeptoren, insbesondere VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2, oder ‚Kinase insert Domain-Containing Rezeptor‘, KDR) sollen eine wichtige Rolle beim tumorassoziierten Gefässwachstum spielen (Paz et Zhu, 2005). Die Expression von VEGF ist mit Progredienz einer Metaplasie zum Adenokarzinom des distalen Ösophagus assoziiert (Vallbohmer et al., 2006).

Es wurde auch gezeigt, dass sich maligne Tumoren durch inhibierende Beeinflussung der Angiogenese zurück in benigne Phänotypen überführen lassen können (Skobe et al., 1997).

Beim Adenokarzinom des Magens und dem primären Peritonealkarzinom korrelieren Mikrogefässdichte und COX2-Expression signifikant miteinander (Honjo et al., 2004; Khalifeh et al., 2004). Umgekehrt wurde durch Einsatz von COX2-Hemmstoffen im Tierversuch eine reduzierte Dichte an Mikrogefässen nachgewiesen (Fu et al., 2004). Beim kolorektalen Karzinom zeigte sich, dass die Phospholipase-2 (PL2), die in proportionalem Zusammenhang zum Prostaglandin-Spiegel steht, signifikant mit der Mikrogefässdichte korreliert (Wendum et al., 2004). Bei dieser Tumorentität, korrelieren zusätzlich PGE₂, VEGF und die Mikrogefässdichte miteinander (Cianchi et al., 2004).

Analog zur Angiogenese kommt auch der Lymphangiogenese und Lymphgefäßdichte eine prognostisch bedeutsame Rolle zu. Lymphknoten-Metastasierung ist ein wichtiger prognostischer Faktor bei malignen Tumoren. Lymphgefäße sind immunhistochemisch darstellbar. Beim Magenkrebs wurde ein Zusammenhang zwischen Lymphgefäßdichte (LVD) und VEGF-C nachgewiesen (Hachisuka T et al., 2005).

1.7. Zielsetzung

Für Ösophaguskarzinome ist die PGES-Expression weder an Tumorproben noch in der Zellkultur untersucht. In dieser Arbeit fokussieren wir uns speziell auf das Adenokarzinom. Das Ziel wird die semi-quantitative Untersuchung der PGES-Genexpression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR-Expressionsanalyse (TaqMan) sein. Wir beabsichtigen zudem den Zusammenhang der Genexpression mit der Angiogenese und Lymphangiogenese nachzuweisen. Deshalb betrachten wir in unserer Studie ebenfalls die Microvessel-Density (Blut- und Lymphgefäße).

Die so gewonnenen Messwerte wollen wir hinsichtlich möglicher Korrelationen mit Ergebnissen früherer Studien untersuchen. Dabei werden wir insbesondere die pathologisch erhobene UICC-Klassifikation, die Überlebensrate betroffener Patienten, die Expression anderer proangiogenetisch wirkender Faktoren (VEGF-A und -C), TGF β , als auch die Expression der beiden Cyclooxygenase-Isoformen (COX-1 und COX-2) für unsere statistischen Erhebungen heranziehen.

2. Material und Methoden

2.1 Analyse der Mikrogefäßdichte

Die peritumorale Kapillardichte (sog. Microvessel-Density, MVD) dient als morphologischer „Surrogatmarker“ für die Angiogenese und Lymphangiogenese eines Tumors. Wesentlicher Bestandteil unserer Untersuchungen zur Angiogenese bei Barrett-Karzinomen ist somit die Kapillardichte. Die Bestimmung erfolgt durch lichtmikroskopisches Auszählen markierter Gefäße.

2.1.1 Tissue Arrays

Für die Untersuchung bedienen wir uns der Tissue-Array-Methode. Von den Paraffinblöcken verschiedener eingebetteter Tumoren werden Stanzproben entnommen um sie auf einem neuen Block zu arrangieren. Dies gestattet eine größere Zahl von intakten Tumoren auf einem Objektträger unter identischen Versuchsbedingungen zu analysieren. Der Ursprungsblock bleibt dabei weitgehend intakt. Er ist somit für weitere histopathologische Untersuchungen verwendbar. Bei dieser Methode wird nur ein kleiner Ausschnitt des Tumorsektats lichtmikroskopisch begutachtet (Miniaturisierung).

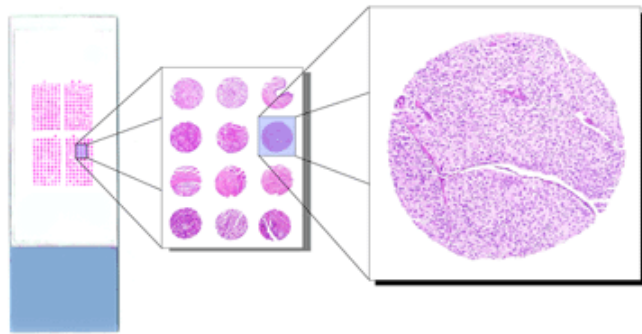


Abb. 9: Tissue-Array-Präparat. Mehrere 100 Gewebeprobe werden auf einen Objektträger aufgebracht.

Die Anfertigung der erforderlichen Präparate (sog. Matrizen) erfolgt mit dem Manual-Tissue-Arrayer-1 von Beecher Instruments, San Prairie, Wisconsin, USA. Jener ermöglicht es, Probe exakten Durchmessers aus einem routinemäßig in Paraffin eingebetteten Tumorsektat zu entnehmen. Die Selektion des zu übertragenden Gewebeareals am Donorblock erfolgt durch lichtmikroskopische Beurteilung,

Ableich und Markierung eines mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitts des selben Tumorblocs durch einen erfahrenen Pathologen.

Die gewonnenen Proben werden jeweils in definiertem Abstand in vorbereitete Löcher auf einem Empfängerblock transferiert⁸. In dieser Studie überführen wir so jeweils drei Proben pro Donorblock, also pro Tumorsektat und Patient.

Um eine Homogenisierung des fertig bestückten Akzeptorblocks mit den eingebrachten paraffinierten Tumorkörpern zu erlangen, erfolgt eine Erhitzung über 15 min auf 37°C.

Der Empfängerblock ist nun beständig, mit Tumorproben ausgestattet und kann mittels eines Mikrotoms geschnitten werden. Die Schnitte einer Stärke von 2 bis 3 µm werden auf handelsübliche Objektträger aus Glas übertragen.

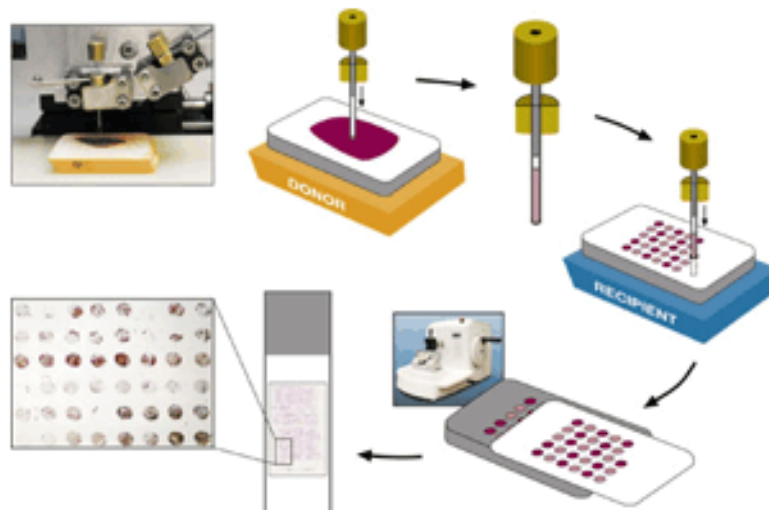


Abb. 10: Herstellung eines Tissue-Array-Präparats. Zunächst Entnahme eines Gewebezylinders aus einem Donorblock mittels eines manuellen Microarrayers (Photo links oben) und anschließende Übertragung der Probe auf einen Empfängerparaffinblock. Schnitt des hergestellten Präparats mittels Mikrotom (Photo unten rechts) und Platzierung des Dünnschnitts auf einen Objektträger.

2.1.2 Immunhistochemie

2.1.2.1 Antikörper

Zur Darstellung der Blutkapillaren wird eine immunhistochemische Markierung mit dem für kleine Arteriolen und Kapillaren spezifischen (und auch in der

⁸ Jede Probe, Durchmesser einer Probe 0.6 mm, hat eine Oberfläche von 0.27 mm². Dies entspricht per definitionem 2 bis 3 High-Power-Fields. Abstand der Proben zueinander beträgt jeweils 0.7 bis 0.8 mm.

histopathologischen Routinediagnostik gebräuchlichen) CD-31-Antikörper (murine monoclonal antibody, monoklonaler Mausantikörper) vorgenommen (Packer et al., 2003). Dieser Antikörper reagiert stark mit formalin-resistenten Epitopen (beständig gegen pathologische Fixiertechnik) auf CD-31 endothelialer Zellen in normalen Geweben als auch in benignen und malignen Tumoren. Der Antikörper markiert zudem Megakaryozyten, Trombozyten und Plasmazellen. Schwache Kreuzreaktionen mit B-Lymphozyten, T-Zellen und neutrophilen Granulozyten werden ebenfalls beobachtet.

Die immunhistochemische Färbung erfolgt durch die Labelled-Streptavidin-Biotin Methode (LSAB). Der zur spezifischen Markierung der Blutgefäße verwendete CD-31-Primärantikörper wird durch einen biotinylierten Sekundär- bzw. Brückenantikörper (Link-Antibody) spezifisch markiert und im Folgeschritt mit zugegebenem Streptavidin-Enzym-Konjugat komplexiert. Letzteres setzt Substrat-Chromogen um und führt zu einer Farbreaktion.

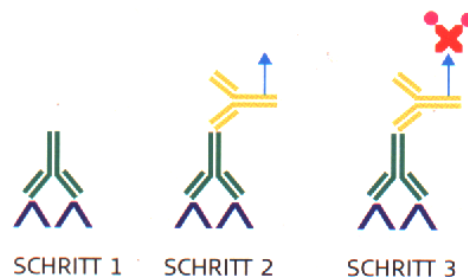


Abb. 11: Die drei Schritte der LSAB-Methode bestehend aus Primärantikörper (Schritt 1), biotinyliertem Brückenantikörper (Schritt 2) und Enzym-markiertem Streptavidin (Schritt 3).

Die immunhistochemische Darstellung der Lymphgefäße erfolgt analog den Blutgefäßen. Dabei verwenden wir zur spezifischen immunhistochemischen Markierung der Lymphgefäße den kürzlich eingeführten D2-40 Antikörper (Kahn et al., 2002). Der Antikörper bindet an über Sauerstoff gekoppelte Sialoglycoproteine auf Lymphendothelien, fetalem Hoden oder testikularer, germinativer Stammzellen.

Der Primärantikörper D2-40 ist gegen das Formalin-resistente Membranantigen M2A gerichtet. Es handelt sich um einen monoklonalen IgG1-Antikörper (von Maus, bezogen von SIGNET, Dedham, MA, USA); Verdünnung 1/40, Inkubationszeit 1 h bei Raumtemperatur, 100 µl/Objekträger.

Antikörper	Antigen	Strukturnachweis	AK-Typ	Enzym-Komplex
CD-31-AK	CD-31	Blutgefäße	IgG1	Streptavidin-Enzym-Konjugat
D2-40	M2A	Lymphgefäße		

Tab. 2: Zur immunhistochemischen Markierung verwendete Antikörper.

2.1.2.2 Durchführung

Zur Antigen-Demaskierung werden zunächst die Präparate unter Hitze im Dampfkochtopf für 7 min bei pH 6 (Citratpuffer) vorbehandelt. Anschließend folgt eine Spülung mit TRIS-Puffer. Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgt mittels 3%-igem H₂O₂ für 15 min. Anschließend wird erneut mit TRIS-Puffer gespült. CD-31 wird mit einem entsprechenden monoklonalen Primärantikörper (monoklonaler Antikörper der Maus, Klon gc-70A, bezogen von DAKO Cytomation, Hamburg) markiert; Verdünnung 1/25, Inkubationszeit 1 h, 100 µl/Objektträger. Nach Spülung mit TRIS-Puffer wird der biotinylierte Antimaus-Sekundärantikörper (von Ziege, Inkubationszeit 30 min, 100 µl/Objektträger) aufgetragen. Es erfolgt eine weitere TRIS-Spülung. Nun wird mit Peroxidase markiertes Streptavidin (Streptavidin-Enzymkonjugat) aufgetragen, Einwirkzeit 30 min. Als Substrat für die Peroxidase-reaktion wird Diamino-Benzidin (DAB) verwendet (standardisierte Inkubationszeit 9 min), dann Abstoppen der Färbereaktion durch Spülen mit Wasser und Gegenfärbung mit Hämalan.

2.1.3 Morphometrische Analyse

Die Microvessel-Zählung selbst erfolgt lichtmikroskopisch in 400-facher Vergrößerung (Objektiv 40), wobei jeweils pro Präparat die Fläche eines Sichtfelds (High-Power-Field) mäanderförmig durchgemustert wird.

Um Verwechslungen mit optisch ähnlichen, jedoch unspezifischen o.g. Kreuzreaktionen auszuschließen, ist die exakte Betrachtung der jeweiligen Kernmorphologie notwendig. Arteriolen im Präparat mit entsprechender objektivierbarer Tunica muscularis zählen nicht zu den Mikrogefäßen und werden daher nicht gewertet. Auf mögliche Gefäßlumina wird geachtet, sowie auf Längsanschnitte der Microvessels.

Die Methode der Auswertung wird mit einem erfahrenen Untersucher (Prof. M. Sarbia) geübt und dann standardisiert: zur Minimierung einer etwaigen Intraobserver-

Variabilität wird eine Auswertung von zunächst 30 Proben exemplarisch vorgenommen. Diese Auswertung wird 5 Mal an verschiedenen Tagen wiederholt und die Ergebnisse werden verglichen.

2.2 Quantitative Expressionsanalyse der Prostaglandin-E-Synthase

Aus 123 in Paraffin eingebetteten Tumorböcken wird gezielt durch Mikrodisektion Tumorgewebe für die RNA-Isolation gewonnen. Durch Reverse-Transkriptase-(RT)-Reaktion wird diese in komplementäre DNA (cDNA) überführt. Die cDNA wird nach Protokoll (siehe unten) mittels zugegebener Primer, Mastermix und Probe im TaqMan amplifiziert. Dabei können spezifische Fluoreszenzen verursacht werden, die Rückschlüsse auf die PGES-Quantität der untersuchten Lösung zulassen.

Da der cDNA-Gehalt Tumorsektat-abhängig variiert, bestimmen wir PGES lediglich semiquantitativ. Wir orientieren uns hierbei am konstitutiv exprimierten Housekeeping-Gen GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Der Quotient aus PGES und GAPDH erlaubt nunmehr einen verlässlichen Vergleich der Proben untereinander. Wir erachten GAPDH als tumorunabhängigen Faktor.

2.2.1 Mikrodisektion

Zuerst muß für unsere Studie relevantes Tumormaterial gewonnen werden. Hierfür nutzen wir routinemäßig in Paraffin eingebettete Tumorböcke und fertigen davon jeweils Schnitte einer Stärke von 2 bis 3 µm an.

Die Schnitte werden auf einen handelsüblichen Objektträger aus Glas (Firma Engelbrecht, München) übertragen, über Nacht getrocknet und am darauf folgenden Tag entparaffiniert. Die Präparate werden zweimal für je 20 min in Xylol gegeben und anschließend über eine absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70%, jeweils 5 min) in Wasser überführt.

Zur Kontrastierung der einzelnen Strukturen am Präparat führen wir eine Schnell-Hämalaun-Färbung (Instant Hämalaun) durch. Dabei wird jedes Präparat einzeln mit Hämalaun gegengefärbt und abschließend mit Wasser gespült.

Unterstützt von einem erfahrenen Pathologen werden auf einem Hämatoxilin-Eosin Routinepräparat jedes Tumorsektats jene Areale markiert, die für eine Mikrodisektion in Frage kommen.

Unter lichtmikroskopischer Kontrolle präparieren wir nun mittels eines Skalpell die äquivalenten Bereiche der eingangs hergestellten Schnitte. Dabei werden nicht tumoröse Areale geschont.

Die Proben werden in je 200 µl SDS-Lysepuffer⁹ gegeben. Die optimale Menge pro Tumorprobe gewonnener Zellen sollte 1000 bis 5000 Zellen betragen und eine maximale Zellzahl von 10⁶ nicht überschreiten.

2.2.2 Lysebehandlung der Zellen

Die in jeweils 200 µl SDS-Lysepuffer aufgenommenen Tumorzellen werden über Nacht mit Proteinase K¹⁰ (10 bis 20 µl, 50 mg/ml, bezogen von Roche, Mannheim) im Brutschrank inkubiert. Diese Vorbehandlung erfolgt im Brutschrank bei 60°C.

Zweck der enzymatischen Lyse ist die Freisetzung des genetischen Materials der Tumorzellen und somit Herstellung einer Nukleinsäurelösung, die allerdings in diesem Initialstadium noch unrein ist. Proteinase K findet darüber hinaus Anwendung um endogene Nukleasen, wie RNasen oder Dnasen, zu inaktivieren.

2.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Häufig enthalten Nukleinsäurelösungen unerwünschte Verunreinigungen. Zumeist handelt es sich dabei um Proteine. Eine klassische Methode der Reinigung ist die Phenol-Chloroform-Extraktion.

Zunächst wird unseren Proben jeweils Phenol (200 µl, pH 4,5 bis 5,5, bezogen von Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben. Nach Durchmischen folgt die Zentrifugation der

⁹ Herstellung des Lysepuffers: zunächst in nicht gebrauchsfertiger, fünffach konzentrierter Form – werden Tris HCl (2,5 ml, 1 M), Ethylene Diamine Tetra-Acetate (EDTA, 50 µl, 0,5 M) und Sodiumdodecylsulfat (SDS, 25 ml, 20%, hergestellt aus 20 g SDS auf 100 ml Wasser), verwendet. Abschließend wird das entstandene Gemisch mit Wasser auf ein Volumen von 50 ml ergänzt. Alle Komponenten zur Herstellung des Lysepuffers bezogen wir von Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim. Zur Herstellung der Gebrauchskonzentration des Lysepuffers wird die soeben produzierte Lösung 1:5 mit Wasser verdünnt. Nun folgt die Aliquotierung zu je 200 µl und Zugabe der durch Mikrodisektion gewonnenen Proben aus den Tumorsektaten.

¹⁰ Die verwendete Proteinase K entsprach ursprünglich der von Tritiracium album isolierten Form. Sie ist die aktivste bekannte Endopeptidase. Sie spaltet Proteine nach aliphatischen, aromatischen oder hydrophoben Aminosäuren. Proteinase K spaltet bei exzessivem Überschuss und ausreichend Inkubationszeit Proteine zu freien Aminosäuren.

Proteinase K zählt zu den Subtilisin-verwandten Serinproteasen. Sie wird nicht inaktiviert durch Metallionen, Chelatkomplex-Bildner (z.B. EDTA) oder durch Trypsin- oder Chymotrypsin-Inhibitoren. Bei dem Enzym handelt es sich um eine rekombinierte Form. Es ist somit garantiert, dass unsere Proben mit keinerlei exogenem Genmaterial verunreinigt werden.

Proteinase K ist stabil bei pH 4,0 bis pH 10,0. Volle Leistungsfähigkeit hat sie bei pH 6,5 bis pH 9,5. Bei 65°C ist sie zwölfmal aktiver als bei 20°C. Bei Temperaturen über 65°C denaturiert sie jedoch schnell.

Proteinase K wird stimuliert durch Zugabe von denaturierenden Agenzien zum Medium (z.B. SDS versiebenfacht die Aktivität der Endopeptidase).

Lösung (6 min, 12000 rpm) mit anschließender Übertragung des Zentrifugationsüberstands in eine neue Küvette. Nun muss ein Isoamylalkohol-Chloroform-Gemisch (Mengenverhältnis 1:25, Gesamtvolumen 100 µl, Komponenten bezogen von Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) zugegeben werden. Anschließend wird durchgemischt und zentrifugiert (6 min, 12000 rpm). Der Überstand kommt wiederum in eine neue Küvette. Jener setzen wir Natriumacetat zu (NaAc, 20 µl, 2 M, pH 4.0 bis 4.5, bezogen von Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim). Anschließend erfolgen Durchmischung, Zentrifugation und wiederum eine Überführung des Überstands in eine neue Küvette.

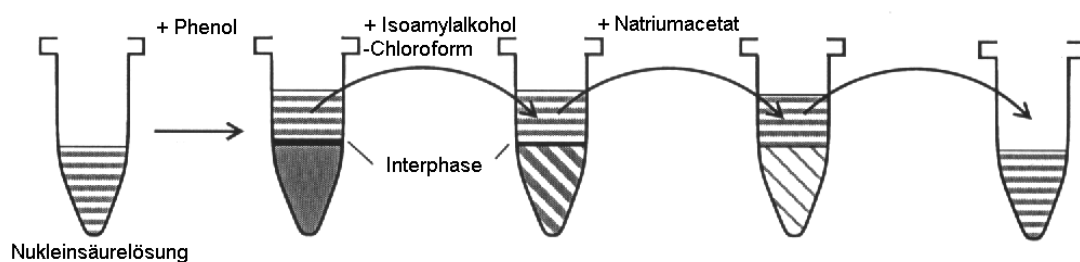


Abb. 12: Phenol-Chloroform-Extraktion

2.2.4 RNA-Fällung

Ein Charakteristikum von DNA/RNA ist es, dass sie zunächst meist nicht in der gewünschten Konzentration vorliegt. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn man Nukleinsäuren aufreingt. Während Nukleinsäuren bei hohen Konzentrationen sehr schnell ausfallen, gestaltet sich bei niedrigen Konzentrationen (wie bei der hier vorliegenden) die Aufreinigung etwas schwieriger. Die beliebteste Lösung hierbei ist die Alkoholfällung; auch wir bedienen uns dieser Methode. Um die Fällungseffizienz zu erhöhen, setzen wir daher unseren Proben Glykogen zu und wenden Kälte an. Wir geben zu unseren Proben jeweils Glykogen (2 µl, 20 mg/ml, bezogen von Roche, Mannheim). Die Einbringung von Isopropanol (220 µl, bezogen von Aigma-Aldrich Chemie, Steinheim) folgt. Isopropanol fällt Nukleinsäuren effektiver als Ethanol. Daher reicht zumeist die Verwendung kleinerer und somit preisgünstigerer Volumina aus.

Die künstlich herabgesetzte Temperatur der hergestellten RNA-Salz-Alkohol-Lösungen von -20°C für 45 min erlaubt eine Fällungseffizienz von 80 bis 100%.

Dabei sei erwähnt, dass das im vorherigen Schritt der Phenol-Chloroform-Extraktion zugegebene Natrium-Acetat zusätzlich die Löslichkeit der Nukleinsäuren verringert und somit den Fällungsprozess der RNA unterstützt.

Anschließend zentrifugieren wir unsere Proben bei 4°C für 30 min bei 12.000 rpm und entfernen vorsichtig den Überstand. Zurück in der Küvette verbleibt ein RNA-Pellet. Jenes waschen wir mit Alkohol nach (Ethanol, 300 µl, 70%). Die Probe wird so von zurückgebliebenen Resten des zuvor verwendeten Isopropanols befreit.

Nach erneuter Zentrifugation (12.000 rpm, 15 min, 4°C) und Entfernung des Überstands trocknen wir das entstandene Pellet für 5 min an der Luft um verbliebene Alkoholreste der Probe sich verflüchtigen zu lassen. Im Anschluss nehmen wir das Pellet in 20 µl Wasser auf.

10 µl der entstandenen gereinigten 20µl RNA-Suspension frieren wir bei -70°C ein, die anderen 10µl bringen wir in den – wie folgt beschriebenen – cDNA-Synthese-Verfahren ein.

2.2.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die Abkürzung cDNA steht für „complementary DNA“. Diese wird aus RNA durch die reverse Transkriptase erstellt, die man ebenfalls von bestimmten Viren kennt. Bei unseren molekularbiologischen Untersuchungen verwenden wir cDNA als Ausgangsmaterial für die PCR.

In jede unserer 10 µl RNA-Wasser-Suspensionen wird zunächst ein Hexanukleotid-Mix (1 µl, bezogen von Roche, Mannheim)¹¹ zugegeben. Entsprechend der Methode der „random primed“ Markierung nach Feinberg und Vogelstein erfolgt hierbei eine Hybridisierung einer Mischung von Hexanukleotiden aller möglichen Basensequenzen an die zu markierende Nukleinsäure. Diese Komponenten sind jeweils zu statistisch gleichen Anteilen enthalten.

Im Folgenden geben wir zu jeder der zu amplifizierenden Proben First-Strand Puffer (FS, 4 µl) und Dithiothreitol (DTT, Cleland's reagent, 2 µl, 0,1 M). DTT reduziert Disulfide in ihre entsprechenden Thiole und wird in niedrigen Konzentrationen zur Stabilisierung von Enzymen benutzt, die freie Sulfhydryl-Gruppen enthalten. FS und DTT haben wir im Set von Invitrogen, Karlsruhe, bezogen. Wir geben einen Mix von

¹¹ Inhaltsstoffe des zugegebenen Mix mit zehnfach konzentriertem Reaktionspuffer: 0,5 M Tris-HCl, 0,1 M MgCl₂, 1 mM Dithioerythrit (DTE), 2mg/ml Rindereserumalbumin (RSA), 1,25 mM Hexanukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

Nukleotidtriphosphaten (dNTP, 1 µl, 10 mM, bezogen von Applied Biosystems) zu jeder unserer Proben.

Wir verwenden des weiteren Protector RNase Inhibitor (RNAsin, 1 µl, 40 Units/µl, bezogen von Roche, Mannheim). RNAsin hemmt ein weites Spektrum an RNasen, RNase-A, -B und -T2 eingeschlossen. Es interferiert nicht mit Enzymen, die verbreitet Anwendung finden bei der RNA-Analyse.

Abschließend geben wir zu jeder Probe SuperScript-II-Reverse-Transcriptase¹² (1 µl, bezogen von Invitrogen, Karlsruhe) und erhitzen die Lösung für eine Stunde auf 42°C. Inaktivierung der Enzymaktivität tritt bei 95°C für 5 min ein.

Die Lagerung der hergestellten cDNA bis zur PCR-Verwendung erfolgt bei -20°C.

2.2.6 Real-time quantitative PCR (RT-PCR), allgemeine Technik

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist das entscheidende Werkzeug der Molekularbiologie. Man benötigt hierzu eine thermostabile Polymerase, ein wenig Ausgangs-Nukleotidsäure und zwei passende Oligonukleotidprimer. Die RT-PCR sieht zudem ein geeignetes Detektionssystem vor.

Das typische PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt (bei 94°C, Aufspaltung von Doppelsträngen), einem Annealingschritt (bei 55°C, Hybridisierung des vorhandenen Oligonukleotidprimers mit dem Template-Material) und einem Elongationsschritt (bei 72°C entsprechend dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase). Bei der Amplifikation werden standardmäßig 30 Zyklen durchlaufen, dabei Aufteilung 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 55°C und 90 sec bei 72°C.

¹² Das Enzym ist ein mutierter Abkömmling der „Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase“ (M-MLV-RT). Es handelt sich um eine DNA-Polymerase, die DNA oder RNA als Matrize verwendet. Bei wild-typ Reversen Transkriptasen konkurriert deren RNase-H-Aktivität mit der 5' à 3' DNA-Polymerase-Aktivität, was die Elongation des Template-Primer-Komplexes inhibiert und zu einer reduzierten cDNA-Ausbeute führt. In dem von uns verwendeten Polymerase-Derivat ist die RNase-H-Aktivität eliminiert; ein um mehr als 50%-iger Anstieg der cDNA unbeschnittener Länge war somit zu erwarten.

Zudem war die von uns verwendete Polymerase durch seine veränderte Struktur deutlich thermostabiler, erlaubte First-Strand-Synthesen bei Temperaturen bis 50°C.

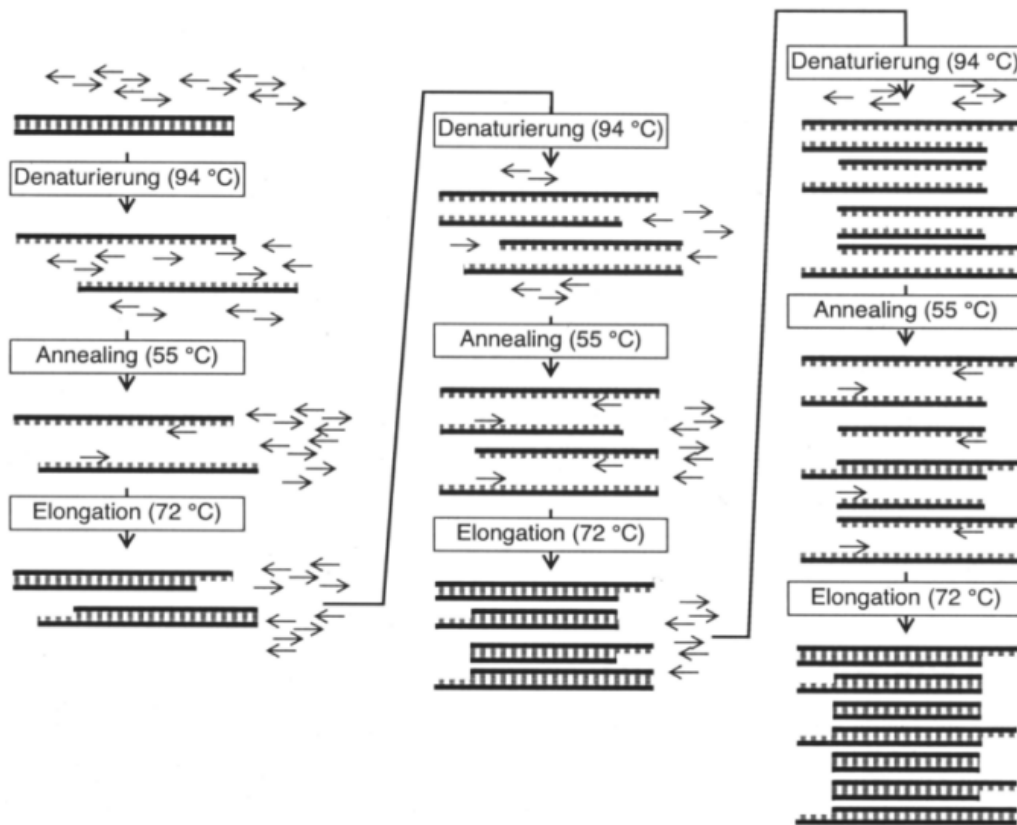


Abb. 13: Schema einer Standard-PCR: 1. Schritt (Denaturierung): Die Template-DNA wird auf 94°C erhitzt, die beiden Stränge trennen sich. 2. Schritt (Annealing): Die Temperatur wird gesenkt um den Primern Gelegenheit zu geben an die DNA zu hybridisieren. 3. Schritt (Elongation): Die Temperatur wird auf das Arbeitsoptimum der Polymerase erhöht um eine optimale Zweitstrangsynthese zu erlauben. Am Ende eines Zyklus ist die DNA nahezu verdoppelt worden.

Die RT-PCR nach TaqMan-Prinzip beinhaltet zusätzlich ein Fluoreszenz-Detektionssystem. Die PCR-Maschine ist ausgestattet mit UV-Lampe und CCD-Kamera (Charge-Coupled Device). Zusätzlich nutzt man den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (fluorescence resonance energy transfer, FRET) aus: Ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) lässt sich mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (A1) anregen und strahlt die aufgenommene Energie anschließend in Form einer anderen Wellenlänge (E1) wieder ab (Anregungs- und Emissionsspektrum charakteristisch). Bringt man ein zweites Fluorochrom (F2) in ausreichende Nähe des ersteren, wird die Energie direkt an F2 weitergegeben (anstelle der Emission der Wellenlänge E1) – Licht der Wellenlänge E2 entsteht. F1 übernimmt die Funktion des Reporters, F2 die des Quenchers. Das Prinzip der Messung während der RT-PCR besteht nun in der relativen Abstandsmessung der beiden Fluorochrome zueinander.

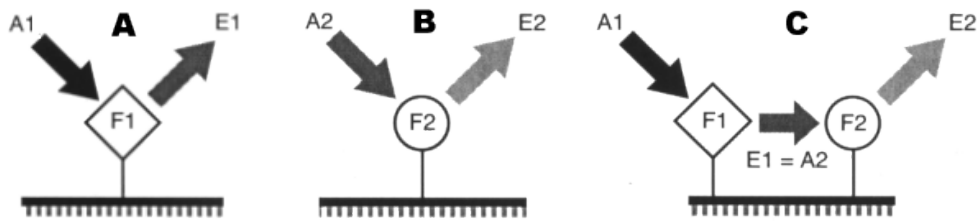


Abb. 14: Prinzip des *fluorescence resonance energy transfer* (FRET). Fluorochrom F1 besitzt ein charakteristisches Anregungs- und Emissionsspektrum (A1, E1) – analog F2 (A2, E2). Sind beide Fluorochrome nahe zu einander lokalisiert, kann das emittierte Licht von F1 dann F2 anregen und es entsteht das Licht E2. Regt man mit der Wellenlänge A1 an, kann man durch Messung von E1 bzw. E2 verfolgen, ob F1 und F2 getrennt oder benachbart sind.

Beim TaqMan-Prinzip sitzen beide Fluorochrome auf dem selben Oligonukleotid, vorzugsweise auf dem 5'- und 3'-Ende. Solange das Oligonukleotid intakt ist, ist die Lichtstärke bei E1 gering – wird F2 bei durch die herannahende Polymerase freigesetzt, steigt die Lichtstärke von E1 an. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto höher ist die resultierende Lichtstärke.

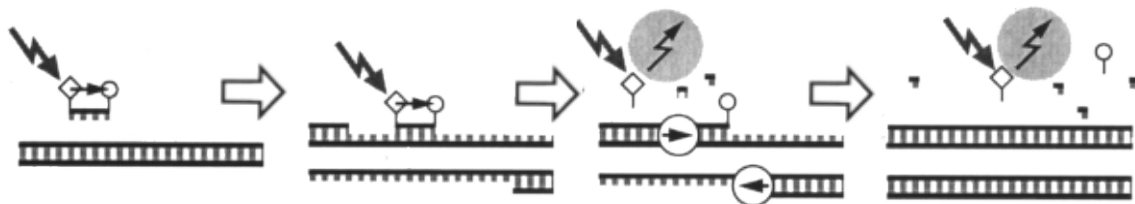


Abb. 15: Prinzip TaqMan: Sonden fluoreszieren, wenn das Oligonukleotid von der Polymerase abgebaut wurde.

2.2.7 Real-time quantitative PCR (RT-PCR), unsere Anwendung

In unserem Ansatz interessieren wir uns explizit für die mRNA-Expression von PGES. Also bezogen wir einen Assay-on-Demand von Applied-Biosystems, Foster City, CA, USA. Dieser erlaubt anhand präformierter und getesteter Primer eine einfache Handhabung der Amplifikation unseres Zielgens (PGES). Komponenten des kommerziell erworbenen Kits – ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer – ermöglichen die Amplifikation ausschließlich von PGES-kodierenden Materials, d.h. von cDNA-Abschnitten definierter Länge. Die als Probe verwendeten Oligonukleotide sind am 5'-Ende mit 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) als Reporter und am 3'-Ende mit 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) als Quencher markiert und zusätzlich mit

einem Phosphatrest blockiert. Beide Farbstoffe sind anzuregen bei Wellenlänge 488nm, FAM emittiert Licht der Wellenlänge 518nm und TAMRA Licht der Wellenlänge 582nm.

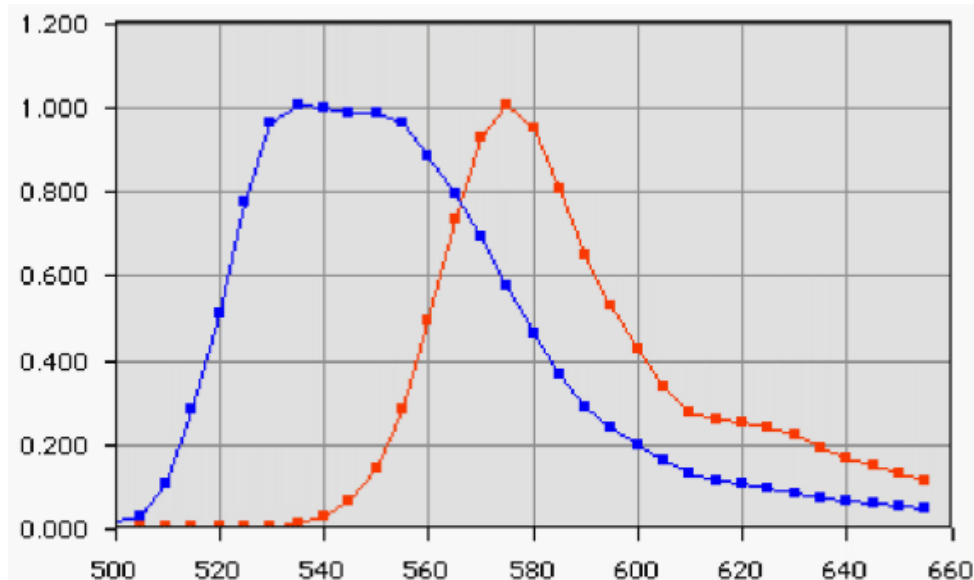


Abb. 16: Relative Emissionsintensität von FAM und TAMRA. Emissionsstärke abhängig von anregender Wellenlänge λ (x-Achse); links Spektrum von FAM, rechts das von TAMRA.

Zunächst geben wir zu 8,5 μ l Wasser 15 μ l Mastermix (MM, bezogen von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Dieser beinhaltet die AmpliTag Gold® DNA Polymerase, eine hitzebeständige Polymerase mit ausschließlich 5' à 3'-Aktivität. Zusätzlicher Bestandteil von MM ist AmpErase® UNG¹³, das der Reamplifikation von carryover-Produkten (Verunreinigungen, Kontaminationen) vorbeugt, die in Doppelstrang-DNA inkorporiertes Uracil (dUTP) enthalten. Des weiteren sind im MM dNTPs mit dUTP und optimierte Puffersubstanzen enthalten.

Wir geben 1,5 μ l des obigen Assays-on-Demand hinzu, erhalten einen Mix von 25 μ l Analyselösung. Eine MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (bezogen von Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wird Well-weise mit der oben hergestellten Lösung befüllt. Abschließend werden jeweils 5 μ l zuvor aufgetauter und im vorigen

¹³ Bei AmpErase Uracil-N-Glycosylase (AmpErase UNG) handelt es sich um Nuclease-freies, 26 kDa großes, rekombiniertes Enzym durch das Escherichia coli Uracil-N-Glycosylase-Gen kodiert wird. Uracil-N-Glycosylase (UNG) wirkt auf ein- oder doppelsträngige DNA, die Uracil enthält; es hydrolysiert Uracil-Zucker-Bindungen. Das Enzym veranlasst ein Uracil-Release und produziert so eine alkalisensitive Lücke in der DNA. UNG hat keine Wirkung auf RNA oder Thymidin-tragende DNA. Wenn Uracil Thymidin ersetzt, können bis zu 200.000 Amplikons pro 50 μ l Reaktionslösung eliminiert werden.

Abschnitt hergestellter cDNA zur RT-PCR-Bestimmung in die vorbereiteten Wells gegeben. Jeweils zwei sich nebeneinander befindliche Proben (Doppelbestimmung) stammen zur verbesserten Reliabilität unserer Messungen vom selben Tumorpräparat.

Die RT-PCR-Analyse wird mit dem Abi Prism 7700 Sequence Detector (hergestellt von Perkin Elmer) durchgeführt. Zunächst wird zur AmpErase-UNG-Verdauung für 2 min eine Temperatur von 50°C eingestellt. Anschließend folgt zur Aufspaltung von doppelsträngigen DNA-Arealen für 10 min eine Temperatur von 95°C. Im Weiteren Verlauf wird mit 40 Zyklen fortgefahren, dabei stetiger Wechsel zwischen 15 sec bei 95°C (Aufspaltung DNA-Doppelstrang) und 1 min bei 60°C (DNA-Amplifikation durch AmpliTaq Gold® DNA Polymerase).

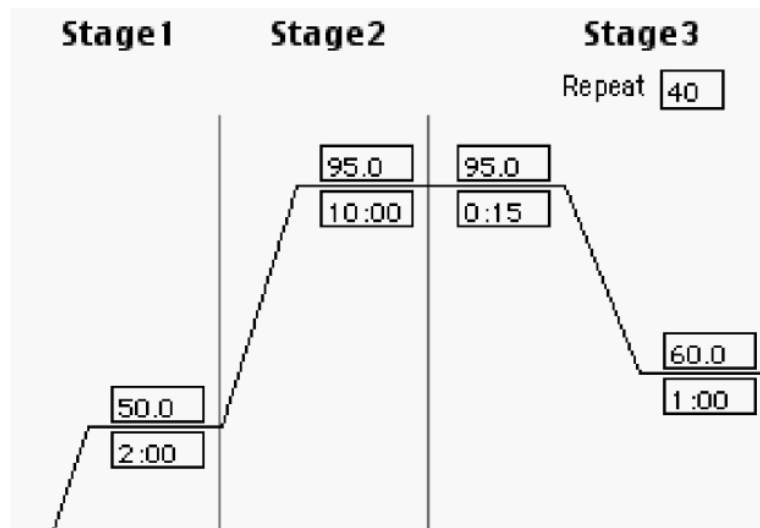


Abb. 17: Schema des Amplifikationsvorgangs von PGES durch Abi Prism 7700 Sequence Detector.

2.2.8. Verarbeitung der erhobenen Daten

Die erhobenen Daten werden in Zahlenwerten zwischen 0 und 40 wiedergegeben. Sie entsprechen der Anzahl der erforderlichen Amplifikationszyklen bis zum Erreichen eines bestimmten Grenzwerts an PGES-Genmenge bzw. eines Grenzwerts an gemessener Fluoreszenz. Diesen Grenzwert (Threshold) von 0,02 legen wir manuell fest. Er liegt somit im mittleren Bereich der sigmoidalen Messkurven, die dort maximal linear verlaufen.

Da wir sämtliche PGES-Bestimmungen zur verbesserten Reliabilität zweifach durchführen, fließt der berechnete Mittelwert beider Messungen in die weiteren Berechnungen ein.

Um Absolutwerte der PGES-Menge der jeweiligen Tumorprobe zu erhalten, bedienen wir uns einer analog bestimmten Standardkurve mit uns bekanntem PGES-Gehalt (siehe Abb. 10).

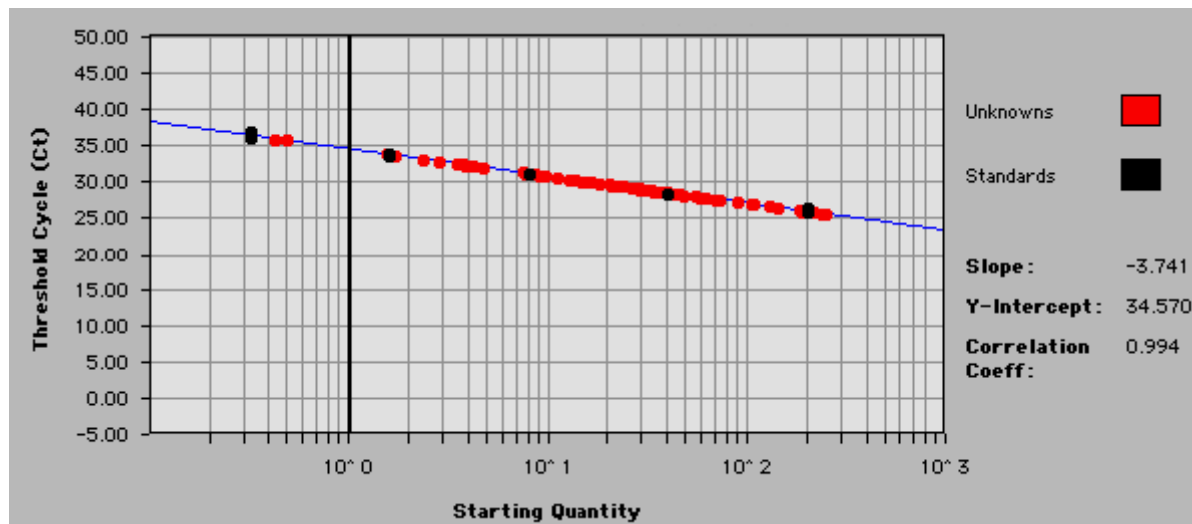


Abb. 18: Standard-Kurve für PGES. Definierte Ausgangsmengen an PGES-Genmaterial führen zu kontrolliert-linearem Erreichen eines definierten Grenzwertes nach einer bestimmten Anzahl an Amplifikationszyklen. Die Messergebnisse dieser bekannten Probelösung können als Standard für unbekannte Lösungen und zugehörige Berechnungen verwendet werden. Steigung (a, Slope) = -3,741. Y-Achsenabschnitt (b, Y-Intercept) = 34,570.

Die Überführung der PGES-Messwerte in die PGES-Konzentrationen erfolgt mittels Umrechnung. Hierzu nötig sind zudem Steigung der Standardkurve a (Slope) und der Y-Achsenabschnitt b (Y-Intercept).

$$Q = 10^{\frac{Z-b}{a}}$$

dabei entspricht

- Q der realen Konzentration genetischem Materials,
- Z der mit RT-PCR bestimmten Zykluszahl bis zum Erreichen des Threshold,
- a der Steigung der Standardkurve (Slope),
- b dem Y-Achsenabschnitt (Y-Intercept).

Analog der Bestimmung der PGES-Quantität erfolgt die der GAPDH-Quantität. GAPDH dient als Housekeeping-Gen. Es wird in allen Zellen konstitutiv in gleicher Menge exprimiert und kann damit als Referenzwert genutzt werden.

Der Quotient der Konzentrationen von PGES und GAPDH ermöglicht nun den Vergleich der unterschiedlichen Tumorproben hinsichtlich ihrer PGES-Genexpression. Der Vergleich der PGES-Expression erfolgt somit semiquantitativ.

2.3 Statistische Tests

Im Weiteren werden unsere semiquantitativ bestimmten PGES-Werte statistischen Tests unterzogen um nach möglichen Korrelationen mit der Expression anderer Gene, klinisch-pathologischen Parametern und dem Survival der Patienten zu suchen. Für die statistischen Erhebungen bedienen wir uns der gebräuchlichen Software SPSS.

2.3.1 Spearman's Rho Test

Zusammen mit Kendalls Tau (τ) ist Spearman's Rho der bevorzugt verwendete Rangkorrelationskoeffizient. Der Koeffizient ist vor allem nützlich, wenn die Zahl der Beobachtungen klein ist. Er setzt voraus, dass die zu vergleichenden Zahlen normalverteilt und die Abstände der einzelnen Rangplätze gleich oder annähernd gleich bzw. nur zufällig nicht gleich sind. Er wurde als Sonderfall des Produkt-Moment-Korrelations-Koeffizienten entwickelt.

Wir verwenden den Spearman's Rho Test zur Untersuchung von PGES-Expression auf Korrelationen mit den anderen in unserem Ansatz relevanten Genen COX-1, COX-2, VEGF-A, VEGF-C und TGF β . Die Korrelation ist jeweils auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

2.3.2 Mann-Whitney-Test (U-Test)

Es handelt sich hierbei um einen parameterfreien Signifikanztest zur Prüfung der Hypothese, dass zwei unabhängige Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen. Er setzt das Vorhandensein ordinalskalierter Daten voraus, die eine Rangreihe bilden. Der U-Test gibt an, wie viele Werte der Stichprobe N_1 insgesamt jedem einzelnen Wert der Vergleichsstichprobe N_2 vorausgehen. Geprüft wird dabei auf Unterschiede der zentralen Tendenz.

Wir verwenden den U-Test zur Untersuchung von PGES auf Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern (T, N, Grade G, UICC-Klassifikation, WHO-Klassifikation, Lymphgefäße, Mikrogefäßdichte). Für die Subgruppenanalyse wurden Fälle mit lokal limitierten Tumoren (pT1 und pT2) zusammengefasst und mit lokal fortgeschrittenen Tumoren (pT3) verglichen; Tumoren mit Lymphknotenmetastasen mit Tumoren (N1) ohne Lymphknotenmetastasen (N0); Tumoren mit Lymphgefäßinvasion (L1) mit Tumoren ohne Lymphgefäßinvasion (L0); Tumorgrading nach

der WHO-Klassifikation, gut bis mäßig differenzierte Tumoren mit schlecht differenzierten Tumoren.

2.3.3 Univariate Überlebensanalyse

Für diese Untersuchung ziehen wir verfügbare Überlebensinformationen von der in unsere Studie eingeschlossenen Patientenpopulation heran. Zur Erstellung von Überlebenskurven bedienen wir uns der Methoden von Kaplan und Meier (Kaplan et al., 1958). Mittels Log-Rank-Test werden Berechnungen zur Prüfung der statistischen Signifikanz von Unterschieden der gewonnenen Überlebenskurven durchgeführt.

Zur kategorisierten Analyse der unterschiedlichen PGES-Expressionen unterteilen wir die in die Studie eingeschlossenen Patienten in jeweils zwei Gruppen (0=geringe PGES-Expression, 1=hohe Expression). Des Weiteren unterscheiden wir zur Kategorisierung der PGES-Expression eine Überlebenszeit länger oder kürzer als der Median, Mittelwert, der ersten und dritten Quartile.

Bei der Kaplan-Meier-Methode werden Schätzungen für die Survivalrate $S_n(t)$ nur an den Ereigniszeitpunkten, d.h. an den Zeitpunkten der Sterbefälle vorgenommen, während die zensierten Fälle lediglich jeweils die Risikopopulation der später eintretenden Ereignisse verringern.¹⁴ Problematisch sind Zensierungen nach dem letzten Ereignis (Sterbefall) – die Survivalfunktion kann dann nicht mehr gegen null gehen. Die Kaplan-Meier-Funktion darf also nur bis zum letzten Ereignis (Sterbefall mit höchster Survivalzeit) interpretiert werden.

¹⁴ Bei der Kaplan-Meier-Methode handelt es sich um eine so genannte Maximum-Likelihood-Schätzung. Dies bedeutet, dass der mit dieser Methode ermittelte Schätzwert aus der Menge aller möglichen Schätzwerte derjenige ist, dem aufgrund der beobachteten Stichprobe die größte Wahrscheinlichkeit zukommt.

3 Ergebnisse

3.1. PGES-Expression auf mRNA-Ebene (Quantitative RT-PCR)

Alle 123 untersuchte Tumore (100%) zeigten eine PGES-Expression auf mRNA-Ebene. Die relative mRNA-Expression (PGES/GAPDH ratio) war höchst variabel bei den einzelnen Tumorproben. Das mittlere mRNA-Expressionsniveau war 10,72 [range 0,35 – 68,41]. Die durchschnittliche relative mRNA-Expression \pm Standardabweichung betrug $13,41 \pm 12,36$.

		n	Mittleres relatives PGES Genexpressionsniveau (PGES/GAPDH ratio) \pm Standardabweichung
Gesamt-population		123	13.41 ± 12.36
pT	pT1/2	79	12.08 ± 10.64
	pT3	44	15.77 ± 14.89
pN	pN0	72	13.36 ± 11.53
	pN1	51	13.48 ± 13.70
L	L0	34	13.46 ± 13.35
	L1	89	13.28 ± 9.73
G	G1/2	64	11.77 ± 9.13
	G3	59	15.16 ± 15.04

Tab. 3: Kategorisierung von Patienten/Tumoren nach klinisch-pathologischen Parametern und PGES-Genexpressionsniveau.

Die Bestimmung der Genespressionslevel – in Abhängigkeit zum GAPDH-Niveau – erzielte folgende Ergebnisse:

	PGES	COX-1	COX-2	VEGF-A	VEGF-C	TGF β
Mittelwert	12,975	9,565	23,558	5,868	0,034	4,530
Median	10,721	4,269	10,701	2,761	0,002	2,894
Minimum	0,351	0,011	0,049	0,076	0,000	0,057
Maximum	68,406	108,109	300,792	104,565	0,357	25,869

Tab. 4: Statistische Grenzwerte der analysierten Genexpressionslevel (Ergebnisse ergänzt aus folgenden Arbeiten: von Rahden et al., 2005, 2006)

PGES	COX1	COX2	VEGFA	VEGFC	TGFβ
Signifikanz (p)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Korrelations-Koef. (r)	0,502	0,679	0,583	0,462	0,621
Fallzahl (n)	123				

Tab. 5: Korrelation der PGES mit den anderen analysierten Genen

Die relativen Genexpressionslevel der 123 untersuchten Barrett-Karzinome von PGES und COX-1 zeigen eine statistisch hoch-signifikante, positive Korrelation ($r=0,502$; $p<0,001$; Spearman's Rho Test; Abbildung 19). Patienten mit hoher COX-1-Expression zeigen auch hohe PGES Expression.

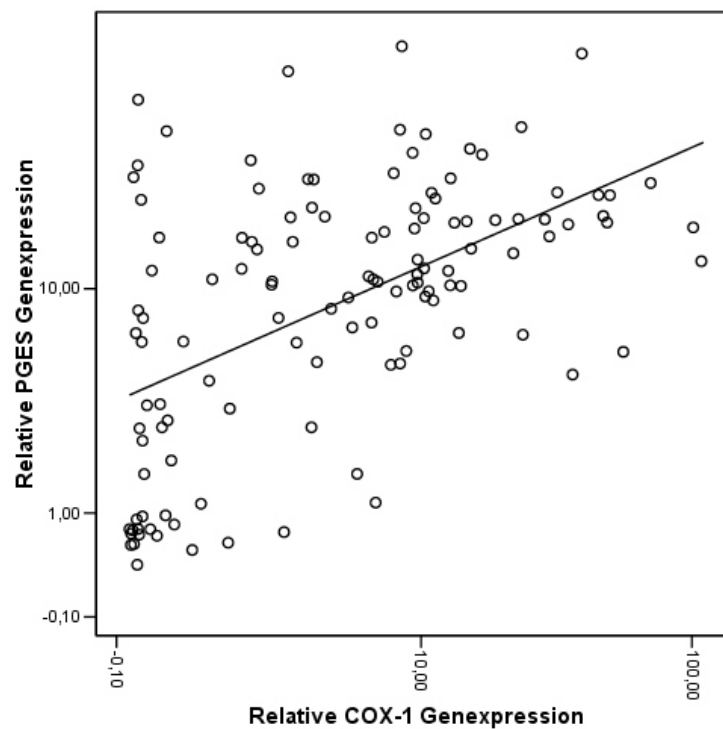


Abb. 19: Hochsignifikante Korrelation von PGES und COX-1

Die relativen Genexpressionslevel der 123 untersuchten Barrett-Karzinome von PGES und COX-2 zeigen eine statistisch hochsignifikante, positive Korrelation ($r=0,679$; $p<0,001$; Spearman's Rho Test; Abbildung 20). Patienten mit hoher COX-2-Expression zeigen auch hohe PGES-Expression.

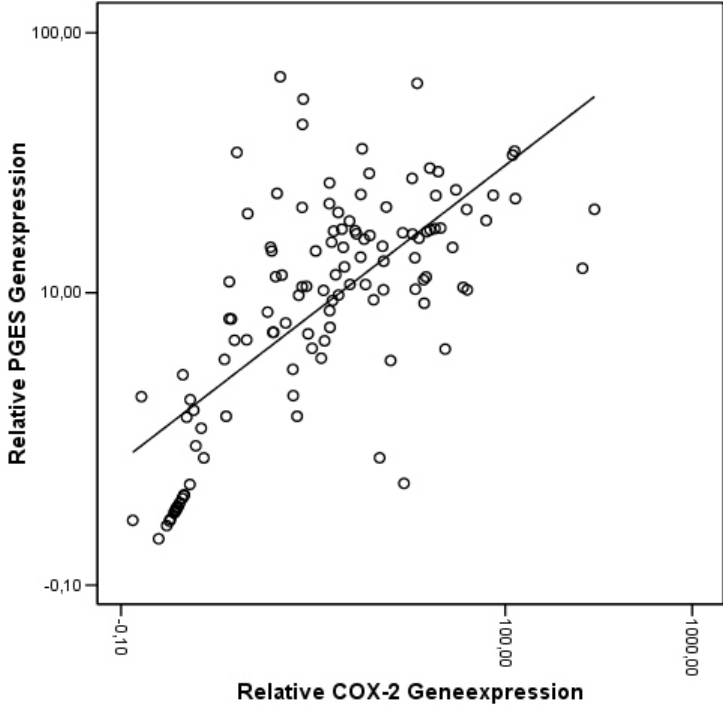


Abb. 20: Hochsignifikante Korrelation von PGES und COX-2

Die relativen Genexpressionslevel der 123 untersuchten Barrett-Karzinome von PGES und VEGF-A zeigen eine statistisch hochsignifikante, positive Korrelation ($r=0,583$; $p<0,001$; Spearman's Rho Test; Abbildung 21). Patienten mit hoher VEGF-A-Expression zeigen auch hohe PGES-Expression.

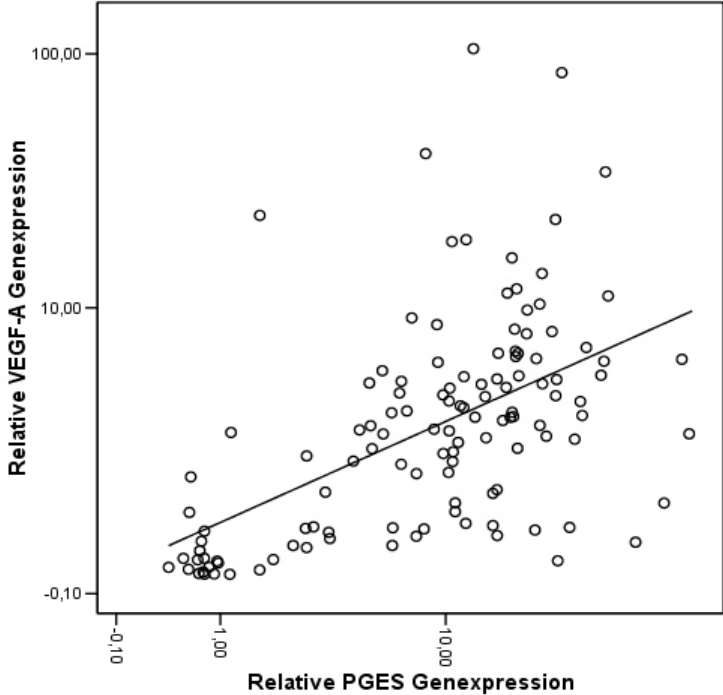


Abb. 21: Hochsignifikante Korrelation von PGES und VEGF-A

Die relativen Genexpressionslevel der 123 untersuchten Barrett-Karzinome von PGES und VEGF-A zeigen eine statistisch hochsignifikante, positive Korrelation ($r=0,462$; $p<0,001$; Spearman's Rho Test; Abbildung 22). Patienten mit hoher VEGF-C-Expression zeigen auch eine hohe PGES-Expression.

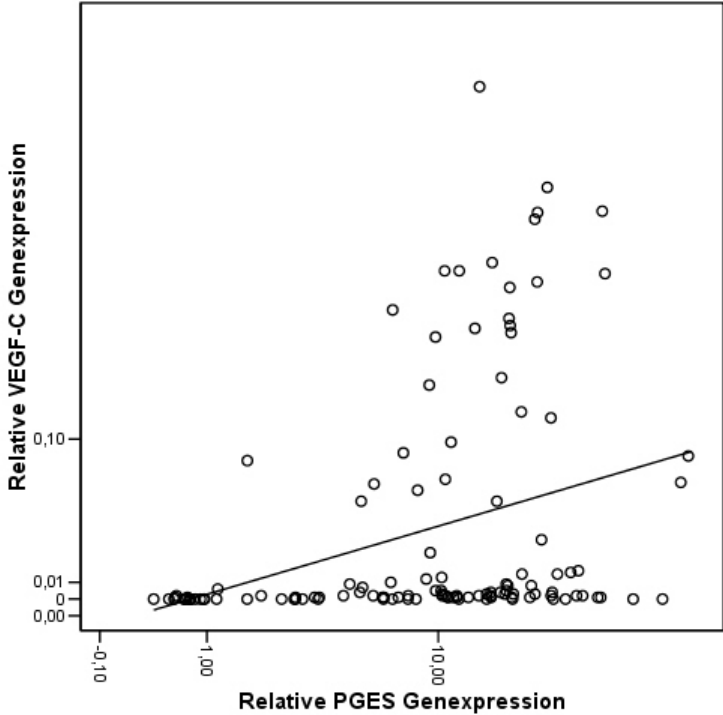


Abb. 22: Hochsignifikante Korrelation von PGES und VEGF-C

Die relativen Genexpressionslevel der 123 untersuchten Barrett-Karzinome von PGES und TGFβ zeigen eine statistisch hochsignifikante positive Korrelation ($r=0,621$; $p<0,001$; Spearman's Rho Test; Abbildung 23). Patienten mit hoher TGFβ-Expression zeigen auch eine hohe PGES-Expression.

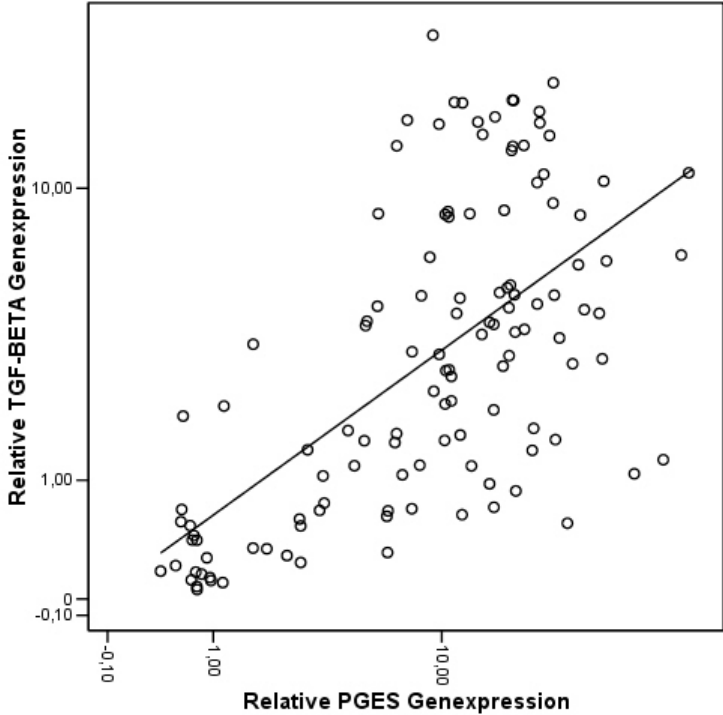


Abb. 23: Hochsignifikante Korrelation von PGES und TGFβ

3.2. Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern

Die relativen Genexpressionslevel von PGES wurden auf Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern mit Mann-Whitney-U-Testverfahren untersucht.

	Einteilung	p	n	Mann-Whitney-U-Test			
				U	Mittlerer Rang	Rangsumme	Z
pT	pT1/2	0,191	79	1471,000	58,36	4552,00	1,306
	pT3/4		44		67,07	2951,00	
pN	pN0	0,905	72	1777,000	61,82	4451,00	0,120
	pN1		51		61,04	3052,00	
G	G1/2	0,464	64	1715,500	59,23	3731,50	0,733
	G3/4		59		63,92	3771,50	
R-Kategorie	R0	0,655	106	789,000	60,94	6460,00	0,447
	R1		17		65,19	1043,00	
LVI	L0	0,541	34	1389,000	60,28	5305,00	0,611
	L1		89		64,65	2198,00	
UICC	I/II	0,635	52	780,500	41,51	2158,50	0,474
	III/IV		33		44,11	1411,50	
WHO	tubulär	0,651	70	1428,500	58,09	4066,50	0,452
	tubulopapilär		44		55,22	2374,50	

Tab. 6: Korrelation von PGES mit klinisch-pathologischen Parametern (Mann-Whitney-U-Test)

Der statistische Vergleich der pT-Kategorie-Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich der Korrelation von pT1/2 oder pT3/4 mit PGES ($p=0,191$; $N=123$; Abbildung 24). 79 Patienten zeigten pT1/2, 44 Patienten pT3.

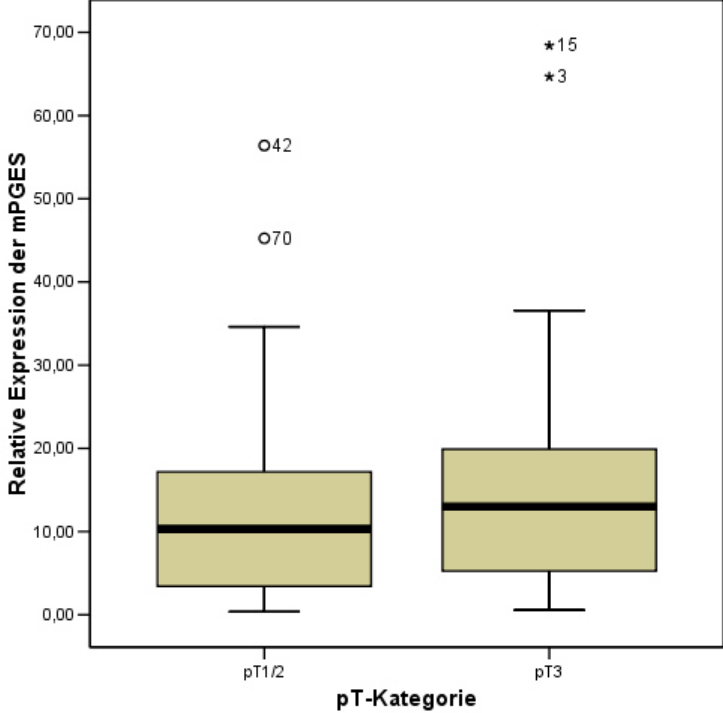


Abb. 24: Korrelation von PGES und pT-Kategorie

Der statistische Vergleich pN-Kategorie-Gruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Korrelation von pN0 oder pN1 mit PGES ($p=0,905$; $N=123$; Abbildung 25). 72 Patienten waren pN0, 51 Patienten pN1.

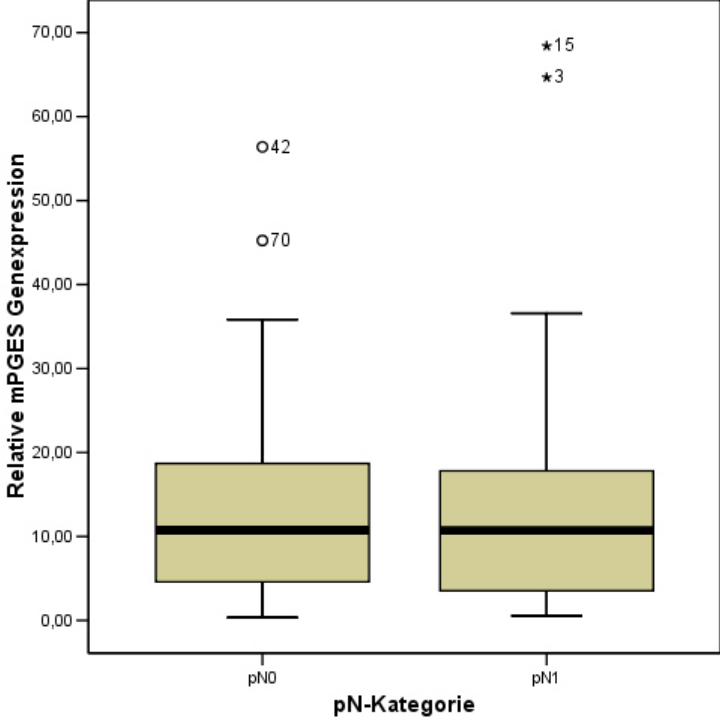


Abb. 25: Korrelation von PGES und pN-Kategorie.

Der statistische Vergleich der G-Kategorie-Gruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Korrelation von G1/2 oder G3/4 mit PGES ($p=0,464$; $N=123$; Abbildung 26). 64 Patienten waren in Gruppe G1/2, 59 Patienten waren G3.

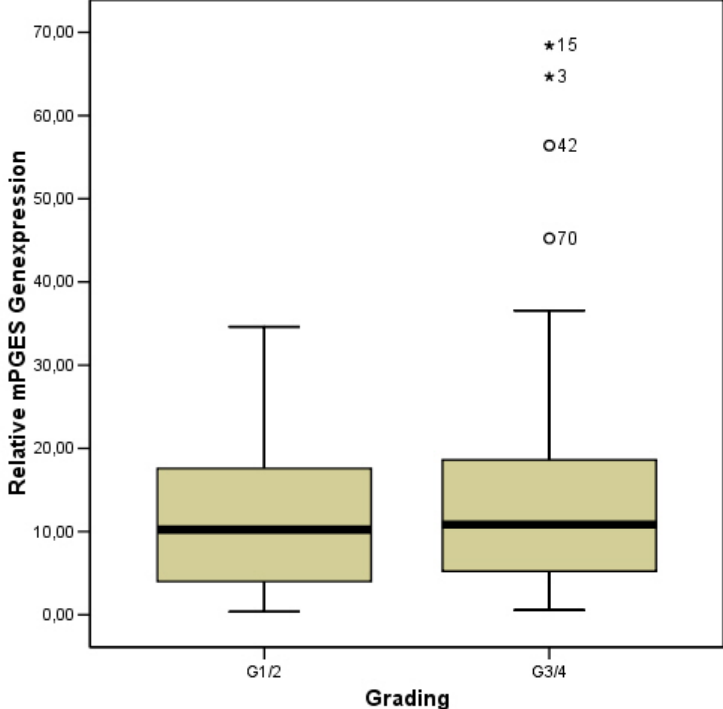


Abb. 26: Korrelation von PGES und Grading.

Der statistische Vergleich der R-Klasse-Gruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Korrelation von R0 oder R1 mit PGES ($p=0,655$; $N=123$; Abbildung 27). R0-Resektion erfolgte bei 106 Patienten, R1 bei 17 Patienten.

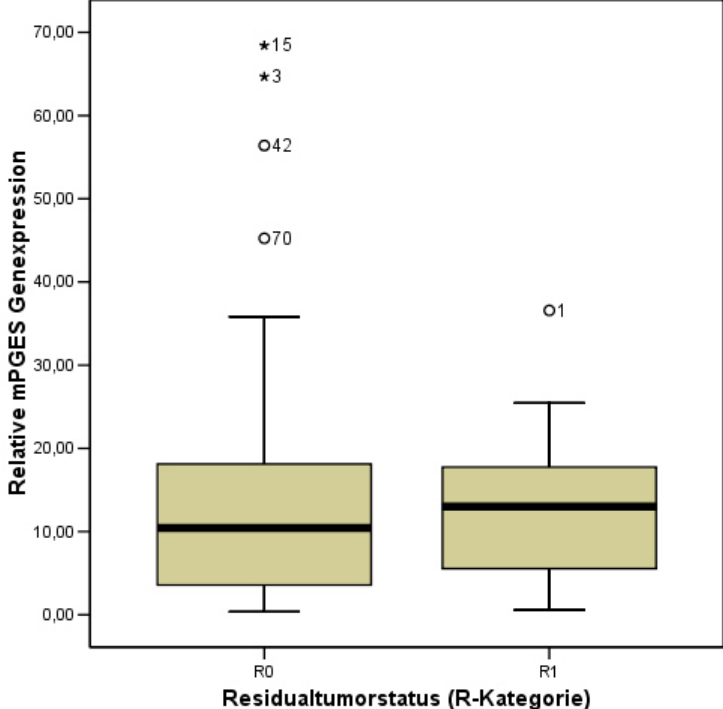


Abb. 27: Korrelation von PGES und R-Status.

Der statistische Vergleich der LVI-Klasse-Gruppen (Lymphgefäßinvasion) zeigt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Korrelation von L0 oder L1 mit PGES ($p=0,541$; $N=123$; Abbildung 28). 34 Patienten zeigten keine Lymphgefäßinvasion, 89 waren L-positiv.

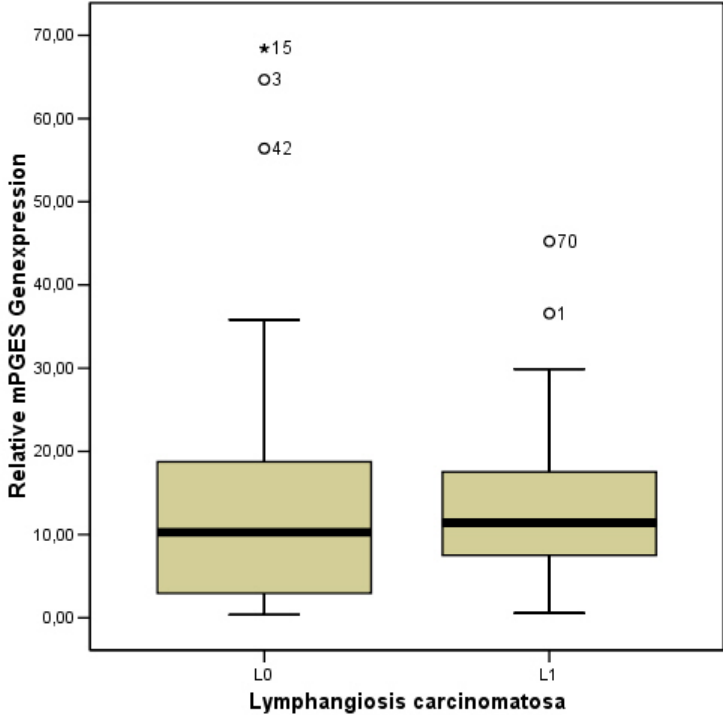


Abb. 28: Korrelation von PGES und LVI

Der statistische Vergleich der UICC-Klassifikations-Gruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Korrelation der Stadien I/II oder III/IV mit PGES ($p=0,635$; $N=123$; Abbildung 29). 70 Patienten waren I/II, 44 Patienten III/IV.

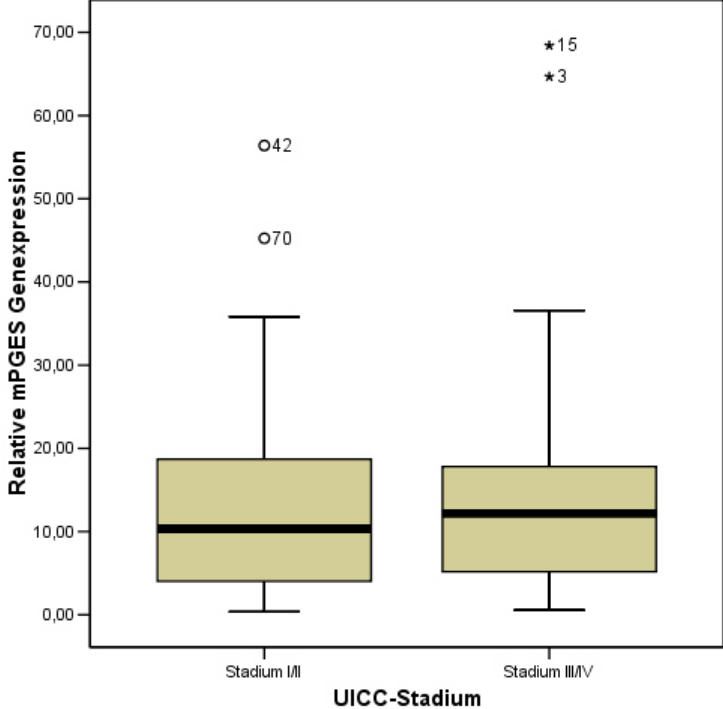


Abb. 29: Korrelation von PGES und UICC-Stadium.

Der statistische Vergleich der WHO-Klassifikations-Gruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Korrelation von Fällen mit tubulären oder tubulo-papilären Wachstums mit PGES ($p=0,651$; $N=123$; Abbildung 30). 70 Patienten zeigten tubuläres Wachstum, 44 Patienten tubulopapiläres Wachstum.

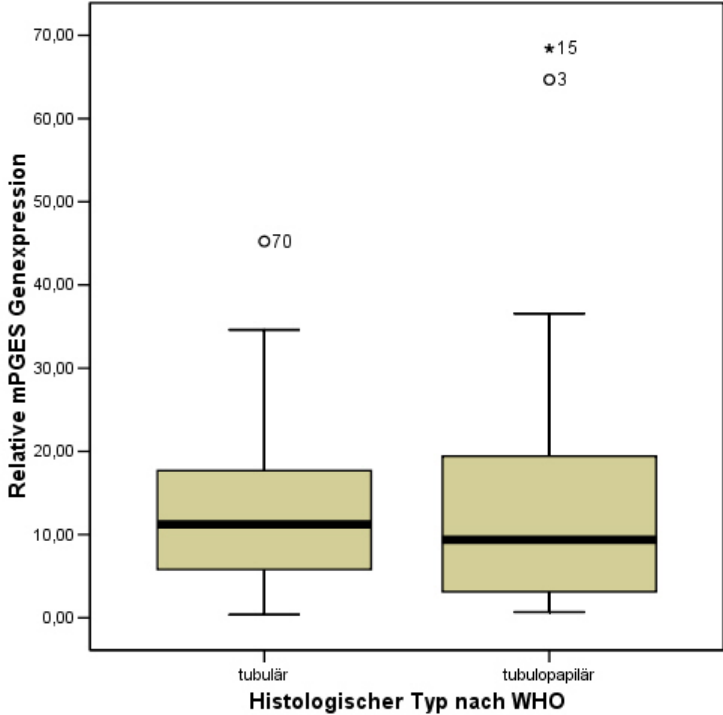


Abb. 30: Korrelation von PGES und histologischem Typ nach WHO.

3.3. Korrelation mit dem Survival

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen PGES-Mittelwert und Überleben konnte gezeigt werden ($p=0,0288$; Abbildung 31). Patienten mit niedrigem PGES leben im Schnitt länger (Einheit X-Achse: Monate).

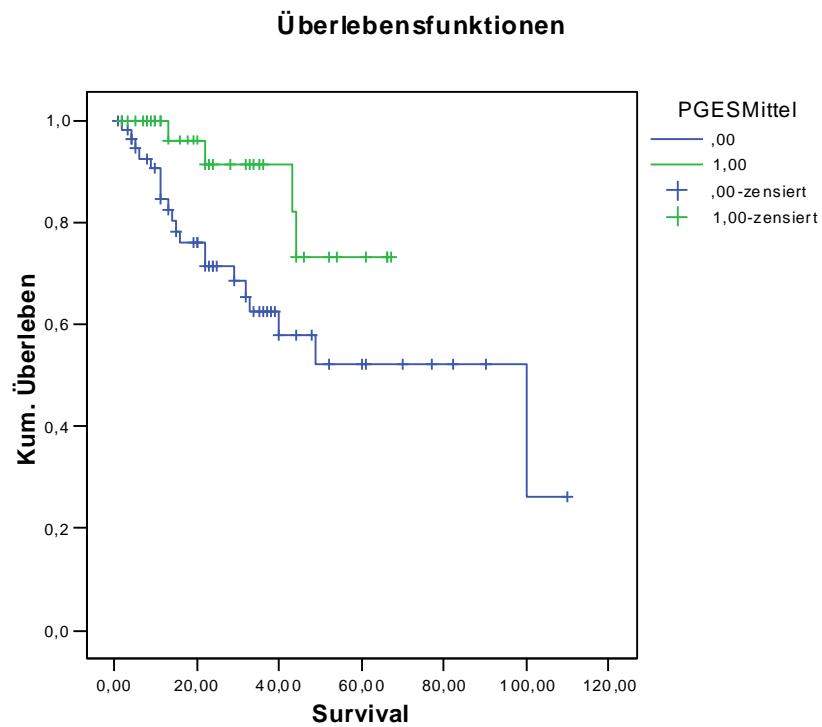


Abb. 31: Korrelation von PGES mit Survival (Mittelwert)

Ein statistisch hoch-signifikanter Zusammenhang zwischen PGES-Median und Überleben zeigt sich nicht auf Signifikanz-Niveau ($p=0,0561$; Abbildung 32). Dennoch besteht der Trend des längeren Überlebens bei niedrigem PGES-Niveau (Einheit X-Achse: Monate).

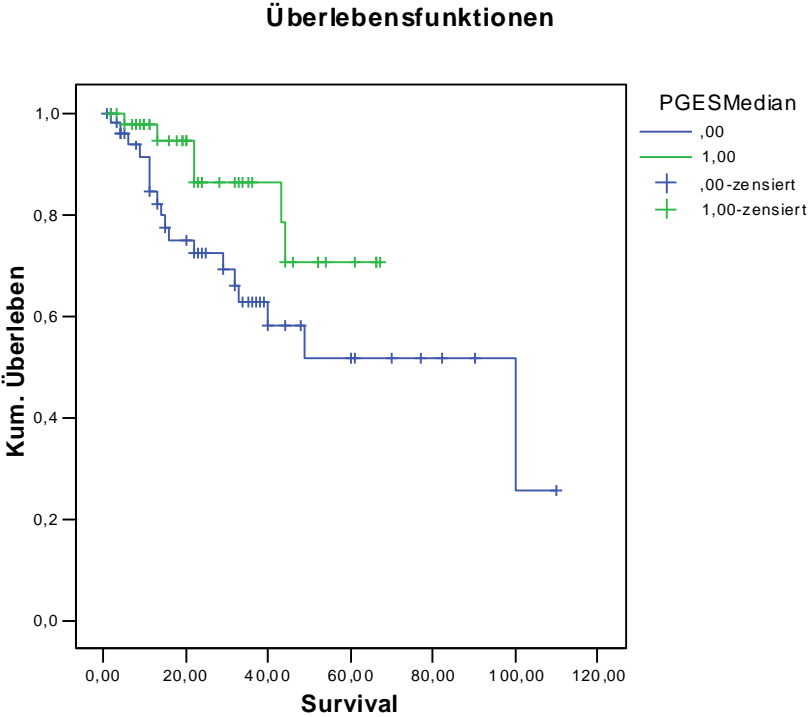


Abb. 32: Korrelation von PGES und Survival (Median).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen PGES 1. Quartile und Überleben zeigt sich nicht ($p=0,9996$; Abbildung 33). Es ist praktisch bedeutungslos, auf welchem Niveau PGES exprimiert ist (Einheit X-Achse: Monate).

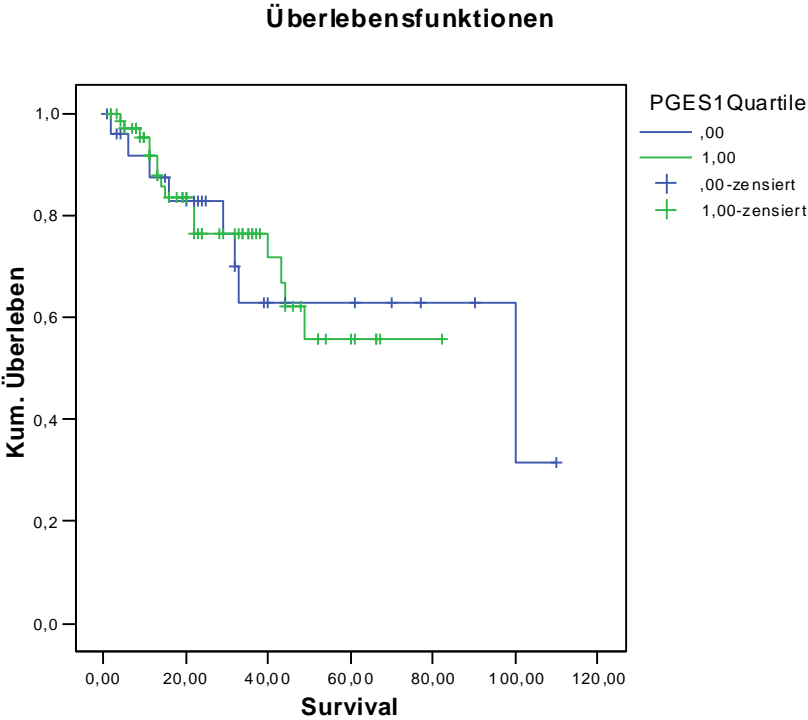
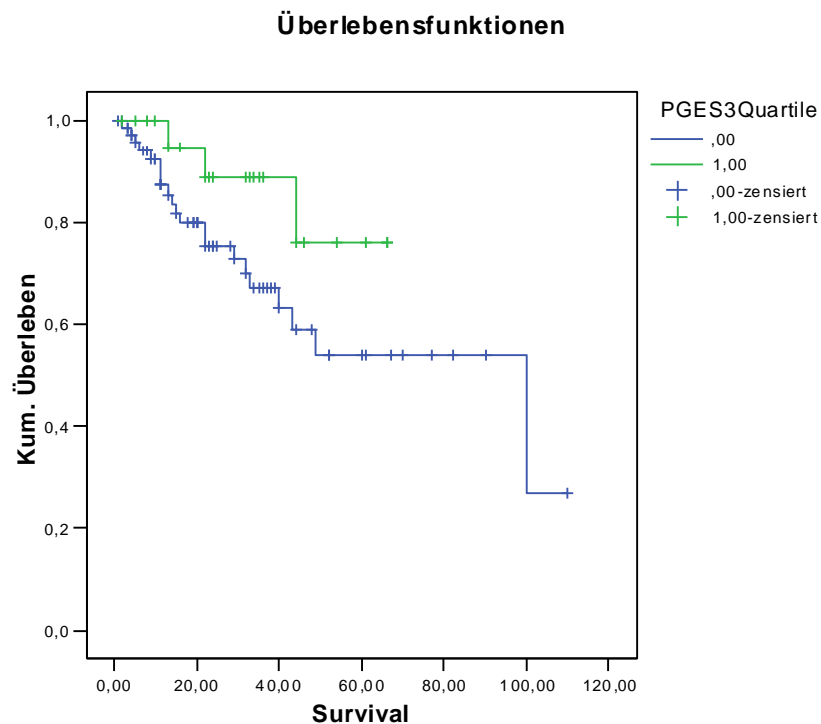


Abb. 33: Korrelation von PGES und mit Survival (1. Quartile)

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen PGES 3. Quartile und Überleben zeigt sich nicht ($p=0,1042$; Abbildung 34). Dennoch erkennt man die Tendenz des längeren Überlebens bei niedrigem PGES-Niveau (Einheit X-Achse: Monate).



Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von PGES und der Überlebensrate beim Adenokarzinom des distalen Ösophagus wurde gefunden. Bei Betrachtung des Mittelwerts wurde eine signifikante Korrelation festgestellt. Bei den anderen Parametern ist eine Tendenz feststellbar, besonders eindrucksvoll beim medianen Überleben.

4. Diskussion

Unsere Daten wurden aus einer grossen Zahl PGES-positiver Barrett-Adenokarzinome erhoben. Sie legen den Einfluss von PGES auf die Karzinogenese dieser Tumorentität nahe: Korrelationen von PGES mit beiden COX-Isoenzymen (COX-1 und COX-2) und pro-angiogenetischen Faktoren (VEGF-A und VEGF-C) verstärken den Verdacht, dass PGES als Mediator des Prostaglandin-Biosynthese-Pathways mit der Angiogenese beim Barrett-Karzinom gekoppelt sein könnte.

Wir haben Untersuchungen an 123 Operationsresektaten von Adenokarzinomen des distalen Ösophagus durchgeführt. Im Zentrum unserer Studie stand die Prostaglandin-E-Synthase auf mRNA-Ebene. Bei unseren statistischen Berechnungen korrelierten wir unsere Messergebnisse mit denen anderer Zielgene – Messungen, die bei den selben Tumorsektaten, allerdings bei einer anderen Versuchsreihe, durchgeführt worden waren (von Rahden et al., 2005, 2006). Des Weiteren flossen klinisch-pathologische Parameter in die statistischen Berechnungen mit ein.

Unsere Untersuchungsergebnisse zum Barrett-Karzinom ergänzen die Resultate früherer Studien zur Rolle von PGES bei der Karzinogenese von Tumoren anderer Entitäten, beispielsweise beim kolorektalen Adenom und Adenokarzinom (Yoshimatsu et al., 2001) und Magenkarzinom (van Rees et al., 2003). Bei den aufgeführten Tumorentitäten ist PGES meistens exprimiert.

Unsere semi-quantitative Expressionsanalyse basiert u.a. auf der Annahme, dass GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) als Housekeeping-Gen konstitutiv und unabhängig von kanzeröser Entartung exprimiert wird. GAPDH ist eines der am häufigsten gebrauchten Gene zur Normalisierung der Messung (Barber et al., 2005; von Rahden et al., 2005).

4.1. Cyclooxygenasen und PGES

Der Einfluss des Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2) und seines Hauptprodukts Prostaglandin-E (PGE₂) auf die Krebsentstehung ist durch verschiedene Studien gut belegt (Uefuji et al., 2000; Sheng et al., 1998 und 2001). Das relative Risiko an malignen Tumoren zu erkranken ist bei gleichzeitiger Applikation von nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Medikamenten reduziert (Thun et al., 1993; Akhmedkhanov et al., 2001, 2002; Funkhouser et Sharp, 1995; Farrow et al., 1998). Die Expression von COX-2 ist in etwa 90% der kolorektalen Tumoren erhöht, so auch

in ca. 50% der prämaligen Adenome (Marnett, L. et al., 1992; Rao et al., 1995). Die COX-2-Expression – ungeachtet anderer Parameter – führt zu vermehrtem Wachstum und einem Überlebensvorteil der Tumorzellen, sowie auffällig erhöhter Tumorinvasivität (Kaur et al., 2002; Buttar et al., 2000; Bundred et Barnes, 2005; Ramirez et al., 2005; Kokawa et al., 2001). Dabei fördert mPGES-2 das Wachstum und die Motilität von kolorektalen Karzinomen über den EP4-Rezeptor-Signalweg (Miyata et al., 2005).

Diese Beobachtungen dienen als Grundlage für unsere Evaluierung der Expression der PGES beim Barrettkarzinom, insbesondere des Zusammenhangs mit COX-2 und PGES. Bisher gab es noch keine vergleichbaren Studien zu dieser Entität. Es wurden weder Zellkultur-Untersuchungen angestrebt, noch Auswertungen von operativen Tumorresektaten durchgeführt.

Bei Korrelation der PGES-Werte im Rahmen dieser Studie mit analog bestimmten COX-2-Genexpressionswerten der selben Tumorresektate ergaben sich signifikante statistische Zusammenhänge. Unsere Untersuchungen belegen eine Koexpression der beiden Enzyme bei den untersuchten Ösophaguskarzinomen.

PGES, ein entscheidendes Enzym des COX-2 Prostaglandin-Synthesewegs, könnte ein wichtiger pharmakologischer Angriffspunkt sein. Zukünftige pharmakologische Studien hierzu wären wünschenswert.

Kolorektale Adenome treten bei Anwendung von COX-2-Inhibitoren deutlich seltener auf (Arber et al., 2006). Beim Barrettkarzinom wird ein klinischer Benefit durch Downregulierung von COX-2 vermutet (Tuynman et al., 2005). Derartige Beobachtungen wurden auch bei Pankreastumoren gemacht (Eibl G et al., 2005). Möglicherweise sprechen auch Tumoren der von uns untersuchten Entität auf selektive COX-2-Hemmstoffe an. Wir wiesen ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen COX-1 und PGES nach.

4.2. TGF β und PGES

Transforming growth factor β (TGF β) ist ein wichtiger Zellregulator mit Wirkung teils als Tumorsuppressor und teils Tumorpromoter. TGF β nimmt Einfluss auf Wachstum und Differenzierung, Zellbeweglichkeit und -überleben, Angiogenese und Immunfunktionen.

Kürzlich wurde bei humanen Leberepitheltumoren eine Resistenz gegen die zytostatische Wirkung von TGF β gezeigt, die über den cPLA2 α /COX-2/EP1 Signalweg erklärt wird (Han C et al., 2004).

In unserer Studie zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen TGF β und PGES. Man kann dies als Hinweis für fehlende Hemmwirkung von TGF β auf Tumorzellen des distalen Ösophagus werten. In früheren Arbeiten wurde bereits die Unterwanderung des Immunsystems durch Überproduktion von TGF β durch Tumorzellen diskutiert.

Welche Position und welcher prognostischer Nutzen TGF β beim Barrettkarzinom zukommt, muss in zukünftigen Studien genauer geklärt werden. PGES jedenfalls steht in keiner signifikanten Korrelation zur UICC- und WHO-Klassifikation.

Frühere Studien an Tumoren anderer Entitäten deuteten auf eine besondere prognostische Bedeutung von TGF β hin (Elliott RL et al., 2005; Guzinska-Ustymowicz K et al., 2005). Möglicherweise sind unsere Untersuchungsergebnisse erste Indizien für die Anwendbarkeit von TGF β in Kombination mit PGES in einem prognostischen Modell bei Tumoren des distalen Ösophagus.

4.3. VEGF-A/VEGF-C und PGES

Sauerstoff und Nährstoffe sind Voraussetzung für Zellwachstum und zelluläres Überleben. Von Vorteil ist die unmittelbare Nähe zu Kapillargefäßen. Während der Organogenese ist das koordinierte Wachstum von Blutgefäßen gesichert. Später ist die Anlage neuer Gefäße – die Angiogenese – fein reguliert. Wegen dieser Abhängigkeit von Blutgefäßen scheint klar, dass proliferierende Zellen funktionell in der Lage sein müssen die Blutgefäßneubildung zu fördern. Als Angiogenese initiierender Faktor wurde VEGF identifiziert. Die Fähigkeit, Angiogenese zu induzieren und aufrecht zu erhalten, gilt als Voraussetzung für die Tumorentwicklung. Dabei werden Aktivatoren verstärkt exprimiert, Inhibitoren eher unterdrückt (Hanahan et al., 2000).

Bei vielen Tumoren findet man erhöhtes VEGF. Beispielsweise bei oralen neoplastischen Läsionen konnte kürzlich VEGF als entscheidender Malignitätsfaktor nachgewiesen werden (Arora et al., 2005). In unserer Studie wurden signifikante Korrelationen von PGES sowohl mit VEGF-A, als auch mit VEGF-C aufgezeigt. VEGF wird in Endo- und Epithelien des Barrett-Adenokarzinoms und umgebenden

Gewebe exprimiert: VEGF-A wird stark in epithelialen Zellen exprimiert; VEGF-C wurde in normalem, gesundem Speiseröhrengewebe nicht detektiert, allerdings bei intestinaler Neoplasie (Morales et al., 2000).

Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom kommt VEGF-A und -C ein wichtiger prognostischer Stellenwert zu. Dabei auffällig: VEGF korreliert signifikant mit der Mikrogefäßdichte (Huang et al., 2005; Shimanuki et al., 2005). Und letztere korreliert in unserer Studie ebenfalls mit PGES (siehe auch Kapitel 4.4).

4.4. Microvessel-Density

Neoangiogenese ist Voraussetzung für invasives Wachstum von Karzinomen und für Metastasierung. Die Microvessel-Density (MVD) ist signifikant korreliert mit Grad, Stadium und malignem Potential von Tumoren (Canoglu A et al., 2004). In früheren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Quantität an Prostaglandin-E2 und der Mikrogefäßdichte bei kolorektalen Tumoren erkannt (Cianchi F et al., 2004).

In unserer Studie stellte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Microvessel-Density und PGES dar. Somit wiesen Patienten mit hoher Mikrogefäßdichte einen hohen PGES-Wert auf.

Die Durchführung zur Bestimmung der MVD ist ein etabliertes Verfahren, das nur wenige Schwachstellen aufweist. Die Probenentnahme bei der Micro-Tissue-Array Herstellung aus dem Donortumorblock erfordert höchste Sorgfalt, da sonst ein weniger relevantes Präparationsareal zur Untersuchung und Auswertung kommen könnte. Grundsätzlich wäre eine Bias durch eine unerkannte Heterogenität in der Struktur des Tumors denkbar. Deshalb wird aus jeweils drei parallelen Auswertungen der selben Tumorprobe ein Mittelwert errechnet. Ein erfahrender Untersucher minimiert die Gefahr untersucherabhängiger Auszählungsergebnisse der sog. High-Power-Fields.

4.5. Univariate Überlebensanalyse

Viele Tumoren des Gastrointestinaltrakts zeichnen sich durch eine sehr schlechte Prognose aus. Beim Barrettkarzinom ist der Mittelwert der PGES-Expression möglicherweise prognostisch bedeutsam: Patienten mit einer unter dem Mittelwert liegenden PGES-Quantität zeichnen sich durch längeres Überleben aus.

Kürzlich wurden ösophageale Adenokarzinome enzymgenetisch klassifiziert und die klinische Bedeutung diskutiert (Brabender et al., 2005). PGES war nicht Bestandteil dieser Auswertung.

Für pulmonale Adenokarzinome existiert ein Prognose-Score-System in das die Expression von PGES als ein geeigneter Parameter Eingang gefunden hat, da sie bei multivariater Analyse als unabhängig von anderen starken Prognoseprädiktoren identifiziert worden ist (Endoh et al., 2004).

Zur Klärung, ob PGES ebenfalls bei Tumoren des distalen Ösophagus für prognostische Aussagen herangezogen werden könnte, verwendeten wir bewährte Methoden der Forscher Kaplan und Meier. Ein prognostischer Einfluss ist wahrscheinlich; daher sollte die Verwendbarkeit der PGES zusammen mit den Ergebnissen von Brabender et al., 2005, in einem vergleichbaren Prognose-Score-System beim Barrett-Karzinom diskutiert werden.

4.6. Klinische Implikationen / Anwendung

Aufgrund der Zunahme der Inzidenz des Adenokarzinoms des distalen Ösophagus gewinnt dieses zunehmend an Bedeutung. Die in dieser Studie erzielten Beobachtungen könnten insbesondere für pharmakologische Ansatzpunkte von großem Interesse sein. Als Downstream-Enzym des Arachidonsäure-Metabolismus steht die Prostaglandin-E-Synthase (PGES) im Zentrum aktuellster Forschung (Hayakawa, 2006). Bereits bei anderen Tumorentitäten könnte die positive Beeinflussung der Progression und Prognose durch pharmakologische Beeinflussung dieses Stoffwechselwegs – beispielsweise durch selektive COX2-Hemmer – gezeigt werden (Arber et al., 2006; Tuyenman et al., 2005; Panel MI et al., 2005).

Die PGES bei ösophagealen Tumoren steht laut dieser Studie in signifikantem Zusammenhang mit der Angiogenese und Mikrogefäßdichte. Es wurden zudem Korrelationen zu Faktoren gefunden für die bereits aus früheren Studien eine Verbindung zum Tumorneovaskularisationen bekannt ist (VEGF-A, VEGF-C; Hanahan et al., 2000; Arora et al., 2005).

Bei zukünftigen Untersuchungen von Tumoren des distalen Ösophagus sollte nunmehr die pharmakologische Hemmung des Arachidonsäure-Stoffwechselwegs weiter untersucht werden. Die gezielte pharmakologische Inhibition von PGES und

deren Folgen sollte Inhalt zukünftiger Recherchen sein. Ob sich eine so reduzierte Freisetzung von PGE₂ positiv auf den Verlauf und die Prognose von Barrett-Karzinomen auswirken könnte, ist bisher noch nicht untersucht.

Ein neuer therapeutischer Ansatz ist der Einsatz von Antikörpern bei der Behandlung von gastrointestinalen Tumoren. Verschiedene monoklonale Antikörper gegen den Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) werden derzeit erfolgversprechend am Speiseröhren-, Kolorektal- Pankreas- und Hepatozellulärkarzinom eingesetzt (Marshall et al., 2006). Ein Antikörper gegen EGFR, IMC-225/Erbitux, findet schon klinische Anwendung bei therapieresistenten Kolorektalkarzinomen und wird derzeit am Pankreaskarzinom erprobt (Wiedmann et Caca, 2005).

Der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen PGES stellt womöglich bei Tumoren der von uns untersuchten Entität einen erfolgversprechenden Therapieansatz dar, der in nachfolgenden Studien genauerer Analyse bedarf. Levamisole hemmt die PGES-Bildung auf Transkriptionsebene und hat in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung bei der Therapie intestinaler Tumoren erhalten.

5. Zusammenfassung

Die Inzidenz des Adenokarzinoms des distalen Ösophagus (Barrett-Karzinom) steigt rapide an – insbesondere bei weißen Männern der westlichen Welt. Und seine Prognose ist schlecht. Ausgelöst durch chronisch gastroduodenalen Reflux (GERD) kommt es zu metaplastischem Umbau von gesundem Speiseröhrengewebe zum Barrett-Ösophagus – und zu maligner Entartung.

Prostaglandin E₂ (PGE₂) hat unterschiedliche physiologische Aufgaben. Auch eine Beteiligung bei der Karzinogenese wird postuliert. PGE₂ soll hierbei eine Mediatorfunktion zukommen, insbesondere bei tumorbedingter Neovaskularisation und Tumorwachstum. PGE₂ wird durch Prostaglandin-E-Synthasen (PGES) synthetisiert.

Welche Rolle PGES beim Barrett-Karzinom spielt ist noch nicht abschließend geklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Expressionsanalyse der PGES. An 123 routinemäßig in Paraffin eingebetteten Tumorproben wurde eine semi-quantitative Genanalyse auf mRNA-Ebene (TaqMan) durchgeführt.

Das mittlere mRNA-Expressionsniveau (PGES/GAPDH ratio) lag bei 10,72 [range 0,35-68,41]. Statistisch hoch-signifikante Korrelationen von PGES mit COX-1 und -2, VEGF-A und -C, sowie TGF β ($p < 0,001$) wurden nachgewiesen. Ebenfalls eine signifikante Korrelation zur Mikrogefäßdichte (MVD) wurde aufgezeigt.

Die PGES-Genexpression korrelierte mit keinem der untersuchten klinisch-pathologischen Parameter signifikant: UICC-Klassifikation der Tumoren (T-Kategorie: $p = 0,191$; N-Kategorie: $p = 0,905$), WHO-Klassifikation ($p = 0,651$), R-Klassifikation (Residualtumorstatus; $p = 0,655$), Grading G ($p = 0,464$), sowie Lymphgefäßinvasion L ($p = 0,541$). Die univariate Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier, stratifiziert nach hoher und niedriger PGES-Expression (Mittelwert als Schwellenwert), zeigte einen signifikanten Einfluss einer hohen bzw. niedrigen PGES-Expression auf die Prognose ($p = 0,0288$). Niedriges PGES bedeutet längere Überlebenszeit.

Die PGES bei ösophagealen Tumoren steht dieser Studie zur Folge in signifikantem Zusammenhang mit Faktoren der Angiogenese und Zellregulation. Dies stellt möglicherweise einen Ansatzpunkt für zukünftige pharmakologische Studien dar. Eine prognostische Bedeutung der PGES-Expression ist wahrscheinlich. Weitere Forschung hinsichtlich PGES als Ziel für molekulare Therapien scheint gerechtfertigt.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdalla SI, Lao-Sirieix P, Novelli MR, Lovat LB, Sanderson IR, Fitzgerald RC. Gastrin-induced cyclooxygenase-2 expression in Barrett's carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 4784-4792.
2. Amir M, Agarwal HK. Role of COX-2 selective inhibitors for prevention and treatment of cancer. *Pharmazie*. 2005; 60: 563-570.
3. Arber N, Eagle CJ, Spicak J, Racz I, Dite P, Hajer J, Zavoral M, Lechuga MJ, Gerletti P, Tang J, Rosenstein RB, Macdonald K, Bhadra P, Fowler R, Wittes J, Zauber AG, Solomon SD, Levin B; PreSAP Trial Investigators. Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *N Engl J Med*. 2006; 355: 885-895.
4. Arora S, Kaur J, Sharma C, Mathur M, Bahadur S, Shukla NK, Deo SV, Ralhan R. Stromelysin 3, ets-1, and VEGF expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with microvessel density, progression and prognosis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2272-2284.
5. Baguma-Nibasheka M, Barclay C, Li AW, Geldenhuys L, Porter GA, Blay J, Casson AG, Murphy PR. Selective cyclooxygenase-2 inhibition suppresses basic fibroblast growth factor expression in human esophageal adenocarcinoma. *Mol Carcinog*. 2007.
6. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005; 21: 389-395.
7. Becker C, Fantini MC, Neurath MF. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17: 97-106.
8. Birkmeyer JD, Dimick JB, Birkmeyer NJ. Measuring the quality of surgical care: structure, process, or outcomes? *J Am Coll Surg*. 2004; 198: 626-632.
9. Birkmeyer NJ, Birkmeyer JD. Strategies for improving surgical quality--should payers reward excellence or effort? *N Engl J Med*. 2006; 354: 864-870.
10. Brabender J, Marjoram P, Lord RV, Metzger R, Salonga D, Vallbohmer D, Schafer H, Danenberg KD, Danenberg PV, Selaru FM, Baldus SE, Holscher AH, Meltzer SJ, Schneider PM. The molecular signature of normal squamous esophageal epithelium identifies the presence of a field effect and can discriminate between patients with Barrett's esophagus and patients with

- Barrett's-associated adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 2113-2117.
11. Buttar NS, Anderson MA, Krishnadath KK. Chemopreventative potential of selective cyclooxygenase inhibition in Barrett's epithelium: An in vitro study. *Gastroenterology* 2000; 118: A35.
 12. Chan AT, Giovannucci EL, Mayerhardt JA, Schernhammer ES, Curhan GC, Fuchs CS. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA.* 2005; 294: 914-923.
 13. Chang SH, Liu CH, Conway R, Han DK, Nithipatikom K, Trifan OC, Lane TF, Hla T. Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 591-596.
 14. Canoglu A, Gogus C, Beduk Y, Orhan D, Tulunay O, Baltaci S. Microvessel density as a prognostic marker in bladder carcinoma: correlation with tumor grade, stage and prognosis. *Int Urol Nephrol* 2004; 36: 401-405.
 15. Chell S, Patsos HA, Qualtrough D, H-Zadeh AM, Hicks DJ, Kaidi A, Witherden IR, Williams AC, Paraskeva C. Prospects in NSAID-derived chemoprevention of colorectal cancer. *Biochem Soc Trans.* 2005 Aug; 33: 667-671.
 16. Chen CC, Sun YT, Chen JJ, Chang YJ. Tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen-activated protein kinases, and I κ B kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells. *Mol Pharmacol.* 2001; 59: 493-500.
 17. Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N, Perna F, Fabbroni V, Di Felice A, Perigli G, Mazzanti R, Masini E. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2694-2704.
 18. Corley DA, Kerlikowske K, Verma R, Buffler P. Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology.* 2003; 124: 47-56.
 19. DeMeester TR. Surgical therapy for Barrett's esophagus: prevention, protection and excision. *Dis Esophagus.* 2002; 15: 109-116.
 20. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83: 2049-2053.

21. DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1083: 121-134.
22. Dimick JB, Goodney PP, Orringer MB, Birkmeyer JD. Specialty training and mortality after esophageal cancer resection. *Ann Thorac Surg*. 2005 Jul; 80: 282-286.
23. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183-1188.
24. Eibl G, Takata Y, Boros LG, Liu J, Okada Y, Reber HA, Hines OJ. Growth stimulation of COX-2-negative pancreatic cancer by a selective COX-2 inhibitor. *Cancer Res* 2005; 65: 982-990.
25. Eli Y, Przedewski F, Levin G, Kariv N, Raz A. Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 2001; 6: 565-571.
26. Elliott RL, Blobe GC. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2078-2093.
27. Endoh H, Tomida S, Yatabe Y, Konishi H, Osada H, Tajima K, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 2004; 22: 811-819.
28. Ermert L, Dierkes C, Ermert M. Immunohistochemical Expression of Cyclooxygenase Isoenzymes and Downstream Enzymes in Human Lung Tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1604-1610.
29. Ermert M, Merkle M, Mootz R, Grimminger F, Seeger W, Ermert L. Endotoxin priming of the cyclooxygenase-2-thromboxane axis in isolated rat lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Jun; 278: 1195-1203.
30. Evans JF, Kargman SL. Cancer and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition. *Curr Pharm Des*. 2004; 10: 627-634.
31. Farrow DC, Vaughan TL, Hansten PD, Stanford JL, Risch HA, Gammon MD, Chow WH, Dubrow R, Ahsan H, Mayne ST, Schoenberg JB, West AB, Rotterdam H, Fraumeni JF Jr, Blot WJ. Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 97-102.

32. Fong CY, Pang L, Holland E, Knox AJ. TGF-beta1 stimulates IL-8 release, COX-2 expression, and PGE(2) release in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Jul; 279: 201-207.
33. Fu SL, Wu YL, Zhang YP, Qiao MM, Chen Y. Anti-cancer effects of COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1971-1974.
34. Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA. Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J*. 1991 Jun; 5: 2304-2312.
35. Funkhouser EM, Sharp GB. Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. *Cancer* 1995; 76: 1116-1119.
36. Gallo O, Masini E, Bianchi B, Bruschini L, Paglierani M, Franchi A. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2002; 33: 708-714.
37. Goerig M, Habe nicht AJ, Heitz R, Zeh W, Katus H, Kommerell B, Ziegler R, Glomset JA. sn-1,2-Diacylglycerols and phorbol diesters stimulate thromboxane synthesis by de novo synthesis of prostaglandin H synthase in human promyelocytic leukemia cells. *J Clin Invest*. 1987; 79: 903-911.
38. Grosch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98: 736-747.
39. Guan Y, Zhang Y, Schneider A, Riendeau D, Mancini JA, Davis L, Komhoff M, Breyer RM, Breyer MD. Urogenital distribution of a mouse membrane-associated prostaglandin E(2) synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: 1173-1177.
40. Guzinska-Ustymowicz K, Kemon A. Transforming growth factor-beta can be a parameter of aggressiveness of pT1 colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1193-1195.
41. Hachisuka T, Narikiyo M, Yamada Y, Ishikawa H, Ueno M, Uchida H, Yoriki R, Ohigashi Y, Miki K, Tamaki H, Mizuno T, Nakajima Y. High Lymphatic vessel density correlates with overexpression of VEGF-C in gastric cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 733-737.

42. Han C, Demetris AJ, Liu Y, Shelhamer JH, Wu T. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) activates cytosolic phospholipase A2alpha (cPLA2alpha)-mediated prostaglandin E2 (PGE2)/EP1 and peroxisome proliferators-activated receptor-gamma (PPAR-gamma)/Smad signalling pathways in human liver cancer cells. A novel mechanism for subversion of TGF-beta-induced mitoinhibition. *J Biol Chem* 2004; 279: 44344-44354.
43. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
44. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994; 94: 2504-2510.
45. Hayakawa T, Fujiwara Y, Hamaguchi M, Sugawa T, Okuyama M, Sasaki E, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Roles of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 in rat acid reflux oesophagitis. *Gut*. 2006; 55: 450-456.
46. Hempel SL, Monick MM, Hunninghake GW. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J Clin Invest*. 1994;93:391-396.
47. Higashi Y, Kanekura T, Kanzaki T. Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer*. 2000; 86: 667-671.
48. Honjo S, Kase S, Osaki M, Ardyanto TD, Kaibara N, Ito H. Cyclooxygenase-2 expression in human gastric tubular adenomas and carcinomas; correlation with intratumoral microvessel density and apoptotic index. *Anticancer Res* 2004; 24: 1439-1444.
49. Huang C, Liu D, Masuya D, Nakashima T, Kameyama K, Ishikawa S, Ueno M, Haba R, Yakomise H. Clinical application of biological markers for treatments of resectable non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2005; online published.
50. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in Lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res*. 1998; 58: 1208-1216.
51. Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent,

- inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 7220-7225.
52. Jang TJ. Expression of proteins related to prostaglandin E₂ biosynthesis is increased in human gastric cancer and during gastric carcinogenesis. *Virchows Arch*. 2004; 445: 564-571.
 53. Jang TJ, Min SK, Bae JD, Jung KH, Lee JI, Kim JR, Ahn WS. Expression of the cyclooxygenase 2, microsomal prostaglandin E synthase 1, and EP receptors is increased in rat oesophageal squamous cell dysplasia and Barrett's metaplasia induced by duodenal contents reflux. *Gut* 2004; 53: 27-33.
 54. Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 1999; 5: 1418-1423.
 55. Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of Lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol* 2002; 15: 434-440.
 56. Kamei D, Murakami M, Nakatani Y, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *J Biol Chem* 2003; 278: 19396-19405.
 57. Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, Evans J, O'Neill G. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 1996; 111: 445-454.
 58. Kashfi K, Ragas B. Is COX-2 a 'collateral' target in cancer prevention? *Biochem Soc Trans*. 2005; 33: 724-727.
 59. Kaur BS, Khamnehi N, Irvani M, et al: Refecoxib inhibits cyclooxygenase 2 expression and activity and reduces cell proliferation in Barrett' esophagus. *Gastroenterology* 2002; 123: 60-67.
 60. Kaur BS, Triadafilopoulos G. Acid- and bile-induced PGE(2) release and hyperproliferation in Barrett's esophagus are COX-2 and PKC-epsilon dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002; 283: 327-334.
 61. Kawamori T, Kitamura T, Watanabe K, Uchiya N, Maruyama T, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K. Prostaglandin E receptor subtype EP(1)

- deficiency inhibits colon cancer development. *Carcinogenesis*. 2005; 26: 353-357.
62. Kawamori T, Uchiya N, Kitamura T, Ohuchida S, Yamamoto H, Maruyama T, Sugimura T, Wakabayashi K. Evaluation of a selective prostaglandin E receptor EP1 antagonist for potential properties in colon carcinogenesis. *Anticancer Res* 2001; 21: 3865-3869.
 63. Kawamori T, Uchiya N, Nakatsugi S, Watanabe K, Ohuchida S, Yamamoto H, Maruyama T, Kondo K, Sugimura T, Wakabayashi K. Chemopreventive effects of ONO-8711, a selective prostaglandin E receptor EP(1) antagonist, on breast cancer development. *Carcinogenesis* 2001; 22: 2001-2004.
 64. Khalifeh I, Munkarah AR, Lonardo F, Malone JM, Morris R, Lawrence WD, Ali-Fehmi R. Expression of Cox-2, CD34, Bcl-2, and p53 and survival in patients with primary peritoneal serous carcinoma and primary ovarian serous carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23: 162-169.
 65. Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuga, Yoshida S: Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer* 2001; 9: 333-338.
 66. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaijer R, van Hinsbergh VW. Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol*. 1996; 132: 1177-1188.
 67. Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 825-831.
 68. Laporte JD, Moore PE, Lahiri T, Schwartzman IN, Panettieri RA Jr, Shore SA. p38 MAP kinase regulates IL-1 beta responses in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 279: L932-941.
 69. Li X, Zhang YY, Wang Q, Fu SB. Association between endogenous gene expression and growth regulation induced by TGF-beta1 in human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2005; 11: 61-68.
 70. Lin PH, Pan Z, Zheng L, Li N, Danielpour D, Ma JJ. Overexpression of Bax sensitizes prostate cancer cells to TGF-beta induced apoptosis. *Cell Res* 2005; 15: 160-166.

71. Lin Y, Kikuchi S, Obata Y, Yagyu K. Serum levels of transforming growth factor beta1 are significantly correlated with venous invasion in patients with gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21: 432-437.
72. Mancini JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, Chan CC, Riendeau D. Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem* 2001; 276: 4469-4475.
73. Marshall J. Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer*. 2006; 107: 1207-1218.
74. Martin Sanz P, Hortelano S, Bosca L, Casado M. Cyclooxygenase 2: understanding the pathophysiological role through genetically altered mouse models. *Front Biosci*. 2006; 11: 2876-2888.
75. Mazhar D, Gillmore R, Waxman J. COX and cancer. *QJM*. 2005; 98: 711-718.
76. Michael D, Beer DG, Wilke CW, Miller DE, Glover TW. Frequent deletions of FHIT and FRA3B in Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinomas. *Oncogene*. 1997; 15: 1653-1659.
77. Miyata Y, Kanda S, Nomata K, Eguchi J, Kanetake H. Expression of cyclooxygenase-2 and EP4 receptor in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *J Urol* 2005; 173: 56-60.
78. Mobius C, Freire J, Becker I, Feith M, Brucher BL, Hennig M, Siewert JR, Stein HJ. VEGF-C Expression in Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma of the Esophagus. *World J Surg*. 2007.
79. Mobius C, Stein HJ, Spiess C, Becker I, Feith M, Theisen J, Gais P, Jutting U, Siewert JR. COX2 expression, angiogenesis, proliferation and survival in Barrett's cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2005; 31: 755-759.
80. Montgomery E, Goldblum JR, Greenson JK, Haber MM, Lamps LW, Lauwers GY, Lazenby AJ, Lewin DN, Robert ME, Washington K, Zuhurak ML, Hart J. Dysplasia as a predictive marker for invasive carcinoma in Barrett esophagus: a follow-up study based on 138 cases from a diagnostic variability study. *Hum Pathol*. 2001; 32: 379-388.
81. Morales CP, Souza RF, Spechler SJ. Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. *Lancet*. 2002; 360: 1587-1589.
82. Morita I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002; 68-69: 165-175.

83. Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Kudo I. Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J Biol Chem.* 1999; 274: 3103-3115.
84. Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Ohmiya Y, Watanabe K, Kudo I. Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* 2003; 278: 37937-37947.
85. Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, Kudo I. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000; 275: 32783-32792.
86. Nakatani Y, Kudo I. Prostaglandin E2 synthases. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2002; 120: 373-378.
87. Narayan S, Thangasamy T, Balusu R. Transforming growth factor-beta receptor signalling in cancer. *Front Biosci* 2005; 10: 1135-1145.
88. Niino H, Otsuka T, Ogami E, Yamaoka K, Nagano S, Akahoshi M, Nakashima H, Arinobu Y, Izuhara K, Niho Y. MAP kinase pathways as a route for regulatory mechanisms of IL-10 and IL-4 which inhibit COX-2 expression in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 250: 200-205.
89. Okami J, Yamamoto H, Fujiwara Y, Tsujie M, Kondo M, Noura S, Oshima S, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Ishikawa O, Sakon M, Matsuura N, Nakamori S, Monden M. Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 2018-2024.
90. Onwuegbusi BA, Aitchison A, Chin SF, Kranjac T, Mills I, Huang Y, Lao-Sirieix P, Caldas C, Fitzgerald RC. Impaired transforming growth factor beta signalling in Barrett's carcinogenesis due to frequent SMAD4 inactivation. *Gut.* 2006 Jun;55: 764-774.
91. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified tissue microarray technology. *Mol Pathol* 2003; 56: 198-204.
92. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 2002; 8: 289-293.

93. Paz K, Zhu Z. Development of angiogenesis inhibitors to vascular endothelial growth factor receptor 2. Current status and future perspective. *Front Biosci* 2005; 10: 1415-1439.
94. Peppelenbosch MP, Tertoolen LG, Hage WJ, de Laat SW. Epidermal growth factor-induced actin remodeling is regulated by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase products. *Cell*. 1993; 74: 565-575.
95. Pohl H, Welch HG. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97: 142-146.
96. Potrc S, Gadijiev E, Hajdinjak T, Kavalar R. Clinicopathological and immunohistochemical markers after radical gastrectomy for gastric cancer. *Hepatogastroenterology*. 2007; 54: 308-314.
97. Pozzi A, Yan X, Macias-Perez I, Wei S, Hata AN, Breyer RM, Morrow JD, Capdevila JH. Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation. *J Biol Chem*. 2004; 279: 29797-29804.
98. Reinhart WH, Muller O, Halter F. Influence of long-term 16,16-dimethyl prostaglandin E2 treatment on the rat gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology*. 1983; 85: 1003-1010.
99. Rigas B, Goldman IS, Levine L. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med*. 1993; 122: 518-523.
100. Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Sasaki Y, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest* 1999; 79: 1469-1477.
101. Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, Narumiya S, Taketo MM. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res*. 2002; 62: 506-511.
102. Shaheen NJ, Crosby MA, Bozyski EM, Sandler RS. Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett's esophagus? *Gastroenterology*. 2000; 119: 333-338.
103. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58: 362-366.

104. Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 18075-18081.
105. 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: 360-369.
106. Skobe M, Rockwell P, Goldstein N, Vosseler S, Fusenig NE. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med.* 1997; 3:1222-1227.
107. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69: 145-182.
108. Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, Sugimoto Y, Ushikubi F, Narumiya S, Oshima M, Taketo MM. Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. *Nat Med* 2001; 7: 1048-1051.
109. Spechler SJ. Barrett's esophagus: a molecular perspective. *Curr Gastroenterol Rep.* 2005; 7: 177-181.
110. Spechler SJ. Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Med Clin North Am.* 2002; 86: 1423-45.
111. Spechler SJ. Clinical practice. Barrett's Esophagus. *N Engl J Med* 2002; 346: 836-842.
112. Spechler SJ. The natural history of dysplasia and cancer in esophagitis and Barrett esophagus. *J Clin Gastroenterol.* 2003; 36: S2-5; discussion S26-S28.
113. Stichtenoth DO, Thoren S, Bian H, Peters-Golden M, Jakobsson PJ, Crofford LJ. Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol* 2001; 167: 469-474.
114. Stover DG, Bierie B, Moses HL. A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment. *J Cell Biochem* 2007.
115. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* 90: part I: 1529-1536; part II: 1609-1620

116. Tanioka T, Nakatani Y, Kobayashi T, Tsujimoto M, Oh-ishi S, Murakami M, Kudo I. Regulation of cytosolic prostaglandin E2 synthase by 90-kDa heat shock protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303: 1018-1023.
117. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 32775-32782.
118. Tay A, Squire JA, Goldberg H, Skorecki K. Assignment of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene to 1q25 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1994; 23: 718-719.
119. Tendo M, Yashiro M, Nakazawa K, Yamada N, Hirakawa K. Inhibitory effect of a selective cyclooxygenase inhibitor on the invasion-stimulating activity of orthotopic fibroblasts for scirrhous gastric cancer cells. *Cancer Sci.* 2005; 96: 451-455.
120. Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 1322-1327.
121. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cell increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3336-3340.
122. Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase Regulates Angiogenesis Incuded by Colon Cancer Cells. *Cell* 1998; 93: 705-714.
123. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahey TJ 3rd. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 1999; 59: 987-990.
124. Tuynman JB, Buskens CJ, Kemper K, ten Kate FJ, Offerhaus GJ, Richel DJ, van Lanschot JJ. Neoadjuvant selective COX-2 inhibition down-regulates important oncogenic pathways in patients with esophageal adenocarcinoma. *Ann Surg.* 2005;242 (6): 840-849, discussion 849-850.
125. Ueno N, Murakami M, Tanioka T, Fujiumori K, Tanabe T, Urade Y, Kudo I. Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A2. *J Biol Chem.* 2001; 276: 34918-34927.

126. Ulrich CM, Bigler J, Potter JD. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 130-140.
127. Vallbohmer D, Peters JH, Kuramochi H, Oh D, Yang D, Shimizu D, DeMeester SR, Hagen JA, Chandrasoma PT, Danenberg KD, Danenberg PV, DeMeester TR. Molecular determinants in targeted therapy for esophageal adenocarcinoma. *Arch Surg*. 2006; 141: 476-481; discussion 481-482.
128. van Soest EM, Dieleman JP, Siersema PD, Sturkenboom MC, Kuipers EJ. Increasing incidence of Barrett's oesophagus in the general population. *Gut*. 2005; 54: 1062-1066.
129. von Rahden BH, Stein HJ, Feith M, Puhlinger 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: 786-794.
130. von Rahden BH, Stein HJ, Puhlinger F, Koch I, Langer R, Piontek G, Siewert JR, Hofler H, Sarbia M. Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2005; 65: 5038-5044.
131. von Rahden BH, Stein HJ, Siewert JR. Barrett's esophagus and Barrett's carcinoma. *Curr Oncol Rep*. 2003; 5: 203-209.
132. Wang L, Zhang LH, Li YL, Li YL, Liu Z. Expression of MMP-9 and MMP-9 mRNA in gastric carcinoma and its correlation with angiogenesis. *Cancer Res*. 1995; 55: 2556-2559.
133. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest*. 1995; 95: 1789-1797.
134. Wendum D, Comperat E, Boelle PY, Parc R, Masliah J, Trugnan G, Flejou JF. Cytoplasmic phospholipase A2 alpha overexpression in stromal cells is correlated with angiogenesis in human colorectal cancer. *Mod Pathol* 2004.
135. Werner M, Mueller J, Walch A, Hoefler H. The molecular pathology of Barrett's esophagus. *Histol Histopathol*. 1999; 14: 553-559.
136. Wiedmann MW, Caca K. Molecularly targeted therapy for gastrointestinal cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2005; 5: 171-193.

137. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenase in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999; 18: 7908-7916.
138. Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 4997-5001.
139. Wong R, Malthaner R. Esophageal cancer: a systematic review. *Curr Probl Cancer*. 2000; 24: 297-373.
140. Siewert JR, Ott K. Are squamous and adenocarcinomas of the esophagus the same disease? *Semin Radiat Oncol*. 2007; 17: 38-44.
141. Yamada T, Komoto J, Watanabe K, Ohmiya Y, Takusagawa F. Crystal Structure and Possible Catalytic Mechanism of Microsomal Prostaglandin E Synthase Type 2 (mPGES-2). *J Mol Biol*. 2005; 348: 1163-1176.
142. Yamagata K, Matsumura K, Inoue W, Shiraki T, Suzuki K, Yasuda S, Sugiura H, Cao C, Watanabe Y, Kobayashi S. Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J Neurosci* 2001; 21: 2669-2677.
143. Yoshimatsu K, Golijanin D, Paty PB, Soslow RA, Jakobsson PJ, DeLellis RA, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Inducible microsomal prostaglandin E synthase is overexpressed in colorectal adenomas and cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3971-3976.
144. Yoshimoto A, Kasahara K, Kawashima A, Fujimura M, Nakao S. Characterization of the prostaglandin biosynthetic pathway in non-small cell lung cancer: a comparison with small cell lung cancer and correlation with angiogenesis, angiogenic factors and metastases. *Oncol Rep*. 2005; 13: 1049-1057.
145. Zhang Q, Yang X, Pins M, Javonovic B, Kunzel T, Kim SJ, Parijs LV, Greenberg NM, Liu V, Guo Y, Lee C. Adoptive transfer of tumor-reactive transforming growth factor-beta-insensitive CD8+ T cells: eradication of autologous mouse prostate cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 1761-1769.
146. Zhang Y, Wu XH, Cao GH, Li S. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and angiogenesis in renal cell carcinoma. *Ai Zheng*. 2004; 23: 326-329.
147. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 198-204.

7. Lebenslauf

Geboren am 17.07.1979 in Landshut, ledig.

7.1. Klinische und weitere wissenschaftliche Tätigkeit

- 12/2002-09/2003 Raman-Spektrometrie, Zell- bzw. Tumorforschung.
Anatomisches Institut, TU Dresden.
- 01/2004-05/2004 Tissue Engineering, Konstruktion künstlicher Knochenfragmente,
Zelllabor und tierexperimentelle Studie. Chirurgische Klinik der
LMU, München.
- Seit 01/2007 Assistenzarzt Viszeralchirurgie, Uniklinikum Regensburg

7.2. Veröffentlichungen und Vorträge

- 10/2004-01/2007 Freie journalistische Tätigkeit bei Süddeutscher Zeitung; Autor
im Ressort „Wissen“.
- 29.07.2005 Vortrag meines Konzepts „Etablierung eines flächendeckenden
Schulsanitätsdienstes in Bayern gemäß GUV und KM“. Beiwohner: Bayerisches Kultusministerium, Hilfsorganisationen.
- In Review „Case report: Multi-ocular adenocarcinoma associated with
Barrett’s Metaplasia“. Zusammenarbeit mit PD Dr. J. Theisen,
Chirurgische Klinik im Klinikum rechts der Isar, München.
- In Arbeit „Einfluss systemischer neoadjuvanter Chemotherapie (CTX) auf
freie intraperitoneale Tumorzellen“. Zusammenarbeit mit OA Dr.
K. Ott, Chirurgische Klinik im Klinikum rechts der Isar, München.

7.3. Klinische Praktika und Auslandsaufenthalte

- 07/2002 Famulatur in onkologischer Praxis Dr. Vehling-Kaiser, Landshut.
Dauer: 4 Wochen.
- 08/2002 Famulatur in Intensivmedizin, Centre Hospitalier Universitaire
Montpellier, Frankreich. Dauer: 5 Wochen.
- 02/2003 Famulatur im Bereich Viszeralchirurgie, Hôpital Pitié-Salpêtrière,
Paris, Frankreich. Dauer: 5 Wochen
- 08/2003 Studentenaustausch an Université Lyon I, Frankreich.
Dauer: 3 Monate. Währenddessen: Praktikum im Bereich
Viszeralchirurgie, Hôpital de la Croix-Rousse. Dauer: 3 Wochen.
- 03/2004 Famulatur in chirurgischer Poliklinik, Chirurgische Klinik der
LMU, München. Dauer: 4 Wochen.
- 03/2005 Famulatur im Bereich Innere Medizin/Infektiologie, Centre
Hospitalier Universitaire Kigali, Ruanda. Dauer: 4 Wochen.
Zeitgleich Mitarbeit in Entwicklungshilfeprojekten des rheinland-
pfälzisch-ruandischen Partnerschaftsprogramms.
- 10/2005-12/2005 PJ-Abschnitt Innere Medizin (Gastroenterologie, Kardiologie),
Sultan Qaboos University Hospital, Muscat, Oman.
Dauer: 8 Wochen
- 12/2005-02/2006 PJ-Abschnitt Innere Medizin (Endokrinologie, Nephrologie),
Hospital Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur,
Malaysia. Dauer: 8 Wochen.
- 02/2006 Freiwilliges Orientierungs-Praktikum, Innere Medizin, Klinikum
Landshut. Dauer: 1 Woche.

- 02/2006-06/2006 PJ-Abschnitt Chirurgie (Viszeralchirurgie, Poliklinik), Klinikum rechts der Isar, München. Dauer: 16 Wochen.
- 06/2006-09/2006 PJ-Abschnitt Augenheilkunde, Augenklinik im Klinikum rechts der Isar, München. Dauer: 16 Wochen.

7.4. Lehrerfahrung

- Seit 1996 Ausbilder der Ersten Hilfe beim Bayerischen Roten Kreuz für Schulen, Führerscheinanwärter, Vereine, Industrie, Feuerwehr
- 2002/2003 Kursassistent bei anatomischen Sezierkursen, TU Dresden; alleinverantwortlich für eine Gruppe von 15 Studenten.

7.5. Schulische Ausbildung und Studium

- 09/1996-06/1997 Schüleraustausch, Weed-High-School, Kalifornien, USA; mit Erlangen des amerikanischen High-School Abschlusses.
- 06/1999 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
- 09/2000-05/2002 Medizinstudium an der Semmelweis-Universität Budapest.
- 05/2002 Physikum
- 10/2002-06/2003 Medizinstudium an der TU Dresden
- 08/2003 1. Staatsexamen
- 10/2003-10/2006 Medizinstudium an der TU München
- 08/2005 2. Staatsexamen
- 10/2006 3. Staatsexamen

7.6. Weiterführende Aktivitäten

- Seit 1995 Ehrenamtliches Engagement als Rettungssanitäter beim Bayerischen Roten Kreuz, Kreisverband Landshut.
- Seit 1998 Wehrersatzdienst beim Katastrophenschutz, Stadt Landshut.
- 1998-2004 Teilzeit-Anstellung bei Aicher-Ambulanz München als Rettungssanitäter im Rettungsdienst und Krankentransport
- 1998-2001 Gewerbliche Homepageentwicklung für Unternehmen (z.B. Antenne Bayern); entspr. Programmierkenntnisse.
- 02/2000-07/2000 Teilzeit-Pflegehilfskraft am Uniklinikum Regensburg.
- 01/2003-08/2003 Teilzeit-Nachtwache in Klinik für Psychosomatik und Psychotherapie, TU Dresden; eigenverantwortliche Arbeit.
- 03/2003 Aushilfskraft im Sanitätshaus Letzgus-Lang, Landshut; Aufbereitung von Pflegeutensilien und Kundenbetreuung.
- 2004/2006 Mit-Initiator des Teddykrankenhauses München; Aufgabenbereiche: Finanzierung, Materialbeschaffung.
- 10/2004-10/2006 Werk-Student in BMW-Marketing-Abteilung, München; Kontakt zu sensiblen Kunden, Presse und Management.
- 2005 Knochenmark-Transporte (5) für DKMS in die USA; Abwicklung von Zollformalitäten, Produktüberwachung, Auslieferung

7.7. Weitere Skills

- Fremdsprachen Englisch (sehr gut), Französisch (gut)
- EDV Microsoft office, HTML, PHP, Perl, MySQL (alle gut)

München, den 21.05.2007

8. Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel

Expressionsanalyse der Prostaglandin-E-Synthase der Adenokarzinom des distalen Ösophagus auf mRNA-Ebene

an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München unter der Anleitung und Betreuung durch PD Dr. Katja Ott ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß §6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfleistung vorgelegt. Ich habe die vollständige Dissertation bisher nicht veröffentlicht.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem anderen Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert. Ich habe bisher bei keiner anderen Fakultät die Zulassung zur Promotion beantragt.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität ist mir bekannt.

München, den 21.05.2007

Unterschrift

